BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Akrilamida merupakan zat kimia padat yang dapat berpolimerisasi dengan panas, dan memiliki efek toksik pada manusia yang menjadi salah satu penyebab kanker (*probable human carcinogen*) (Rizqi, 2015). Senyawa ini dapat ditemukan pada beberapa olahan makanan tertentu seperti keripik kentang dan kentang goreng, yang dalam proses dan pembuatannya menggunakan suhu tinggi di atas 120 °C. Mekanisme utama pembentukan akrilamida melalui reaksi *Maillard*, yaitu reaksi antara gula reduksi hasil degradasi pati (karbohidrat) dengan asam amino bebas (asparagin) yang terdapat secara alami dalam bahan pangan dengan pemanasan menggunakan suhu tinggi (Visvanathan, 2014). Salah satu teknik untuk mengatasi masalah tersebut yaitu melalui penggunaan enzim L-Asparaginase.

L-Asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis asam amino L-asparagin (*L-Asn*) menjadi L-asam aspartat (*L-Asp*) dengan melepaskan amonia. Senyawa yang terbentuk dari reaksi tersebut dapat mencegah asparagin bereaksi dengan gula yang membentuk akrilamida. Penelitian yang dilakukan oleh Sinha *et al.*, (2013) melaporkan bahwa pemberian L-Asparaginase efektif dapat menurunkan kadar *L-Asp* sebesar 80-85%, prekursor akrilamida, yang dapat menyebabkan terbentuknya sel tumor dalam tubuh.

Jia *et al.* (2021) melaporkan bahwa enzim L-Asparaginase dapat dihasilkan oleh *E. coli* dan *Erwinia chrysanthemi*. Akan tetapi, L-Asparaginase yang berasal dari mikroorganisme tersebut masih memiliki kekurangan, antara lain masih memiliki aktivitas dan stabilitas yang rendah. Oleh karena itu masih diperlukan penemuan sumber-sumber mikroorganisme lain sebagai penghasil L-Asparaginase yang diharapkan lebih efektif untuk kebutuhan industri pangan dan farmasi. Salah satu mikroorganisme yang dapat dimanfaatkan yaitu *Serratia plymuthica*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fatiah *et al.*, (2021) dilaporkan bahwa anotasi genom lengkap dari *S. plymuthica* strain UBCF_13 menemukan potensinya dalam menghasilkan L-Asparaginase II, membuka peluang pemanfaatan bakteri ini sebagai sumber enzim baru. Namun produksi

alaminya sering terbatas akibat regulasi genetik dan kondisi lingkungan yang tidak optimal, sehingga diperlukan teknik DNA rekombinan melalui kloning gen *AnsB* ke dalam vektor ekspresi dan inang menjadi solusi untuk meningkatkan produksi enzim. Teknik DNA rekombinan, dapat membuat enzim L-Asparaginase II diproduksi dalam jumlah besar dan lebih baik terhadap kondisi produksi sehingga menghasilkan produk dengan konsistensi yang tinggi (Mahajan *et al.*, 2012).

Teknologi DNA rekombinan membutuhkan plasmid dan sel inang dalam prosesnya. Plasmid *pET28a(+)* adalah vektor ekspresi yang banyak digunakan karena dilengkapi dengan promotor T7 yang kuat, sehingga memungkinkan produksi protein rekombinan dalam jumlah besar (Sumirasih, 2018). *Escherichia coli* BL21 sering dipilih sebagai inang karena kemampuannya yang tinggi dalam mengekspresikan protein asing dan pertumbuhannya yang cepat (Brock, 2004). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Oktapan *et al.*, (2023) menunjukkan berhasilnya transformasi gen *wee1* pada plasmid *pET28a(+)* ke dalam sel inang *E. coli* BL21 (DE3). Namun ekspresi dan aktivitas enzim L-Asparaginase sangat dipengaruhi oleh kondisi kultur, termasuk pH media.

pH media merupakan salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri, hal ini mempengaruhi tinggi rendahnya densitas bakteri yang dihasilkan. pH media berkaitan dengan aktivitas enzim yang dibutuhkan oleh bakteri untuk mengkatalis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Apabila pH dalam suatu media atau lingkungan tidak optimal maka akan mengganggu kerja enzim-enzim tersebut dan akhirnya mengganggu pertumbuhan bakteri itu sendiri. Selain itu, setiap enzim memiliki pH optimum tertentu yang memungkinkan sisi aktifnya tetap stabil dan mampu mengikat substrat dengan baik (Suriani *et al.*, 2013).

