

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Perkembangan bioteknologi di Indonesia masih menghadapi berbagai kendala struktural dan institusional, salah satunya terkait dengan rendahnya alokasi dana riset dari sektor pemerintah maupun swasta. Putera *et al.* (2022) menyebutkan bahwa sistem inovasi nasional Indonesia belum mampu menciptakan siklus berkelanjutan antara pendanaan, pengembangan sumber daya manusia, dan infrastruktur riset yang memadai. Lemahnya dukungan kebijakan terhadap pengembangan kapasitas sumber daya manusia dan fasilitas riset sangat mempengaruhi produktivitas ilmiah dan hilirisasi hasil riset (Sukara *et al.*, 2014). Selain itu, minimnya partisipasi publik dalam perumusan kebijakan bioteknologi, seperti yang disebutkan oleh Buchori *et al.* (2005), menyebabkan kebijakan tersebut kurang responsif terhadap kebutuhan sosial ekonomi lokal. Kondisi ini menjadi hambatan dalam pengembangan serta pemasaran produk bioteknologi di tingkat nasional.

Dampak dari lemahnya ekosistem riset tersebut terlihat pada tingginya ketergantungan Indonesia terhadap produk impor, termasuk dalam sektor alat kesehatan. Data Kementerian Kesehatan (2022) menunjukkan bahwa sekitar 86% alat kesehatan yang beredar di Indonesia merupakan produk impor. Laporan dari International Trade Administration (2021) bahkan mencatat bahwa nilai pasar alat kesehatan Indonesia mencapai USD 3,586 juta, dengan total impor sebesar USD 2,633 juta atau sekitar 94% dari keseluruhan nilai pasar (Ahsan *et al.*, 2023). Hingga tahun 2023, tantangan dalam mewujudkan kemandirian alat kesehatan domestik masih signifikan. Dari total belanja alat kesehatan nasional sebesar Rp. 24 triliun, hanya sekitar 32% atau Rp7,7 triliun yang dialokasikan untuk produk dalam negeri. Ketergantungan ini menunjukkan bahwa industri alat kesehatan nasional masih didominasi

oleh teknologi rendah hingga menengah, sehingga belum mampu memenuhi kebutuhan pasar secara mandiri. Oleh karena itu, penguatan riset dan inovasi menjadi hal yang mendesak untuk meningkatkan kapasitas produksi nasional (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2023).

Reagen PCR merupakan contoh nyata dari produk bioteknologi yang masih sangat bergantung pada impor. Kebutuhan terhadap reagen ini, khususnya dalam uji diagnostik molekuler seperti RT-PCR terus meningkat. Namun, sebagian besar produk yang tersedia di Indonesia berasal dari luar negeri dengan harga yang tinggi dan waktu pengadaan yang tidak efisien. Berdasarkan hal tersebut, pengembangan produk lokal seperti reagen PCR menjadi langkah strategis untuk menekan biaya, mempercepat distribusi, dan memperkuat kesiapsiagaan nasional dalam menghadapi tantangan kesehatan di masa depan, termasuk potensi pandemi (El Zowalaty *et al.*, 2020).

Enzim reverse transcriptase (RT) merupakan komponen utama dalam reagen PCR, dengan fungsi utama mengubah RNA menjadi cDNA sebagai tahapan awal dalam reaksi RT-PCR. Produksi enzim RT secara lokal tidak hanya dapat memperkuat ekosistem riset dan industri bioteknologi nasional, tetapi juga menjadi upaya nyata dalam mendorong kemandirian teknologi dan mengurangi ketergantungan terhadap produk luar negeri.

Kontribusi enzim ini menjadi sangat signifikan selama masa pandemi COVID-19, khususnya dalam deteksi virus SARS-CoV-2 melalui metode RT-PCR. Selain itu, enzim ini juga memiliki kontribusi penting dalam memahami regulasi seluler dan berbagai aplikasi di bidang biomedis. Kombinasi antara enzim reverse transcriptase dan teknik PCR merupakan metode standar emas (*gold standard*) dalam deteksi virus, karena memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi serta waktu deteksi yang relatif cepat (Tahamtan and Ardebili, 2020). Dengan demikian, RT memiliki posisi sentral dalam kemajuan penelitian di bidang

biologi molekuler, genetika, dan ilmu biomedis (Hizi and Herschhorn, 2007).

