

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Senyawa akrilamida merupakan salah satu senyawa toksik yang umumnya ditemukan pada banyak produk pangan berbahan pati yang dihasilkan melalui proses pemanasan (Rina *et al.*, 2021). *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menetapkan akrilamida dalam golongan 2A sejak tahun 1994, yang didefinisikan sebagai golongan dengan potensi bersifat karsinogen pada manusia. Pembentukan akrilamida terjadi karena keberadaan senyawa asam amino L-asparagin yang menjadi dasar, beserta gula reduksi seperti glukosa atau fruktosa, untuk membentuk sisi antaranya. Proses terbentuknya akrilamida terjadi melalui reaksi *Maillard*. Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk mengurangi pembentukan akrilamida tersebut adalah dengan mengontrol kadar gula pereduksi dan asparagin dengan menggunakan enzim L-Asparaginase.

L-Asparaginase adalah enzim hidrolitik yang dapat memecah L-asparagin (*L-Asn*) menjadi L-asam aspartat (*L-Asp*) dengan melepaskan ammonia, sehingga dapat mencegah asparagin bereaksi dengan gula untuk membentuk akrilamida. L-Asparaginase akan menempel pada asparagin dan membentuk kompleks substrat-enzim, pembentukan kompleks ini mengakibatkan NH_2 terlepas dan membentuk NH_3 (Ammonia) bebas (Harimadi *et al.*, 2018). Ketidaktersediaan asparagin oleh karena aktivitas enzim L-Asparaginase memungkinkan akrilamida tidak terbentuk selama reaksi *Maillard*. Porto *et al.*, (2019) menyatakan bahwa penggunaan enzim L-Asparaginase mampu mencegah terbentuknya senyawa akrilamida melalui penurunan asparagin hingga 60% pada *arabica green bean*. Penelitian Onishi *et al.*, (2015) membuktikan bahwa kandungan akrilamida pada kentang goreng dapat menurun sebanyak 20% dengan pemberian L-Asparaginase.

Enzim L-Asparaginase dapat ditemukan pada hewan, tumbuhan dan mikroorganisme lainnya. Saat ini enzim L-Asparaginase diproduksi secara komersial dari dua sumber bakteri utama, yaitu *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (Muneer *et al.*, 2020). Namun penggunaan enzim tersebut memiliki efek samping seperti hipersensitifitas, thrombosis, pankreatitis dan reaksi lainnya. Hal ini menimbulkan kekhawatiran dalam penggunaan farmakologi (Osama *et al.*,

2023). Sinha *et al.*, (2013) menemukan salah satu mikroorganisme penghasil L-Asparaginase yaitu *Serratia marcescens*. Analisis *gene mining* yang dilakukan terhadap data *whole genome* bakteri *Serratia plymuthica* strain UBCF_13 oleh Fatiah *et al.*, (2021) memperlihatkan adanya gen *AnsB* yang dikenal berperan dalam biosintesis enzim L-Asparaginase type II. Upaya dalam rangka mencari sumber-sumber dan varian-varian enzim L-Asparaginase lain yang lebih efektif dan biaya produksi yang lebih layak secara komersial maka, *S. plymuthica* strain UBCF_13 menjadi salah satu pilihan yang dapat digunakan.

Produksi enzim L-Asparaginase II pada organisme asal secara alamiah biasanya dibatasi oleh potensi genetik sistem metabolisme organisme tersebut. Oleh karena itu, pendekatan non konvensional menggunakan teknik rekayasa genetika atau DNA rekombinan saat ini sering menjadi pilihan yang banyak diminati dalam bidang industri dan kesehatan. Teknik DNA rekombinan dalam implementasinya membutuhkan berbagai komponen, antara lain plasmid dan inang atau *host* (Setiani *et al.*, 2022). Plasmid diproduksi dan digunakan sebagai vektor pembawa gen target untuk kloning (Helinski, 2022). Salah satu plasmid yang sering digunakan sebagai vektor ekspresi adalah *pET28a(+)*. Al-Muhanna (2018) dalam penelitiannya berhasil mentransformasikan vektor *pET28a-HMPREF0351_11084* ke dalam *E. coli* BL21. Setelah tertransformasinya vektor yang membawa gen pengkode enzim L-asparaginase, maka perlu dilakukan analisis aktivitas enzim yang diekspresikan oleh *E. coli*.

Strategi yang dapat dilakukan untuk meningkatkan ekspresi gen pada *E. coli* salah satunya adalah penggunaan media yang sesuai (Jia *et al.*, 2021). Komponen media sangat mempengaruhi pertumbuhan bakteri dalam memproduksi enzim, seperti ketersediaan karbon, nitrogen dan lainnya. Secara umum sumber nutrisi yang dibutuhkan pada proses pertumbuhan mikroorganisme yaitu karbon, nitrogen, unsur non logam (sulfur dan fosfor), unsur logam (Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg dan Fe), vitamin, air dan mineral.

