

BAB 1

PENDAHULUAN

1. 1. Latar Belakang

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) termasuk dalam jenis kanker dengan angka kejadian yang cukup tinggi, terutama pada populasi anak-anak. Penyakit ini terjadi akibat proliferasi abnormal sel-sel limfoid yang mengalami hambatan pada tahap awal diferensiasi, sehingga mampu menyebar ke sumsum tulang, aliran darah, maupun lokasi di luar sumsum tulang. Secara global, jumlah kasus ALL pada anak-anak mencapai 168.879 kasus pada tahun 2021, meningkat sekitar 59% dibandingkan 106.172 kasus yang tercatat pada tahun 1990 (Ding *et al*, 2025). Di Amerika Serikat, insidensinya diperkirakan 1,57 per 100.000 orang pada tahun 2014, dengan sekitar 5.960 kasus baru yang didiagnosis dan 1.470 kematian pada tahun 2018 (Malard & Mohty, 2020). Sementara itu, Indonesia mencatat 14.979 kasus baru leukemia di tahun 2020, memasukan leukemia sebagai kanker peringkat ke-9 tertinggi di negara ini (Garniasih *et al.*, 2022). Prevalensi ALL yang tinggi di negara berkembang ataupun maju menjadikan penyakit ini sebagai fokus dalam penelitian tentang pengobatan serta pengembangan terapi dari kanker.

Pengobatan ALL saat ini telah mengalami banyak perkembangan. Pengobatan utama yang paling banyak digunakan adalah kemoterapi dan radioterapi. Kedua metode ini telah dibuktikan dan memberikan hasil yang signifikan terhadap perkembangan serta pemulihan dari pasien yang terdiagnosis dengan ALL. Penggunaan radioterapi dan kemoterapi memiliki beberapa efek samping dalam jangka pendek ataupun jangka panjang yang cukup berbahaya. Beberapa diantaranya adalah ketidakstabilan genom, penuaan, kelelahan, iritasi kulit, *Radiation Enteritis*, hingga resiko kanker sekunder (van den Boogaard *et al.*, 2022). Untuk menghindari efek samping drastis dari terapi tersebut, maka diperlukan sebuah metode alternatif yang lebih aman dan efisien bagi pasien. Salah satunya adalah terapi target menggunakan enzim L-asparaginase II.

L-asparaginase II merupakan enzim yang berfungsi untuk menghidrolisis ikatan amida pada L-asparagin untuk membentuk asam l-aspartat dan amonia.

Dalam keadaan normal, l-asparagin merupakan asam amino esensial yang disintesis melalui jalur enzim *l-asparagine synthase*, yang mengubah asam aspartat dan asam glutamat menjadi l-asparagin. Sel kanker tidak dapat memproduksi l-asparagin oleh sel itu sendiri sehingga bergantung pada sumber eksternal seperti serum, dimana l-asparagin terkumpul dari diet dan dari sel-sel normal (Baral *et al.*, 2021). Penggunaan L-asparaginase akan berperan untuk mendegradasi l-asparagin yang tersedia dalam sirkulasi, menyebabkan sel kanker kekurangan asam amino tersebut, yang pada akhirnya mengganggu proses sintesis protein dan menghambat pertumbuhan sel kanker.

L-asparaginase komersial yang tersedia saat ini, termasuk yang berasal dari *E. coli* dan *Erwinia chrysanthemi*, masih memiliki beberapa keterbatasan, antara lain menimbulkan reaksi hipersensitivitas, imunogenisitas yang tinggi, dan toksisitas. Toksisitas tersebut sebagian dikaitkan dengan aktivitas glutaminase yang masih dimiliki enzim, sehingga selain menghidrolisis l-asparagin, enzim juga mendegradasi glutamin yang berperan penting dalam metabolisme sel normal. Sementara itu, reaksi hipersensitivitas terutama disebabkan oleh sifat imunogenik enzim sebagai protein asing yang dapat memicu pembentukan antibodi dan respons imun pada pasien (Baral *et al.*, 2021). Keterbatasan tersebut menunjukkan perlunya pengembangan sumber alternatif L-asparaginase yang memiliki aktivitas glutaminase lebih rendah serta imunogenisitas yang lebih kecil.

Salah satu bakteri yang telah diidentifikasi memiliki kemampuan memproduksi L-asparaginase II adalah *Serratia plymuthica* UBCF_13. Sekuens genom lengkap bakteri ini telah berhasil ditentukan dan didepositkan dalam basis data GenBank NCBI dengan nomor aksesori CP068771.1, di mana di dalamnya terdapat gen *ansB* yang mengkode enzim L-asparaginase II (Fatiah *et al.*, 2021). Tersedianya informasi genomik ini membuka peluang yang besar untuk mengembangkan sumber alternatif L-asparaginase II guna mendukung kebutuhan terapi kanker.