Upaya dalam mengurangi ketergantungan terhadap enzim RT impor, pengembangan RT rekombinan terus menjadi fokus banyak penelitian. Beberapa jenis enzim RT telah digunakan secara luas, antara lain berasal dari virus HIV-1, *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV) dan *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV). RT dari AMV bekerja pada suhu tinggi (42–65 °C) dan cocok untuk RNA yang memiliki struktur kompleks, tetapi memiliki *fidelity* rendah, aktivitas RNase H tinggi, serta struktur heterotetramerik yang menyulitkan produksi rekombinan (Baranauskas *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). RT dari HIV-1 memiliki stabilitas suhu baik dan struktur heterodimerik, tetapi tetap menunjukkan *fidelity* sedang hingga rendah dan aktivitas RNase H tinggi, yang berisiko menurunkan kualitas cDNA (Hu and Hughes., 2012).

*Moloney Murine Leukemia Virus* memiliki sejumlah keunggulan yang menjadikannya pilihan utama untuk penelitian ini. Enzim ini bersifat monomerik, memudahkan ekspresi dan pemurniannya dalam sistem prokariot seperti *E. coli*. Enzim ini bekerja optimal pada suhu 37–42 °C, memiliki *fidelity* tinggi, serta aktivitas RNase H rendah, sehingga lebih efisien dalam sintesis cDNA panjang dan stabil dalam aplikasi RT-PCR (Arezi and Hogrefe, 2009). Selain itu, MMLV-RT telah banyak dikembangkan melalui rekayasa protein untuk meningkatkan stabilitas termal dan efisiensi reaksi, menjadikannya enzim pilihan dalam berbagai aplikasi RT-PCR dan kit diagnostik komersial (Zheng *et al.*, 2014). Berdasarkan keunggulan tersebut, MMLV-RT menjadi salah satu sumber RT yang akan digunakan dalam penelitian ini.

*Moloney Murine Leukemia Virus* berasal dari genus Gammaretrovirus dalam famili Retroviridae. Genom virus ini terdiri dari empat gen utama yaitu gag, pol, pro, dan env. Gen pol yang berperan penting karena mengode dua enzim vital yaitu RT dan integrase. Gen pol

MMLV memiliki panjang sekitar 3.596 bp (NCBI, 2025) dan diekspresikan sebagai poliprotein prekursor gag-pol, yang kemudian diproses oleh protease virus menjadi protein struktural dan enzim aktif, termasuk RT dan integrase (Goff, 1990). Enzim RT bekerja dengan mengubah RNA genom virus menjadi DNA untai ganda melalui proses transkripsi balik, yaitu membalik arah transkripsi normal dari DNA ke RNA menjadi sebaliknya, RNA ke cDNA (Rifkind and Freeman 2005). Sedangkan, enzim integrase berperan menyisipkan DNA virus ke dalam kromosom sel inang (Freed, 1997).

Pada bioteknologi modern, enzim RT dapat diproduksi secara rekombinan menggunakan teknologi DNA rekombinan. *E. coli* menjadi sistem inang yang banyak digunakan karena memiliki kelebihan di antaranya media pertumbuhannya murah, pertumbuhannya cepat, kondisi pertumbuhan yang sederhana, dan laju ekspresi protein yang tinggi (Hayat *et al.*, 2018). Khususnya *E. coli* BL21(DE3) yang banyak digunakan karena memiliki tingkat protease yang lebih rendah akibat defisiensi gen Lon (sitoplasma) dan OmpT (membran luar), sehingga dapat meningkatkan kestabilan protein hasil ekspresi (Rosano and Ceccarelli, 2014).