Kualitas media pertumbuhan sangat menentukan pertumbuhan bakteri dan kemampuan sel dalam memproduksi protein. Berdasarkan kandungan media, media pertumbuhan mikroorganisme terdiri atas media kompleks dan media *defined* (media yang terukur). Menurut Tao *et al.*, (1999) kandungan media yang kompleks

dengan sumber karbon dan nitrogen yang lebih tinggi akan menghasilkan tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi. Laju pertumbuhan sel bakteri meningkat sebanding dengan kualitas media pertumbuhan. Peningkatan laju pertumbuhan ini dicapai dengan peningkatan jumlah ribosom dan faktor-faktor translasi di dalam sel. Selain itu pada produksi protein, *defined media* memudahkan pengaturan nutrisi, di mana sel dapat tumbuh hingga mencapai kepadatan tinggi. Oleh karena itu, kualitas media pertumbuhan menentukan laju pertumbuhan sel. Secara keseluruhan, kualitas media sangat memengaruhi laju pertumbuhan dan komposisi sel, termasuk tingkat ekspresi gen yang terkait dengan sintesis protein.

Medium LB dan TB merupakan media kompleks. Medium LB mengandung nutrisi berupa ekstrak ragi yang berfungsi sebagai sumber karbon, sumber nitrogen organik, dan sumber vitamin yang larut dalam air. Disamping itu juga mengandung tripton yang berfungsi sebagai sumber vitamin dan asam amino, serta NaCl yang berfungsi untuk menjaga medium dalam keadaan isotonik (Nora, 2017). Nutrisi pada media TB tidak berbeda jauh dengan LB, namun pada media TB terdapat gliserol dan kalium fosfat. Gliserol yang terkandung di dalam media TB digunakan sebagai sumber karbohidrat, dan berbeda dengan glukosa, gliserol tidak difermentasi menjadi asam asetat, sehingga menghindari akumulasi produk sampingan yang toksik (Kram *et al.*, 2015). Sedangkan keberadaan kalium fosfat pada media kultur dapat membentuk sistem penyangga (*buffer*) untuk menjaga pH media tetap stabil selama pertumbuhan bakteri. Selama metabolisme oleh bakteri berlangsung maka lingkungan kultur akan menghasilkan lingkungan yang asam atau basa, dan keberadaan fosfat mencegah fluktuasi pH yang ekstrem (Kram *et al.*, 2015). Hasil penelitian Nora (2017) menyebutkan bahwa hasil kultur *E. coli* strain BL21(DE3) yang dikultivasi pada media TB memiliki laju pertumbuhan spesifik tertinggi yaitu mencapai 0,788/jam dibandingkan media DNB 0,653/jam dan LB yaitu 0,467/jam.

Defined media adalah media pertumbuhan dengan komposisi media kimia yang terkontrol sehingga mampu sebagai penginduksi protein rekombinan dalam *E. coli* pada fase pertumbuhan yang diperpanjang (peningkatan ekspresi protein). Salah satu media *defined media* adalah media M9 yang merupakan media dengan menyediakan nutrisi dalam jumlah terbatas dan terukur. Media M9 hanya

mengandung komponen esensial untuk pertumbuhan sel, sehingga bakteri harus mensintesis sendiri sebagian besar metabolitnya. Komposisi dasar media M9 meliputi garam fosfat (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) sebagai buffer pH, NaCl untuk keseimbangan osmotik, NH_4Cl sebagai sumber nitrogen, MgSO_4 dan CaCl_2 sebagai sumber ion penting, serta sumber karbon dari glukosa untuk energi dan pembentukan biomassa. Keterbatasan nutrisi dalam media dapat menginduksi aktivitas jalur metabolik alternatif (Barros *et al.*, 2020). Shafqat *et al.*, (2023) menyebutkan dalam penelitiannya, bahwa aktivitas enzim asparaginase ASN9 meningkat pada medium M9 yang dilengkapi garam kalsium. Dengan pertimbangan-pertimbangan di atas, melihat pentingnya peranan enzim L-asparaginase dilakukan penelitian untuk meningkatkan produksi Enzim L-Asparaginase dengan judul Pengaruh media kultur terhadap ekspresi Gen *AnsB* asal *Serratia plymuthica* UBCF_13 dalam konstruk vektor ekspresi *pET28a(+)* pada inang *Escherichia coli* BL21

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka dirumuskan masalah, yaitu media propagasi manakah yang dapat meningkatkan ekspresi gen *AnsB* yang dikonstruksi dalam vektor ekspresi *pET28a(+)* dan inang *E. coli* BL21?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan jenis media propagasi yang menghasilkan ekspresi gen *AnsB* yang tertinggi dalam vektor ekspresi *pET28a(+)* pada sel inang *E. coli* BL21.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi dasar dalam peningkatan produksi enzim L-Asparaginase dari *S. plymuthica* UBCF_13 dalam sistem bakteri menggunakan vektor kloning *pET28a(+)* dan sel inang *E. coli* BL21.