

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Akrilamida merupakan senyawa yang terbentuk dari pemanasan pada suhu tinggi pada produk yang mengandung karbohidrat atau pati. Berbagai bahan pangan yang mengandung pati sering diolah melalui proses penggorengan atau pemanggangan pada suhu tinggi di atas 120 °C seperti keripik dan kentang goreng yang dapat memicu terbentuknya senyawa akrilamida (Krishnakumar dan Visvanathan, 2014). Akrilamida diklasifikasikan sebagai karsinogen bagi manusia oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) yang dapat memicu terjadinya kanker serta berpotensi menjadi *neurotoxic* yang menyebabkan keracunan pada syaraf serta kerusakan pada sistem reproduksi (CDC, 2016; Nabih, 2021). Pembentukan senyawa ini terjadi akibat terbentuknya reaksi maillard antara gula reduksi hasil degradasi pati (karbohidrat, glukosa dan fruktosa) dengan asam amino bebas (asparagin). Salah satu cara mengurangi pembentukan akrilamida dapat dilakukan dengan mengontrol gula pereduksi dan asparagin yang terdapat dalam olahan bahan pangan dengan pemberian enzim L-Asparaginase.

Enzim L-Asparaginase merupakan enzim yang dapat mencegah pembentukan akrilamida dengan memecah L-Asparagin (L-Asn) menjadi L-Aspartat (L-Asp) dan melepaskan ammonia (Al-Dulimi *et al.*, 2020). Proses tersebut mencegah asparagin berinteraksi dengan gula untuk membentuk akrilamida. Dengan demikian, L-Asparaginase dapat menurunkan tingkat L-Asp, prekursor akrilamida yang dapat menyebabkan kanker dalam tubuh. Penelitian Onishi *et al.* (2015) menunjukkan bahwa penggunaan L-Asparaginase terbukti dapat menurunkan 20% kadar akrilamida pada keripik kentang goreng. Penelitian lainnya oleh Hendriksen *et al.* (2013) telah terbukti bahwa L-Asparaginase dapat menurunkan akrilamida hingga 70% sampai 80% pada kopi dan juga bisa mencapai 90% pada *tortilla chips*.

L-Asparaginase juga merupakan enzim terapeutik yang digunakan terutama dalam pengobatan kanker jenis Leukemia Limfoblastik Akut (ALL).

ALL adalah kasus leukemia yang terutama menyerang sekitar 80% pada masa kanak-kanak dan 20% leukemia pada orang dewasa (Safary *et al.*, 2019; Shrivastava *et al.*, 2016). L-Asparagin merupakan salah satu komponen nutrisi bagi sel kanker, dengan pemberian L-Asparaginase dapat menguraikan L-Asparagin sehingga menghambat pertumbuhan sel-sel kanker, yang akhirnya menyebabkan kematian sel kanker (Tripathy *et al.*, 2024).

Enzim L-Asparaginase terdiri dari dua jenis, yaitu enzim L-Asparaginase tipe I dan enzim L-Asparaginase tipe II. Enzim L-Asparaginase tipe I merupakan enzim sitoplasma yang memiliki afinitas yang lebih rendah terhadap substrat L-Asparagin, sedangkan enzim L-Asparaginase tipe II adalah enzim periplasma memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat L-Asparagin (Qeshmi *et al.*, 2018). L-Asparaginase tipe II lebih banyak digunakan dibanding tipe I karena aktivitas optimal enzim pada tingkat pH yang lebih tinggi (pH 7,5-9) dan kemampuannya untuk mempertahankan aktivitas dalam berbagai kondisi dapat digunakan untuk aplikasi industri makanan (Arredondo-Nuñez *et al.*, 2023).

L-Asparaginase terapeutik komersial saat ini berasal dari *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi*. Namun, L-asparaginase yang tersedia memiliki efek samping seperti reaksi imunogenik dan alergi (De Melo *et al.*, 2023). Untuk meminimalkan efek samping beberapa alternatif telah dilakukan seperti pencarian L-Asparaginase dari sumber yang berbeda.

L-Asparaginase dapat ditemukan dari berbagai jenis bakteri, fungi dan mikroba lainnya yang terutama berasal dari *E. coli*, *Lactobacillus casei*, dan *E. chrysanthemi* (Darvishi *et al.*, 2022). Mikroba dipilih sebagai sumber L-Asparaginase karena menawarkan sumber daya tinggi sebagai agen terapeutik serta memiliki signifikansi komersial karena sifatnya yang sangat efisien dan murah sehingga mampu memfasilitasi produksi skala industri (Chand *et al.*, 2020). Mikroba yang menghasilkan L-Asparaginase diisolasi dari lingkungan yang melimpah seperti tanah, air, sedimen laut, sedimen sungai, lumut dan tanaman. *Serratia plymuthica* UBCF_13 merupakan salah satu koleksi bakteri di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Bakteri ini diisolasi dari daun *Brassica juncea* L. di Kabupaten Solok, Sumatera Barat. Sekuensing genom lengkap dari *S. plymuthica* UBCF_13 telah dilakukan dan

berhasil mengklasifikasikan total 5.056 gen, termasuk gen *AnsB* yang mengkode enzim L-Aparaginase II (Fatiah *et al.*, 2021).

