

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) merupakan salah satu penyebab utama kematian pada anak. ALL adalah jenis kanker yang menyerang darah dan sumsum tulang, ditandai oleh peningkatan produksi limfoblas abnormal. Limfoblas adalah prekursor dari limfosit, dan ketidaknormalan ini dapat mengganggu fungsi normal sel darah. Angka kejadian ALL meningkat dari 49,1 ribu kasus pada tahun 1990 menjadi 64,2 ribu kasus pada tahun 2017 di seluruh dunia (Dong *et al.*, 2020). Di Amerika Serikat, tercatat 38.136 kasus ALL pada periode 2001 hingga 2014 (Siegel *et al.*, 2017) dan peningkatan kasus setiap tahunnya diperkirakan mencapai sekitar 6.000 kasus (Siegel *et al.*, 2020). Di Indonesia, pada tahun 2018, angka kasus baru ALL pada anak-anak tercatat sebesar 4,32 per 100.000 anak, dengan estimasi 3.434 anak dari 79,6 juta anak mengalami ALL (Garniasih *et al.*, 2022). Tingginya angka kejadian ALL di negara maju maupun berkembang menjadikan penyakit ini penting dalam penelitian dan pengembangan pengobatan kanker.

Pada saat ini, terapi yang umum digunakan untuk mengobati ALL adalah kemoterapi dan radioterapi. Kedua terapi ini menunjukkan tingkat keberhasilan yang signifikan, dengan banyak pasien ALL mencapai remisi jangka panjang. Di samping keberhasilan kedua terapi tersebut, terdapat efek samping yang ditimbulkan, termasuk mutasi DNA, ketidakstabilan genom, penuaan, kelelahan, iritasi kulit, serta risiko jangka panjang seperti fibrosis dan kanker sekunder (van den Boogaard *et al.*, 2022). Efek samping ini tidak hanya menurunkan kualitas hidup pasien, tetapi juga dapat menyebabkan komplikasi yang memerlukan penanganan lebih lanjut. Oleh karena itu, pengembangan terapi yang lebih aman dan efisien menjadi fokus para peneliti dan praktisi medis, salah satunya adalah terapi target menggunakan enzim L-asparaginase II.

L-asparaginase II merupakan enzim yang menghidrolisis asam amino esensial asparagin menjadi asam aspartat dan ammonia (Shakambari, *et al.*, 2019). Asama amino asparagin memiliki peranan penting dalam mendukung pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel kanker (Pavlova and Thompson, 2016). Sel kanker,

terutama leukemia, sangat bergantung pada asparagin karena sel-sel kanker memiliki kemampuan terbatas dalam mensintesis asam amino tersebut. Mengurangi ketersediaan asparagin melalui degradasi L-asparaginase II, sel kanker kehilangan kemampuan untuk melanjutkan sintesis protein, sehingga pertumbuhannya terhambat.

L-asparaginase II yang digunakan secara klinis saat ini banyak diisolasi dari *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi*, yang telah disetujui oleh FDA (Batool *et al.*, 2016). Penggunaan enzim dari sumber ini sering kali menimbulkan efek samping, seperti reaksi alergi, antigenisitas tinggi, dan aktivitas L-glutaminase yang dapat menyebabkan neurotoksisitas (Tsegaye *et al.*, 2024). Selain itu, waktu paruh enzim ini yang pendek membutuhkan pemberian dosis lebih sering, sehingga meningkatkan risiko pembersihan cepat dari sirkulasi darah dan mengurangi efektivitas pengobatan. Oleh karena itu, diperlukan sumber alternatif yang lebih aman dan efektif.

Serratia plymuthica UBCF_13 adalah salah satu bakteri yang diketahui mampu menghasilkan L-asparaginase II. Genom lengkap bakteri ini telah diurutkan dan tersimpan dalam database GenBank NCBI (CP068771.1), yang menunjukkan adanya gen *ansB* pengkode L-asparaginase II (Fatiah *et al.*, 2021). Adanya informasi genom ini, pengembangan sumber alternatif L-asparaginase II yang lebih efektif dan aman untuk terapi kanker memiliki peluang yang besar.

Peningkatan produksi protein L-asparaginase II dapat dilakukan dengan menggunakan teknik DNA rekombinan. Teknik DNA rekombinan memiliki beberapa keunggulan seperti peningkatan produktivitas, kemurnian, dan aktivitas enzimatik. Teknik ini, enzim dapat diproduksi dalam jumlah besar dengan kontrol yang lebih baik terhadap kondisi produksi sehingga menghasilkan produk dengan konsistensi tinggi (Mahajan *et al.*, 2012). Selain itu, teknik rekombinan memungkinkan modifikasi genetik untuk mengurangi aktivitas glutaminase, sehingga mengurangi efek samping yang tidak diinginkan dalam terapi serta rekayasa untuk peningkatan kemampuan efikasinya (Verma *et al.*, 2007).

Penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa L-asparaginase II telah berhasil diekspresikan dengan menggunakan teknik DNA rekombinan. Penelitian yang dilakukan oleh Aishwarya *et al.*, (2019) menunjukkan

keberhasilan ekspresi L-asparaginase II dari *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 dengan *host E. coli* strain BL21(DE3) mencapai aktivitas tertingginya pada suhu 40 °C dan mempertahankan aktivitasnya pada suhu 28 °C dan 30°C. Penelitian serupa yang dilakukan oleh Arredondo-Nuñez *et al.*, (2023) juga menunjukkan keberhasilan ekspresi L-asparaginase II dari bakteri halotoleran *Bacillus subtilis* CH11 pada *host* ekspresi *E. coli* strain BL21(DE3) yang ditumbuhkan pada media LB-Miller dengan induksi 0,5 mM IPTG. Keberhasilan dari penelitian yang sudah dilakukan tersebut membuktikan bahwa teknik DNA rekombinan cocok untuk ekspresi L-asparaginase II.

E. coli menjadi *host* ekspresi yang banyak diminati dalam bioteknologi dan industri. Keuntungan yang didapatkan jika menggunakan *E. coli* sebagai *host* ekspresi adalah siklus hidup yang pendek, bahan baku yang murah, sistem genetik yang sudah banyak dipelajari, mampu mengekspresikan protein dalam jumlah banyak, serta kompatibel dengan berbagai vektor ekspresi dan strain *E. coli* yang telah dikembangkan sehingga memungkinkan optimasi ekspresi protein untuk berbagai jenis protein rekombinan (Huang, *et al.*, 2012; Rosano and Ceccarelli, 2014).

Tahap produksi L-asparaginase II rekombinan dihadapkan dengan tantangan yang kompleks. Penggunaan *E. coli* sebagai *host* ekspresi misalnya dihadapkan dengan beberapa kelemahan seperti, pembentukan tubuh inklusi, endotoksin, lipatan protein yang tidak sesuai, kurangnya modifikasi pasca translasi eukariotik, kelarutan yang rendah, dan sekresi yang tidak memadai (Baeshen *et al.*, 2014). Untuk menanggulangi kondisi tersebut diperlukan pendekatan untuk memaksimalkan produksi produk rekombinan. Pendekatan yang dapat dilakukan, yaitu pemilihan vektor, promoter, dan *host* ekspresi yang sesuai (Kaur *et al.*, 2018).

Pemilihan vektor menjadi upaya yang dapat dilakukan dalam meminimalisir kekurangan penggunaan *E. coli* sebagai *host* ekspresi. Salah satu vektor yang sering digunakan dalam penelitian maupun produksi, yaitu pET-28a+. Vektor ini banyak digunakan karena dilengkapi dengan fitur unggul seperti promoter T7, situs restriksi beragam, regulasi operator Lac, 6His Tag, dan gen penanda resistensi sehingga mampu meningkatkan ekspresi protein rekombinan (G2P, 2021; Li *et al.*, 2022).

Selain memilih vektor ekspresi sebagai strategi optimasi produksi rekombinan L-asparaginase II, juga dapat dilakukan pendekatan dengan promoter sintetik. Promoter merupakan bagian DNA yang mengatur transkripsi gen (Overton, 2014) dan mengkoordinasikan jalur biosintesis yang diatur oleh multi-gen (Jin *et al.*, 2019). Rekayasa promoter dilakukan untuk mendapatkan promoter yang memiliki kekuatan dan fungsi berbeda. Dalam perancangan promoter sintetik, diperlukan strategi yang tepat dalam proses pengerjaannya, yaitu memfilter genom mikroba untuk promoter baru, membuat *promoter library*, dan memodifikasi wilayah ini dari promoter yang ada (Duzenli and Okay, 2020). Pembuatan *promoter library* dapat dilakukan dengan beberapa metode, termasuk penggabungan elemen regulator, mutagenesis, semirasional, hingga penggunaan platform berbasis *artificial intelligence* (AI) yang mempermudah dalam pembuatan *promoter library* (Wang *et al.*, 2020; Seo *et al.*, 2023; Xia *et al.*, 2024). Setelah pembuatan *promoter library* dilakukan penghitungan *position weight matrix* (PWM) menggunakan model matriks untuk menentukan kekuatan elemen berdasarkan urutan nukleotida dan terakhir menganalisis kekuatan promoter sintetik yang dihasilkan, misalnya menggunakan platform CNN (Seo *et al.*, 2023).

