

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kentang dan singkong merupakan tanaman pangan yang banyak diolah untuk industri pangan. Pengolahan kentang dan singkong menjadi kentang goreng atau keripik umumnya dilakukan melalui proses penggorengan menggunakan suhu tinggi. Proses tersebut diketahui akan mengubah kandungan pati pada kentang dan singkong menjadi akrilamida karena adanya reaksi maillard yang menghasilkan senyawa kompleks antara senyawa karbonil dengan amina berupa asam amino, peptide maupun protein (Zhang *et al.*, 2009).

Lembaga *Agency for Research on Cancer* (IARC) menyatakan akrilamida merupakan senyawa yang bersifat karsinogenik yang dapat memicu terjadinya kanker dan berpotensi menjadi *neurotoxic* (keracunan pada syaraf) pada manusia (IARC, 2017). Akrilamida biasanya terkandung pada makanan secara non-alamiah yang ditemukan pada bahan pangan terutama yang memiliki kandungan pati yang tinggi seperti kentang (Hermanto dan Adawiyah, 2010). Semakin tinggi suhu pada proses produksi makanan biasanya kandungan akrilamida akan semakin banyak.

Lembaga *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa akrilamida termasuk ke dalam kontaminan pangan karena kandungan tersebut sifatnya karsinogenik yang berpotensi sebagai pemicu kanker. Studi toksikologi memaparkan bahwa konsumsi akrilamida pada tikus menyebabkan neurotoksisitas, sedangkan uji coba pada mencit menyebabkan tumbuhnya tumor di tenggorokan (WHO, 2011). Berbagai upaya dilakukan untuk menekan atau mencegah pembentukan akrilamida berlebihan pada pangan olahan. Salah satu upaya yang telah dilakukan antara lain adalah mengubah waktu serta temperatur pemanasan. Langkah tersebut tidak hanya menurunkan pembentukan akrilamida, tetapi juga mengurangi komponen lainnya pada makanan sehingga menurunkan kualitas rasa serta tampilan dari produk makanan tersebut. Pendekatan lain yang bisa dilakukan untuk menekan pembentukan akrilamida perlu dilakukan. Salah

satu di antaranya adalah dengan penambahan enzim L-Asparaginase (Khalil *et al.*, 2021).

L-Asparaginase merupakan enzim yang dapat memecah L-Asparagin (L-Asn) pada akrilamida menjadi asam aspartat dengan melepaskan ammonia yang menyebabkan terjadinya non-reaksi asparagin dengan gula yang akan membentuk akrilamida, dengan kata lain L-Asparaginase dapat menekan pertumbuhan akrilamida. L-Asparaginase biasanya diperoleh melalui fermentasi dan dimurnikan lebih lanjut menggunakan filtrasi pemekatan (Anese *et al.*, 2011). Manfaat lain L-Asparaginase selain menurunkan kadar akrilamida juga digunakan sebagai bahan terapi dalam penanganan kanker *Accute Lymphoblastic Leukemia* (ALL).

Penggunaan L-Asparaginase dalam terapi kanker ALL telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) di Amerika Serikat (FDA, 2022). Sel kanker bersifat auksotrof membutuhkan asam amino asparagin, metionin dan arginin untuk pertumbuhannya (Kumari dan Bansal, 2021). Asam amino asparagin didegradasi oleh enzim L-Asparaginase maka pertumbuhan sel kanker akan terhambat karena kekurangan asam amino asparagin, sedangkan sel normal lainnya akan tetap dalam kondisi baik, oleh karena itu banyak peneliti saat ini yang menggunakan enzim L-Asparaginase untuk terapi kanker ALL.

Proses produksi enzim L-Asparaginase sejauh ini masih belum ekonomis sehingga harga jual enzim tersebut di pasaran masih terlalu mahal yang menyebabkan biaya terapi dengan enzim L-Asparaginase masih cukup tinggi. Cara mengatasi masalah tersebut perlu dicari teknologi yang dapat menurunkan biaya produksi enzim tersebut. Hal lain yang menyebabkan proses produksi enzim L-Asparaginase masih rendah salah satunya karena pemilihan strain bakteri yang kurang tepat, contohnya pada bakteri *Bacillus subtilis* yang sudah banyak diteliti terkait produksi enzim L-Asparaginase, tetapi ketersediaan di pasar bakteri ini tidak sebanyak bakteri *E. coli* (Zulkifli *et al.*, 2018).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memecahkan masalah tersebut adalah menggunakan teknik rekayasa genetika berbasis sistem *prokaryot* menggunakan sel inang (*host*) *E. coli*. Keberhasilan peningkatan produksi senyawa tertentu pada sistem baik *prokaryot* maupun *eukaryote* antara lain