Ekspresi protein pada *E. coli* dapat dilakukan secara intraselular maupun ekstraselular (Maksum *et al.*, 2017; Silaban *et al.*, 2019). Ekspresi secara intraselular biasanya menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah besar, meskipun berisiko membentuk *inclusion bodies*. Su *et al.*, (2006) menyatakan bahwa ekspresi protein secara ekstraselular lebih rendah dibandingkan ekspresi secara intraselular. Oleh karena itu, ekspresi intraselular dapat dijadikan salah satu upaya untuk meningkatkan ekspresi protein rekombinan. Untuk mengoptimalkan ekspresi, diperlukan penyesuaian parameter yang memengaruhi sistem ekspresi protein rekombinan pada *E. coli*, salah satunya adalah induksi IPTG (Choi and Geletu, 2018).

Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranosida (IPTG) adalah analog dari allolaktosa yaitu senyawa yang secara alami menginduksi ekspresi gen dengan cara melepaskan represor dari operon lac. IPTG banyak digunakan dalam sistem ekspresi *E. coli* karena mampu menginduksi ekspresi gen secara stabil tanpa dimetabolisme oleh sel (Silaban *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian Manzur *et al.* (2006), konsentrasi 1 mM IPTG digunakan untuk induksi dan menguji berbagai durasi inkubasi untuk optimasi ekspresi. Dalam paten CN104250642A, diuraikan metode ekspresi rekombinan reverse transcriptase dari *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV-RT) dalam *E. coli* dengan penggunaan IPTG sebagai inducer. Menurut paten tersebut, ekspresi MMLV-RT diinduksi dengan IPTG pada konsentrasi 1mM setelah fase pertumbuhan sel mencapai densitas tertentu untuk memastikan aktivasi promotor T7 dan ekspresi protein target (CN104250642A, 2014).

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengekspresikan MMLV-RT di *E. coli* dengan berbagai vektor dan pendekatan. Penelitian yang dilakukan oleh Manzur *et al.* (2006) berhasil mengekspresikan vektor yang mengandung sekuen MMLV dan penanda seleksi untuk kloramfenikol dan kanamisin, dimana hasil dari ekspresi MMLV (65 kDa) menunjukkan *over expression* baik pada fraksi terlarut (supernatan) maupun pada *inclusion bodies*, dengan *yield* yang lebih tinggi diperoleh dari *inclusion bodies*. Enzim MMLV-RT yang dimurnikan dari *inclusion bodies* ini terbukti fungsional dan bioaktif, mampu melakukan sintesis cDNA dan amplifikasi dalam uji RT-PCR Multiplex, menunjukkan aktivitas yang baik untuk berbagai aplikasi laboratorium. Sementara itu, Chen *et al.* (2009) mengembangkan protokol untuk produksi MMLV-RT rekombinan aktif dan larut menggunakan vektor pET-28a dengan penambahan His-tag dan situs enterokinase, dengan mengoptimalkan solubilitas melalui ko-ekspresi chaperone molekuler dan kultivasi suhu rendah (28°C), yang secara sinergis meningkatkan fraksi terlarut hingga 95%. Penelitian ini

berhasil memurnikan 21 mg MMLV-RT bebas tag per liter kultur bakteri dengan aktivitas enzimatis yang sebanding dengan enzim komersial, menunjukkan kemampuan sintesis cDNA yang efisien.

Menurut Goff (1990), enzim RT memiliki dua aktivitas utama, yaitu aktivitas polimerase dan aktivitas RNase H. Aktivitas polimerase memungkinkan sintesis cDNA dari primer RNA, sementara aktivitas RNase H mendegradasi RNA *template* setelah sintesis berlangsung (Blain and Goff, 1996). Namun, aktivitas RNase H bisa menjadi kendala karena dapat menyebabkan degradasi RNA *template* sebelum proses sintesis selesai (Kotewicz *et al.*, 1988). Oleh karena itu, enzim RT tanpa aktivitas RNase H terbukti lebih efektif dalam menghasilkan salinan cDNA utuh dengan efisiensi tinggi (Gerard and D'Alessio, 1993). Manfaat dari penggunaan enzim MMLV-RT yang tidak mengandung aktivitas RNase H dalam aplikasi RT-PCR mendorong munculnya penelitian lanjutan. Gen sintetik MMLV-RT yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari ORF reverse transcriptase hasil identifikasi dari gen pol MMLV dengan accession number NC\_001501.1. Gen pol MMLV memiliki panjang sekitar 3.604 bp, sedangkan ORF reverse transcriptase yang digunakan memiliki panjang 1.512 bp dan mengode 504 asam amino. ORF tersebut selanjutnya digunakan sebagai dasar desain gen sintetik yang dioptimasi untuk ekspresi pada *E. coli*.

