

# BAB I. PENDAHULUAN

## A. Latar Belakang

Tanaman pangan memiliki peranan penting bagi Indonesia mengingat tingginya konsumsi produk pangan oleh masyarakat. Proses pengolahan produk pangan sering kali melalui penggorengan dan pemanggangan yang berpotensi membentuk senyawa berbahaya yaitu akrilamida. Bahan pangan populer yang memiliki kadar karbohidrat tinggi seperti kentang, singkong dan umbi-umbian lainnya merupakan bahan pangan yang paling rentan membentuk akrilamida selama proses pengolahan dengan suhu tinggi. Senyawa ini terbentuk melalui reaksi antara asam amino asparagin dan gula pereduksi pada suhu tinggi (Harimadi *et al.*, 2018). Walaupun reaksi tersebut memberikan warna dan aroma yang diinginkan pada makanan, kehadiran akrilamida menjadi perhatian karena dampaknya terhadap kesehatan.

Akrilamida termasuk kontaminan pangan yang bersifat karsinogenik dan genotoksik (WHO, 2011). Hasil uji, senyawa ini terbukti menyebabkan kerusakan saraf dan pembentukan tumor di beberapa organ pada hewan uji. Akrilamida dalam tubuh dapat dimetabolisme menjadi glisidamida, senyawa reaktif yang dapat berikatan kovalen dengan basa DNA (*DNA adducts*). Pembentukan *DNA adducts* ini dapat mengganggu stabilitas genetik, menimbulkan mutasi dan pada akhirnya berpotensi memicu kanker (Zhivagui *et al.*, 2019). Oleh karena itu, berbagai upaya telah dikembangkan untuk menurunkan kadar akrilamida dalam produk pangan. Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah pemanfaatan teknologi biologi molekuler, khususnya menggunakan enzim L-asparaginase II yang dapat menghambat pembentukannya sejak tahap awal.

L-Asparaginase II memiliki cara kerja dengan menghidrolisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia sehingga mengurangi pembentukan akrilamida selama proses pengolahan makanan. Penggunaan L-asparaginase II dalam produk pangan tidak hanya dapat meningkatkan keamanan makanan, tetapi juga memberikan manfaat kesehatan tambahan dengan mengurangi risiko paparan terhadap senyawa berbahaya (Jia *et al.*, 2021). Perlakuan awal dengan L-asparaginase telah terbukti mampu menurunkan kadar akrilamida lebih dari 80%

pada berbagai produk pangan, termasuk keripik kentang, kentang goreng dan produk berbasis tepung (Jana *et al.*, 2024).

Enzim L-asparaginase tipe II dikode oleh gen *ansB* dan secara luas ditemukan pada bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli* dan *Erwinia chrysanthemi* (Batool *et al.*, 2016). Pemilihan sumber gen *ansB* dalam produksi enzim L-asparaginase perlu mempertimbangkan aspek keamanan, kestabilan enzim, dan efektivitas ekspresi. Enzim L-asparaginase yang berasal dari *E. coli* dan *E. chrysanthemi* memang telah banyak digunakan secara klinis, namun keduanya memiliki keterbatasan untuk aplikasi pangan karena diketahui memicu efek samping imunogenik serta aktivitas samping glutaminase yang dapat menyebabkan toksisitas (Krishnapura *et al.*, 2015; Pokrovskaya *et al.*, 2022). Oleh karena itu, pencarian alternatif sumber gen *ansB* yang lebih aman dan efisien menjadi penting.

Studi yang dilakukan oleh Aisyah *et al.*, (2017) berhasil mengidentifikasi isolat bakteri *Serratia plymuthica* UBCF\_13 dari tanaman sawi (*Brassica juncea* L.) yang diisolasi pada tahun 2012 di Kabupaten Solok, Sumatera Barat, Indonesia. Berdasarkan data sekuens *whole genome* dalam basis NCBI, *S. plymuthica* UBCF\_13 diketahui memiliki kemampuan menghasilkan L-asparaginase II, yang ditunjukkan oleh keberadaan gen *ansB*. Isolat ini berpotensi sebagai sumber gen *ansB* yang sejauh ini masih relatif belum banyak dieksplorasi. Salah satu pendekatan untuk meningkatkan produksi L-asparaginase II secara rekombinan dari *S. plymuthica* UBCF\_13 adalah melalui teknik kloning gen.

Kloning gen merupakan suatu metode dalam rekayasa genetika yang bertujuan untuk menggandakan gen atau urutan DNA tertentu secara identik dan dimasukkan ke dalam vektor kloning, seperti plasmid (Poloroso *et al.*, 2024). Dalam produksi enzim secara rekombinan, plasmid memegang peranan penting karena memungkinkan gen target masuk ke sel inang untuk diekspresikan. Selain plasmid, pemilihan sel inang (*host*) ekspresi juga akan mempengaruhi hasil produksi enzim yang diharapkan. Sistem ekspresi berbasis plasmid pET-28a(+) pada *E. coli* strain BL21 sebagai *host* ekspresi merupakan salah satu sistem yang paling banyak digunakan karena efisien dan mudah dimodifikasi.