ditentukan oleh kesesuaian atau kompatibilitas antara sistem plasmid dan sel inang sebagai *host* yang digunakan. Plasmid *pET28a(+)* dan bakteri *E. coli* BL21 sejauh ini telah digunakan untuk berbagai studi terkait kloning dan ekspresinya, namun demikian studi penggunaannya terkait dengan ekspresi gen *AnsB* belum pernah dilakukan.

Penelitian ini menggunakan teknik rekayasa genetika untuk mengetahui keberhasilan transformasi dari gen *AnsB* pengkode enzim L-Asparaginase 2 yang berasal dari spesies *Serratia plymuthica* strain UBCF_13. Gen *AnsB* pengkode enzim L-Asparaginase 2 yang diisolasi dari *S. plymuthica* UBCF_13 (bakteri ini diisolasi dari tanaman sawi) diligasikan ke dalam plasmid *pET28a(+)* dan ditransformasikan ke dalam sel inang *Escherichia coli* menggunakan tiga strain yaitu BL21, DH5 α dan DH10B.

Plasmid *pET28a(+)* sering digunakan sebagai vektor ekspresi, dikarenakan plasmid ini memiliki promotor T7 serta dipilih sebagai pilihan pertama untuk proses kloning serta ekspresi protein. Sejauh ini vektor ini dilaporkan mempunyai kemampuan ekspresi yang tinggi apabila dikombinasikan dengan sel inang *E. coli* BL21(DE3), sehingga kombinasi tersebut banyak digunakan dalam berbagai bidang biofarmasi dan industri lainnya (Hayat *et al.*, 2018). Penelitian oleh Aly *et al.*, (2020) telah berhasil mengkloning gen L-ASNase dari bakteri *Bacillus sonorensis* pada plasmid *pET28a(+)* dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3) untuk ekspresi. Kesesuaian antara vektor plasmid *pET28a(+)* yang digunakan dengan sel inang khususnya bakteri *E. coli* menjadi topik yang diangkat pada penelitian ini, oleh karena itu penelitian ini menggunakan tiga strain sel inang *E. coli* agar konstruksi plasmid *pET28a(+)* yang sudah mengandung gen *AnsB* pengkode enzim L-Asparaginase 2 dapat dikloning dan dapat digunakan sebagai penyimpanan dalam jangka waktu yang lama serta dapat diekspresikan untuk menghasilkan enzim L-Asparaginase dengan kapasitas produksi yang tinggi sehingga secara komersial enzim tersebut dapat digunakan.

Strain BL21 memiliki fungsi yang berfokus pada sistem ekspresi protein rekombinan, sedangkan strain DH5 α memiliki fungsi yang berfokus pada kloning tetapi juga dimodifikasi untuk sistem ekspresi gen. Strain DH10B juga memiliki fungsi yang berfokus pada sistem ekspresi protein rekombinan serta dapat

menyimpan plasmid dalam ukuran yang besar. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian yang berjudul “Transformasi gen *AnsB* pada plasmid *pET28a(+)* ke dalam tiga strain sel inang *Escherichia coli*” dirancang untuk mencapai target tersebut.

B. Rumusan Masalah

Apakah gen *AnsB* pengkode enzim L-asparaginase II yang berasal dari *S. plymuthica*_UBCF13 dapat diligasikan ke dalam plasmid *pET28a(+)* dan ditransformasikan ke dalam sel Inang *E. coli* strain BL21, DH5 α dan DH10B ?

C. Tujuan Penelitian

Mendapatkan sel *E. coli* rekombinan dari strain BL21, DH5 α dan DH10B yang mengandung konstruksi plasmid *pET28a(+)* dan gen *AnsB* pengkode enzim L-asparaginase II yang berasal dari *S. plymuthica*_UBCF13.

D. Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan sel *E. coli* rekombinan yang dapat digunakan sebagai bahan dasar dalam produksi massal senyawa enzim L-asparaginase II secara ekonomis.
2. Jika sistem produksi enzim L-asparaginase II dapat dibuat menjadi lebih ekonomis secara komersial, maka masyarakat akan menikmati pelayanan penanganan penyakit kanker limfoblastoma yang lebih murah.