Penelitian yang dilakukan oleh Deng *et al.*, (2021) memperlihatkan bahwa promoter sintetik dari *Saccharomyces cerevisiae* mengalami peningkatan kekuatan sebesar dua kali lipat dibandingkan promoter GAL1. Promoter sintetik yang digunakan mendapatkan modifikasi pada bagian *upstream activating sequences* (UASs) dan wilayah inti yang menentukan kinerja setiap promoter dengan sumber karbon yang berbeda. Penelitian lainnya yang dilakukan Chen *et al.*, (2023) memberikan hasil bahwa promoter sintetik yang menggabungkan wilayah inti promoter alami ACP2 dan GDH2 mengalami peningkatan sebesar 7 kali lipat dalam mengekspresikan GUS. Penelitian-penelitian yang dilakukan tersebut, membuktikan bahwa penggunaan promoter sintetik yang dimodifikasi dapat meningkatkan kekuatan promoter untuk meningkatkan produksi protein rekombinan. Peningkatan hasil produksi protein rekombinan ini dapat menurunkan biaya produksi yang tinggi, sehingga harga produk menjadi lebih terjangkau dibandingkan produk komersial lainnya.

Berdasarkan pemaparan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk melakukan fusi gen *ansB* dengan promoter sintetik pSSPM3 ke dalam vektor ekspresi pET-28a+ untuk pengembangan terapi target *Acute Lymphoblastic Leukemia*. Optimasi penggunaan promoter sintetik diharapkan dapat meningkatkan produksi enzim L-asparaginase II secara efisien untuk mendukung terapi medis yang lebih efektif, dan memperluas aplikasi industri enzim ini. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan wawasan baru dalam upaya mengembangkan pendekatan molekuler untuk memaksimalkan ekspresi protein rekombinan dalam sistem biologis.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah promoter sintetik *pSSPM3* berhasil diligasikan ke plasmid pET-28a+?
- 1.2.2 Apakah digesti gen *ansB* dari plasmid rekombinan pGEM T Easy:*ansB* berhasil dilakukan?
- 1.2.3 Apakah gen *ansB* berhasil difusikan dengan promoter sintetik *pSSPM3* membentuk plasmid rekombinan pET-28a+:*pSSPM3*?
- 1.2.4 Apakah plasmid rekombinan pET-28a+:*pSSPM3:ansB* berhasil ditransformasi dan dikloning ke dalam *E. coli*

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Melakukan kloning gen *ansB* yang difusikan dengan promoter sintetik *pSSPM3* ke dalam vektor ekspresi pET-28a.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menyisipkan promoter sintetik *pSSPM3* ke dalam plasmid pET-28a+.
2. Mendigesti gen *ansB* dari plasmid rekombinan pGEM T Easy:*ansB*
3. Memfusikan gen *ansB* dengan promoter sintetik *pSSPM3* ke dalam plasmid rekombinan pET-28a+ : *pSSPM3*.
4. Mentransformasikan dan mengkloning plasmid rekombinan pET-28a+ : *pSSPM3:ansB* ke dalam *E. coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti

1. Meningkatkan pengetahuan dan pemahaman mengenai kloning gen *ansB*
2. Meningkatkan pengetahuan mengenai faktor-faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan menghasilkan plasmid rekombinan pET-28a+:*pSSPM3:ansB* transformasinya ke dalam *E. coli*
3. Meningkatkan pengetahuan mengenai faktor yang dapat mempengaruhi ekspresi L-asparaginase II

1.4.2 Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan

1. Dapat menjadi bahan informasi bagi para peneliti lainnya dalam meningkatkan ekspresi L-asparaginase II rekombinan pada *E. coli*
2. Menjadi rujukan bagi peneliti lain dalam pengembangan ide selanjutnya untuk menambah khazanah ilmu pengetahuan serta aplikasi dibidang medis

1.4.3 Manfaat Bagi Masyarakat

1. Mendapatkan pengobatan yang tidak menimbulkan efek samping yang dapat menurunkan kualitas hidup
2. Memperoleh obat dengan kualitas baik dan diharapkan harga lebih terjangkau

1.4.4 Manfaat Bagi Universitas

Dapat menjadi wadah bagi perguruan tinggi dalam pengaplikasian nilai Tri Dharma Perguruan Tinggi serta meningkatkan reputasi instansi di bidang riset dan publikasi ilmiah.