Produksi protein rekombinan sangat diharapkan memiliki hasil yang bagus, untuk itu diperlukan strategi khusus guna mengoptimalkan hasil produksi protein

rekombinan salah satunya adalah promotor sintetik sebagai komponen regulator dalam ekspresi gen. Promotor merupakan elemen pengendali utama dalam DNA yang berfungsi sebagai pengatur awal transkripsi suatu gen. Dalam penelitian ini digunakan promotor sintetik karena dirancang secara khusus agar mampu memberikan tingkat ekspresi gen yang lebih tinggi dan stabil.

Studi terbaru menunjukkan potensi promotor sintetik dalam meningkatkan ekspresi protein pada *Saccharomyces cerevisiae*. Deng *et al.*, (2021) berhasil mengembangkan promotor GAL sintetik dengan kekuatan dua kali lipat dibandingkan promotor GAL1 alami melalui manipulasi urutan pengaktif hulu (*upstream activating sequence*, UAS) dan promotor inti. Sebelumnya, Blazeck *et al.*, (2012) merancang promotor hibrida yang mampu meningkatkan kapasitas transkripsi promotor GPD hingga 2,5 kali lipat dan promotor GAL1 sebesar 15%. Aliya., (2025) telah melaporkan bahwa promotor sintetik pSSPM3 berhasil diligasikan ke dalam plasmid pET-28a(+) dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* strain BL21 sebagai *host* ekspresi. Namun, tingkat produksi enzim yang dihasilkan masih relatif rendah. Berbagai penelitian tersebut menunjukkan bahwa modifikasi pada promotor sintetik dapat mempengaruhi aktivitas promotor, yang diharapkan dapat meningkatkan produksi protein. Meningkatnya hasil produksi ini berpotensi menurunkan biaya produksi secara keseluruhan, sehingga produk yang dihasilkan menjadi lebih ekonomis dibandingkan produk komersial sejenis.

Promotor sintetik pSSPM1 yang digunakan dalam penelitian ini dikembangkan oleh tim penelitian sebelumnya dan dirancang secara teoritis untuk mendukung ekspresi gen *ansB*. Perancangan promotor sintetik pSSPM1 dilakukan dengan mengidentifikasi promotor alami beraktivitas tinggi, kemudian membuat *promoter library* melalui modifikasi elemen penting seperti daerah  $-35$ ,  $-10$ , *spacer*, dan *Ribosome Binding Site* (RBS). Variasi sekuens yang dihasilkan dianalisis secara *in silico*, misalnya menggunakan pendekatan *Position Weight Matrix* (PWM), untuk memperkirakan kekuatan interaksinya dengan RNA polimerase sebelum dilakukan pengujian aktivitas transkripsinya. Dalam penelitian ini, promotor pSSPM1 digunakan untuk dimasukkan ke plasmid rekombinan sebagai elemen transkripsi dalam vektor ekspresi, sehingga plasmid dapat disusun sebagai persiapan untuk penelitian lanjutan

Melalui tahapan tersebut diperoleh pSSPM1, yang dalam penelitian ini digunakan untuk mengontrol ekspresi gen *ansB* dari *S. plymuthica* UBCF\_13. Berdasarkan uraian, maka penelitian berjudul “Fusi Promotor Sintetik pSSPM1 dengan Gen *Ansb* dari *S. Plymuthica* UBCF\_13 Ke Dalam Plasmid Pet-28a(+)” dirancang untuk mencapai tujuan tersebut.

## **B. Rumusan Masalah**

Apakah promotor sintetik pSSPM1 dapat dikloning ke dalam konstruksi plasmid rekombinan pET-28a(+) yang telah disisipkan gen *ansB* dan ditransformasikan *E. coli* BL21 ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Mendapatkan konstruksi plasmid pET-28a(+) promotor sintetik pSSPM1 dengan gen *ansB* dari *S. plymuthica* UBCF\_13 yang ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21.

## **D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan kontribusi ilmiah dalam bidang bioteknologi molekuler melalui keberhasilan konstruksi plasmid rekombinan yang membawa gen *ansB* dari isolat lokal *S. plymuthica* UBCF\_13 dengan menggunakan promotor sintetik pSSPM1.
2. Menyediakan parameter teknis dan validasi molekuler pada tahap kloning gen *ansB*, meliputi proses ligasi, transformasi, serta konfirmasi keberadaan gen target dalam vektor rekombinan.
3. Menjadi dasar awal bagi penelitian lanjutan dalam pengembangan sistem ekspresi gen *ansB* dan produksi enzim L-asparaginase II berbasis rekayasa genetika.