Salah satu metode dalam peningkatan produksi protein L-asparaginase II dapat dilakukan dengan teknik kloning dan DNA rekombinan. Strategi kloning terhadap gen *ansB* ke dalam sistem ekspresi *E. coli* telah menjadi pendekatan yang

banyak digunakan dalam produksi L-asparaginase rekombinan (Mahajan *et al.*, 2012). Metode rekombinan DNA untuk pembuatan L-asparaginase II juga berfungsi untuk meningkatkan produktivitas serta kontrol kualitas dan konsistensi yang lebih tinggi (Kante *et al.*, 2018). Teknik rekombinan DNA juga memungkinkan untuk menurunkan reaksi imunologis serta aktivitas glutaminase, sehingga mengurangi efek samping dari terapi ALL dan meningkatkan efektivitas L-asparaginase II (Shafqat *et al.*, 2023).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk meningkatkan ekspresi L-asparaginase II menggunakan metode rekombinan DNA. Penelitian yang dilakukan oleh (Pourhossein & Korbekandi, 2014) menunjukkan keberhasilan ekspresi L-asparaginase dari *Erwinia carotovora* pada host bakteri *E. coli* BL21 (DE3) dengan media luria bertani yang diinduksi dengan 2,0 mM IPTG. Selain itu, penelitian oleh Aishwarya *et al.*, (2019) juga menunjukkan keberhasilan kloning dan ekspresi L-asparaginase dari *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 dengan host *E. coli* strain BL21(DE3) yang mencapai aktivitas tertingginya pada suhu 40°C dan mempertahankan aktivitasnya pada suhu 28°C dan 30°C. Keberhasilan dari penelitian sebelumnya tersebut menunjukkan potensi metode DNA rekombinan dalam optimasi serta peningkatan ekspresi dari L-asparaginase II.

Penggunaan *E. coli* menawarkan beberapa keunggulan signifikan sebagai host ekspresi, antara lain kemudahan manipulasi genetik melalui teknik DNA rekombinan yang sudah mapan, pertumbuhan yang cepat dengan waktu generasi sekitar 20 menit dalam kondisi optimal, biaya produksi yang rendah karena media pertumbuhan yang sederhana, dan pemahaman yang mendalam tentang sistem biologinya (Rosano & Ceccarelli, 2014; Tripathi & Shrivastava, 2019). Sistem ekspresi *E. coli* juga memungkinkan produksi protein dalam skala besar dengan tingkat reproduktibilitas yang tinggi, menjadikannya pilihan ideal untuk aplikasi bioteknologi dan farmasi (Chen & Huang, 2019).

Keberhasilan produksi protein rekombinan sangat bergantung pada optimasi berbagai komponen sistem ekspresi, dimana promotor menjadi salah satu elemen kunci yang menentukan tingkat ekspresi gen (Firat Duzenli & Okay, 2020). Promoter adalah urutan DNA yang dikenali oleh RNA polimerase dan berfungsi

sebagai situs awal transkripsi (Artemyev *et al.*, 2024). Optimasi sekuens promotor dapat dilakukan melalui penggunaan promotor sintetik. Promotor sintetik, merupakan modifikasi dari promotor dasar yang telah ditentukan, yang dirancang untuk mengikat RNA polimerase II dan faktor-faktor transkripsi penting, serta dilengkapi dengan rangkaian elemen regulasi *cis* (CRE) yang ditempatkan di bagian hulu secara spesifik. Kelebihan pokok dari promotor sintetik terletak pada fleksibilitasnya dalam pengaturan, dimana dapat dilakukan penyesuaian terhadap level ekspresi gen sesuai kebutuhan dan dapat disesuaikan untuk bekerja secara spesifik pada jenis jaringan tertentu melalui pemilihan CRE yang tepat.

Studi yang dilakukan oleh Jin *et al.* (2019) membuktikan bahwa penggunaan promotor sintetik J23119 pada *E. coli* mampu meningkatkan ekspresi gen *LacZ* dalam plasmid pUC19. Promotor sintetik tersebut memiliki 19 varian pada bagian *upstream activating sequences* dan menghasilkan peningkatan kekuatan promotor hingga 5,8 kali lipat. Penelitian lain oleh Chen *et al.* (2023) menunjukkan bahwa promotor sintetik yang dirancang dengan menggabungkan wilayah inti promotor alami ACP2 dan GDH2 mampu meningkatkan ekspresi gen *GUS* hingga tujuh kali lipat. Kedua temuan tersebut secara konsisten menunjukkan bahwa modifikasi promotor sintetik merupakan strategi yang efektif untuk memperkuat kekuatan promotor dan meningkatkan produksi protein rekombinan. Peningkatan efisiensi produksi ini diharapkan dapat menekan biaya produksi yang selama ini tergolong tinggi, sehingga produk yang dihasilkan dapat ditawarkan dengan harga yang lebih terjangkau dibandingkan produk komersial yang telah beredar di pasaran.