Konstruksi gen sintetik tersebut sebelumnya telah berhasil disisipkan ke dalam vektor ekspresi pET-21a(+). Namun, kemampuan konstruksi tersebut untuk menghasilkan enzim reverse transcriptase rekombinan yang aktif secara biologis belum dievaluasi. Selain itu, gen MMLV-RT dikonstruksi dengan penambahan sekuens pengkode 6×His-tag yang berasal dari vektor pET-21a(+), sehingga protein rekombinan yang dihasilkan dapat dimurnikan menggunakan metode kromatografi afinitas berbasis ion nikel (Ni-NTA).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi ekspresi gen sintetik MMLV-RT dalam sistem ekspresi pET-21a(+) pada *E. coli* BL21 (DE3), menentukan waktu induksi optimum untuk memperoleh ekspresi protein yang tinggi, serta menguji aktivitas biologis enzim reverse transcriptase yang dihasilkan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi enzim MMLV-RT rekombinan sebagai kandidat alternatif enzim reverse transcriptase komersial untuk aplikasi diagnostik molekuler dan pengembangan produk bioteknologi dalam negeri.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana keberhasilan konstruksi gen sintetik RT hasil optimasi kodon dapat berhasil disisipkan ke dalam vektor ekspresi pET-21a(+), serta transformasinya ke dalam sel inang *E. coli* DH5α untuk keperluan propagasi plasmid ?
2. Apakah gen sintetik RT mampu terekspresi secara optimal dalam sistem ekspresi berbasis *E. coli* BL21 (DE3) dengan induksi menggunakan isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranosida (IPTG) ?
3. Bagaimana pengaruh variasi waktu inkubasi induksi IPTG terhadap tingkat ekspresi dan kestabilan enzim reverse transcriptase rekombinan yang dihasilkan ?
4. Bagaimana aktivitas biologis enzim RT rekombinan yang diperoleh, jika dibandingkan dengan aktivitas enzim reverse transcriptase komersial dalam proses sintesis komplemen DNA (cDNA) ?

### 1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk memproduksi enzim reverse transcriptase secara massal guna pembuatan reagen PCR buatan lokal.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menganalisis keberhasilan konstruksi gen sintetik RT ke dalam vektor pET-21a(+) dan transformasinya ke dalam *E. coli* DH5a untuk propagasi plasmid.
2. Untuk mengevaluasi kemampuan ekspresi gen RT dalam *E. coli* BL21 (DE3) menggunakan sistem ekspresi berbasis IPTG.
3. Untuk menentukan waktu inkubasi induksi IPTG yang optimal untuk menghasilkan enzim reverse transcriptase rekombinan dalam jumlah dan kualitas tinggi
4. Untuk menguji aktivitas biologis enzim RT rekombinan dalam sintesis cDNA serta membandingkannya dengan aktivitas enzim RT komersial.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Bagi Peneliti

Penelitian ini meningkatkan pengetahuan dan keterampilan peneliti dalam bidang biologi molekuler, khususnya pada teknik kloning gen, ekspresi protein rekombinan, purifikasi protein, dan pengujian aktivitas enzim.

#### 1.4.2 Bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini memberikan informasi mengenai ekspresi dan aktivitas biologis enzim MMLV-RT rekombinan dalam sistem *Escherichia coli*, serta dapat menjadi referensi bagi penelitian lanjutan terkait pengembangan enzim rekombinan untuk aplikasi biologi molekuler.

#### 1.4.3 Bagi Masyarakat

Penelitian ini mendukung pengembangan reagen diagnostik molekuler berbasis produk dalam negeri, sehingga berpotensi meningkatkan kemandirian dan efisiensi biaya dalam bidang penelitian maupun diagnostik molekuler.