

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan molekul biologis yang mampu mengkatalis reaksi kimia tanpa ikut secara langsung dalam reaksi kimia tersebut. Enzim merupakan biokatalisator yang terdiri dari protein yang mampu mengikat substrat secara spesifik. Menurut Putri (2012), biokatalisator memiliki tiga sifat utama yaitu menaikkan kecepatan reaksi, mempunyai kekhususan dalam reaksi dan produk, serta kontrol kinetik. Enzim mampu mempercepat reaksi kimiawi secara spesifik tanpa membentuk hasil samping. Enzim bekerja pada keadaan suhu dan pH tertentu dalam sebuah larutan. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi enzim dan substratnya, suhu, dan pH. Peran enzim yang sangat esensial ini banyak dimanfaatkan dalam berbagai sektor industri, salah satunya adalah industri farmasi.

Salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi adalah enzim sefalosporin-C asilase. Menurut Gaurav *et al.*, (2010), sefalosporin-C asilase atau biasa disingkat CCA merupakan enzim asilase β -laktam yang mampu memotong ikatan amida yang ada diantara inti β -laktam dan rantai samping tanpa merusak cincin silik β -laktam dari senyawa sefalosporin C menjadi senyawa 7-ACA. Sefalosporin adalah golongan antibiotik yang sering digunakan untuk mengobati berbagai infeksi yang

disebabkan oleh bakteri. Hal ini diperkuat oleh pendapat Ren *et al.*, (2014) yang menyatakan, bahwa senyawa 7-aminocephalosrporanic acid atau 7-ACA yang mampu dihasilkan oleh enzim sefalosporin-C asilase merupakan senyawa yang menjadi kunci penting dalam pembuatan serta produksi antibiotik sefalosporin.

Menurut Hardianto *et al.*, (2016), enzim sefalosporin-c asilase diisolasi dari beberapa mikroorganisme, seperti *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Achromobacter xyloxidans*, dan lainnya. Enzim ini secara alami diproduksi oleh mikroorganisme tersebut dalam jumlah yang relatif rendah dan efisiensi produksi yang terbatas. Produktivitas mikroorganisme alami dari enzim ini memerlukan waktu yang cukup lama untuk tumbuh serta medium fermentasi yang membutuhkan spesifikasi yang cukup banyak. Hal ini menjadi tantangan utama dalam pemenuhan kebutuhan enzim sefalosporin-c asilase dalam skala industri.

Tingginya penggunaan enzim sefalosporin asilase pada sektor industri, teknik rekayasa genetika diterapkan guna meningkatkan produksi serta aktivitas enzim sefalosporin asilase. Penggunaan bakteri *Escherichia coli* sebagai vektor memberikan banyak keuntungan dari segi efisiensi juga biaya produksi. Hal ini dikarenakan bakteri mudah dikultur dan memiliki kemampuan ekspresi protein yang tinggi. Terkait hal tersebut, Mustika dan Wibisana (2017) memperkuat dengan pendapatnya, bahwa dalam upaya peningkatan aktivitas dari enzim sefalosporin-C asilase terhadap substrat sefalosporin C, dilakukan teknik rekayasa genetika. Salah satu di antaranya

adalah kloning gen pengkode sefalosporin-C asilase ke dalam vektor *Escherichia coli*. Strain bakteri *E. coli* yang umum digunakan dalam memproduksi enzim sefalosporin-C asilase adalah bakteri *E. coli* BL21 (DE3) dimana bakteri dengan strain ini memiliki aktivitas protease yang rendah, sistem T7 promotor yang kuat dan terkendali, dan memiliki ketahanan metabolisme dalam memproduksi protein asing. Produksi enzim sefalosporin-C asilase rekombinan telah berhasil dilakukan oleh Isdiyono, *et al.*, (2017) menggunakan bakteri *E. coli* strain BL21 (DE3)