Sistem ekspresi rekombinan berbasis vektor pET-28a(+) secara default mengandalkan promotor T7 yang dikendalikan oleh T7 RNA polimerase pada galur *E. coli* BL21(DE3). Sistem ini memiliki keterbatasan intrinsik: ekspresi bersifat *leaky* tanpa induksi sempurna, memerlukan penambahan IPTG sebagai induktor eksogen yang menambah biaya produksi, serta berpotensi menimbulkan beban metabolik pada sel inang akibat ekspresi T7 RNA polimerase yang berlebihan. Kekuatan promotor T7 juga bersifat tetap dan tidak dirancang spesifik untuk gen target tertentu, sehingga tidak selalu optimal untuk protein rekombinan dengan

karakteristik biokimia berbeda seperti L-asparaginase II. Sebagai alternatif, promotor sintetik pSSPM2 dirancang melalui pendekatan biologi sintetik berbasis data kuantitatif: kotak -35 diadopsi dari BBa_J23100 (kekuatan relatif tertinggi dalam Anderson Promoter Collection), sedangkan elemen *upstream promoter element* (UPE) dan *discriminator* (DISC) diseleksi dari pustaka promotor sintetik yang kekuatannya telah dikarakterisasi melalui model biofisika prediktif (LaFleur *et al.*, 2022) yang mendekomposisi energi bebas total interaksi RNA polimerase-promotor menjadi kontribusi tiap elemen sekuens — pendekatan kuantitatif yang tidak tersedia pada promotor T7 native yang kekuatannya tidak dapat disetel granular per elemen.

Berdasarkan pemaparan tersebut, penelitian ini bertujuan akhir untuk meningkatkan ekspresi L-asparaginase II dengan pendekatan penggunaan promotor sintetik pada vektor ekspresi pET-28a(+). Penerapan strategi promotor sintetik diharapkan mampu mengoptimalkan produksi enzim L-asparaginase II secara efisien, sehingga dapat menunjang efektivitas terapi medis sekaligus memperluas pemanfaatan enzim ini dalam skala industri. Di samping itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi berupa wawasan baru dalam pengembangan pendekatan molekuler untuk memaksimalkan ekspresi protein rekombinan di dalam sistem biologis.

1. 2.Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah promotor sintetik pSSPM2 dapat diligasikan ke dalam plasmid pET-28a(+):*ansB* untuk menghasilkan konstruksi plasmid rekombinan pET-28a(+):*ansB* :pSSPM2?
- 1.2.2. Apakah plasmid rekombinan pET-28a(+):*ansB*:pSSPM2 dapat ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* strain BL21?
- 1.2.3. Apakah konstruksi plasmid rekombinan pET-28a(+):*ansB* :pSSPM2 dapat diverifikasi menggunakan teknik restriksi dan PCR?

1. 3.Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Melakukan fusi promotor sintetik pSSPM2 ke dalam vektor ekspresi pET-28a(+) yang mengandung gen *ansB*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Meligasikan promotor sintetik pSSPM2 ke dalam plasmid pET-28a(+):*ansB* untuk menghasilkan rekombinan pET-28a(+):*ansB*:pSSPM2.
2. Mentransformasikan plasmid rekombinan pET-28a(+):*ansB*:pSSPM2 ke dalam sel *E. coli* strain BL21.
3. Memverifikasi keberhasilan konstruksi plasmid rekombinan pET-28a(+):*ansB*:pSSPM2 melalui analisis restriksi dan PCR.

1. 4.Manfaat Penelitian

1.4. 1. Manfaat Bagi Peneliti

1. Meningkatkan pengetahuan mengenai metode kloning serta konstruksi plasmid rekombinan.
2. Meningkatkan pengetahuan mengenai faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses konstruksi plasmid rekombinan pET28a+:*ansB*:pSSPM2 dan transformasinya ke dalam *E. coli*.
3. Meningkatkan pengetahuan mengenai faktor yang dapat mempengaruhi ekspresi L-asparaginase II

1.4. 2. Manfaat Bagi Ilmu Pengetahuan

1. Menjadi sumber informasi atau rujukan untuk metode dalam meningkatkan ekspresi L-asparaginase II rekombinan pada *E. coli*.
2. Menjadi rujukan untuk peneliti selanjutnya dalam pengembangan ilmu pengetahuan di bidang medis

1.4. 3. Manfaat Bagi Institusi

Berperan sebagai media bagi perguruan tinggi untuk menerapkan prinsip Tri Dharma sekaligus mengangkat citra institusi melalui kegiatan riset dan penerbitan karya ilmiah.