Setiap spesies bakteri memiliki kisaran pH optimum, minimum, dan maksimum untuk pertumbuhannya. Pada pH asam pertumbuhan bakteri dapat terhambat sehingga menyebabkan kematian sel (bakterisidal). Kematian ini terjadi karena pH asam mengganggu hampir semua struktur tiga dimensi enzim yang menyebabkan denaturasi. Kelebihan ion H^+ dari lingkungan asam akan mengganggu keseimbangan muatan ini. Ion H^+ akan berikatan dengan gugus

amino (NH_2) dan karboksil (COO^-) pada protein, menghancurkan ikatan yang menjaga struktur protein. Akibatnya protein kehilangan bentuk aslinya (mengalami denaturasi). Enzim yang terdenaturasi menjadi tidak aktif dan tidak dapat lagi mengkatalisis reaksi metabolisme (Baker *et al.*, 2007).

Pada pH netral, muatan pada residu asam amino (seperti gugus karboksilat [COO^-] dan amina [NH_3^+]) berada dalam keadaan seimbang. Muatan ini mempertahankan struktur tiga dimensi dari enzim dan protein yang terlibat dalam memperbanyak materi genetik untuk pembelahan sel. Kemudian dapat mensintesis protein dengan baik, sehingga semua enzim dapat bekerja dengan seimbang dan sel tumbuh serta membelah dengan baik. Selain itu pH netral memungkinkan sel menjaga gradien proton yang tepat di membran. Nutrisi diimpor dengan laju cepat, mendukung untuk pertumbuhan eksponensial pada bakteri. Pada pH netral, gugus-gugus asam amino ini berada dalam status ionisasi (muatan) yang tepat untuk mengikat substrat, menjaga konformasi struktur tiga dimensi enzim dan melakukan katalisis reaksi kimia (Krulwich *et al.*, 2011).

Pada pH basa, gugus-gugus tertentu pada situs aktif enzim (misalnya, gugus imidazol pada histidin atau gugus amino pada lisin) akan berada dalam keadaan terdeprotonasi (kehilangan H^+) yang tepat. Status terdeprotonasi inilah yang justru merupakan bentuk katalitik yang aktif untuk memecah ikatan pada substrat. Jika pH turun (asam), gugus ini akan menerima proton (H^+), muatannya berubah, dan bentuknya menjadi tidak aktif. Kemudian pada pH basa ini interaksi ionik dan hidrofobik yang menahan lipatan protein berada dalam keadaan paling stabil (Sun *et al.*, 2019).

Enzim L-Asparaginase memiliki rentang pH optimum pada pH 5-9. Berdasarkan penelitian Arivo dan Annissatussholeha, (2017) diperoleh hasil bahwa nilai absorbansi dari kultur bakteri *E. coli* BL21 menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi pada pH 7 dan 9 yaitu sebesar 0,420 dan 0,428 dibandingkan pH 5 dengan nilai 0,251. Hal ini sejalan dengan pendapat Wati, (2018) yang menyatakan peningkatan kepadatan bakteri dalam suatu kultur atau lingkungan akan meningkatkan produksi enzim, karena lebih banyak sel bakteri berarti lebih banyak potensi untuk memproduksi enzim tersebut. Oleh karena itu, dilakukan pengujian pada pH 5, 7, dan 9 untuk mengetahui pengaruh lingkungan

asam, netral, dan basa terhadap kinerja enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* UBCF_13 pada sel inang *E. coli* BL21. Ketiga nilai pH tersebut dipilih karena mewakili rentang kondisi fisiologis yang umum, serta memungkinkan identifikasi pH optimum dan stabilitas enzim pada berbagai lingkungan.

Berdasarkan uraian diatas telah dilakukan penelitian dengan judul “Aktivitas enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* strain UBCF_13 yang dikloning dalam plasmid *pET28a(+)* dan inang *E. coli* BL21 pada tiga level pH media”. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dasar terkait upaya produksi dan penggunaan enzim L-Asparaginase II yang berasal dari *S. plymuthica* strain UBCF_13 yang dikloning dalam plasmid *pET28a(+)* dan sel *E. coli* BL21.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

Bagaimana aktivitas enzim L-Asparaginase II yang diekspresikan gen *AnsB* asal *S. plymuthica* strain UBCF_13 yang telah dikloning dalam vektor *pET28a(+)* dan sel inang *E. coli* BL21 pada pH media 5, 7 dan 9?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pH yang sesuai dalam meningkatkan aktivitas enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* strain UBCF_13 yang telah dikloning dalam vektor *pET28a(+)* menggunakan sel inang *E. coli* BL21 pada pH 5, 7 dan 9.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai informasi dasar dalam memproduksi enzim L-Asparaginase II yang berasal dari *S. plymuthica* UBCF_13 menggunakan sistem vektor *pET28a(+)* dan sel inang *E. coli* BL21. Penelitian ini dalam jangka panjang diharapkan dapat menghasilkan teknologi produksi enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* strain UBCF_13 yang efisien dalam skala industri.