Enzim L-Asparaginase biasanya tidak diproduksi dalam jumlah yang banyak pada organisme asal, sehingga diperlukan upaya untuk meningkatkan produksinya. Dalam penelitian ini, dilakukan upaya untuk mengkloning gen *AnsB* yang mengkode produksi L-Asparaginase dari *S. plymuthica* UBCF_13 ke dalam inang bakteri lain untuk meningkatkan produksi enzimnya menggunakan teknik DNA rekombinan. Teknik ini membutuhkan vektor (plasmid) dan sel inang (*host*) yang sesuai untuk memaksimalkan produksi L-Asparaginase (Englaender *et al.*, 2017; Syafira dan Rostinawati, 2019). Penggunaan bakteri *E. coli* sebagai sel inang paling banyak digunakan, karena mudah dikulturkan, genomnya mudah dimanipulasi, dan mampu bereplikasi dalam waktu yang singkat sehingga mampu menghasilkan protein dalam jumlah besar (Kante *et al.*, 2018).

Plasmid (vektor) akan digunakan sebagai pembawa gen target dalam sel inang (*host*) agar dapat diperbanyak. Plasmid secara umum memiliki elemen genetik berupa daerah *origin of replication* (ORI) sebagai titik awal replikasi untuk perbanyakannya di dalam sel inang, marker seleksi (*selectable marker*) berfungsi untuk proses seleksi dan identifikasi bakteri rekombinan yang berupa gen resistensi antibiotik tertentu, gen pelapor (*reporter gene*) yang dapat memberikan sifat fenotip tertentu yang dapat dilihat secara fisik (Dewan dan Uecker, 2023). Selain itu juga mempunyai sisi kloning (*multiple cloning site*) sebagai daerah penyisipan gen target yang mana terdapat sisi pengenalan enzim restriksi tertentu untuk memudahkan proses penyisipan gen target, dan promotor sebagai daerah penempelan RNA polymerase untuk mengawali proses ekspresi gen (Maksum *et al.*, 2017). Kemampuan plasmid untuk melakukan replikasi sehingga menghasilkan sejumlah molekul tertentu (*plasmid copy number*) ditentukan oleh jenis ORI yang dimilikinya (Węgrzyn, 1999). Plasmid yang banyak digunakan dalam teknik DNA rekombinan seperti *pGEM-T Easy* dan *pET28a(+)*.

Plasmid *pGEM-T Easy* merupakan suatu vektor linear yang berukuran 3015 bp, dan memiliki gen resisten terhadap ampisilin, ada tambahan nukleotida T pada kedua ujung 3' atau ujung *T-overhang* yang meningkatkan efisiensi ligasi

(Saadoun *et al.*, 2023). Sekuens plasmid ini juga memiliki daerah promotor T7 dan SP6 yang mengapit *cloning site*. Pada penentuan keberhasilan transformasi bakteri rekombinan dapat menggunakan metode *blue-white selection* karena dilengkapi dengan gen pelapor yaitu *LacZ*. Plasmid *pGEM-T Easy* merupakan vektor yang memiliki kemampuan duplikasi yang tinggi (*high copy number*) untuk mendapatkan salinan gen target dalam jumlah banyak. Sehingga diasumsikan akan menghasilkan ekspresi gen yang banyak pula. Sejalan dengan Togna *et al.* (1993) yang menyatakan dengan adanya peningkatan jumlah salinan plasmid dapat meningkatkan produksi dan ekspresi gen target.

Plasmid lainnya yaitu *pET28a(+)* merupakan vektor yang biasa digunakan dalam mengekspresikan gen target dan produksi enzim rekombinan. Plasmid ini berukuran 5369 bp serta memiliki gen ketahanan untuk kanamisin (Novagen, 2011). Plasmid *pET28a(+)* memiliki promotor T7 dan terminator T7 yang dikenali oleh RNA polymerase T7 pada sel inang yang memungkinkan ekspresi gen target yang tinggi, memiliki sisi pengikatan ribosom (*ribosomal binding site/RBS*) untuk proses translasi. Selain itu juga dilengkapi dengan *poly-histidine purification tag* (His 6) dan *thrombin protease recognition site* (TPS) yang berguna untuk mempermudah proses pemurnian (Shilling *et al.*, 2020).

Uji aktivitas enzim dilakukan untuk melihat apakah ada peningkatan produksi enzim L-Asparaginase II setelah dilakukannya kloning. Prinsip uji aktivitas enzim adalah mengukur kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi kimia dengan mengukur jumlah produk yang terbentuk atau menghitung jumlah pengurangan substrat dalam satuan waktu tertentu (Muliasari dan Permatasari, 2022). Uji aktivitas enzim biasanya menggunakan metode spektrofotometri untuk mengukur perubahan warna yang disebabkan oleh reaksi enzimatik. Pada enzim L-Asparaginase II, uji aktivitas dilakukan menggunakan metode *direct nesslerization*. Metode ini mengukur kadar amonia sebagai produk yang dihasilkan setelah mereaksikan enzim dengan substrat dan buffer kemudian diinkubasi pada waktu tertentu. Perubahan warna larutan menjadi kuning hingga oranye menandakan adanya amonia pada sampel dan diukur menggunakan spektrofotometer. Amonia yang dihasilkan terbentuk dihasilkan dari penguraian

L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia oleh L-Asparaginase ketika direaksikan dengan reagen Nessler (Alamsyah, 2017).

Berdasarkan uraian diatas dilakukan penelitian untuk mendapatkan plasmid yang sesuai untuk meningkatkan produksi enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* UBCF_13 menggunakan inang *E. coli* BL21.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu, apakah produksi enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* UBCF_13 dapat ditingkatkan menggunakan plasmid *pET28a(+)* atau *pGEM-T Easy* di dalam sel inang *E. coli* BL21?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan plasmid yang paling efektif untuk meningkatkan produksi enzim L-Asparaginase II asal *S. plymuthica* UBCF_13 dalam sel inang *E. coli* BL21.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar dalam memproduksi enzim L-Asparaginase dari *S. plymuthica* UBCF_13 dalam skala produksi komersial yang lebih murah menggunakan sel inang *E. coli* BL21.