Metode pemurnian konvensional yang sering digunakan dalam pemurnian enzim rekombinan adalah kromatografi afinitas resin Ni-NTA. Menurut Westphal & Berkel (2021), resin Ni-NTA mampu mengikat protein dengan membentuk interaksi secara spesifik dari ion nikel pada resin dengan gugus imidazol pada rantai samping residu histidin dalam protein target. Meskipun metode ini mampu menghasilkan tingkat kemurnian yang tinggi, terdapat kelemahan yang signifikan, antara lain biaya yang harus dikeluarkan karena resin Ni-NTA relatif mahal dan memiliki keterbatasan dalam regenerasi. Penerapan metode resin Ni-NTA dalam skala besar dinilai kurang cocok karena metode ini memiliki keterbatasan kapasitas sehingga pengaplikasiannya dalam bidang industri dinilai kurang efektif.

Sebagai upaya alternatif untuk mengatasi tantangan dalam pemurnian enzim sefalosporin asilase, digunakan pendekatan sistem dua fase air atau *Aqueous Two-Phase System* (ATPS). ATPS merupakan metode pemurnian yang memanfaatkan dua fase cairan yang tidak saling

bercampur. Metode ini biasanya digunakan dua polimer berbeda atau polimer dan garam. Hal ini diperkuat oleh pendapat Prinz *et al.*, (2012), bahwa *Aqueous Two-Phase System* atau ATPS merupakan dua fase yang tidak bercampur yang terbentuk ketika dua fase polimer yang berbeda secara struktural atau garam anorganik dan satu polimer dicampur dalam air melebihi konsentrasi. Metode ini merupakan metode alternatif yang diterapkan dalam teknik ekstraksi atau pemisahan, dan pemurnian molekul.

Aqueous Two-Phase System (ATPS) merupakan metode yang aman digunakan dalam pemisahan biomolekul yang tidak stabil. Rendahnya tegangan antar permukaan mampu menghindari biomolekul dari denaturasi atau kehilangan aktivitasnya. Menurut pendapat Raja *et al.*, (2021), dan Ibrahim *et al.*, (2020), metode ATPS memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode konvensional resin Ni-NTA, antara lain biaya proses yang lebih rendah dengan menggunakan polyethylene glycol (PEG) dan garam. Metode ini tidak memakan waktu yang banyak dalam prosesnya tanpa memerlukan peralatan yang kompleks. Penggunaan bahan pelarut organik menjadikan proses ini ramah lingkungan. Skalabilitas yang tinggi dari metode ini menjadikannya mudah untuk diaplikasikan dalam skala industri tanpa memerlukan modifikasi besar pada sistem pemurniannya.

Jiang *et al* (2024) menyebutkan bahwa ATPS telah banyak digunakan dalam pemisahan dan pemurnian zat-zat biologis aktif. Namun, hingga saat ini, belum ada penelitian mengenai penerapan metode ATPS terhadap pemurnian enzim sefalosporin-C asilase. Melalui penelitian ini

diharapkan dapat diperoleh pendekatan baru dalam memurnikan enzim sefalosporin-C asilase dengan mengoptimalkan parameter-parameter sistem ATPS seperti jenis garam dan PEG.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana proses pemisahan enzim sefalosporin asilase dari *Escherichia coli* BL21 (DE3) menggunakan metode *Aqueous Two-Phase System* (ATPS)?
2. Bagaimana komposisi terbaik yang mampu meningkatkan efisiensi dan kemurnian enzim sefalosporin asilase selama pemisahan menggunakan *Aqueous Two-Phase System* (ATPS)?
3. Bagaimana Efektivitas metode *Aqueous Two-Phase System* (ATPS) dibandingkan dengan metode pemurnian konvensional dalam pemisahan enzim sefalosporin asilase.

1.3 Tujuan

1. Melakukan proses pemisahan enzim sefalosporin asilase dari *Escherichia coli* BL21 (DE3) menggunakan metode *Aqueous Two-Phase System* (ATPS).
2. Mendapatkan komposisi terbaik untuk mencapai efisiensi dan kemurnian enzim sefalosporin asilase yang tinggi selama pemisahan menggunakan metode *Aqueous Two-Phase System* (ATPS).
3. Mengetahui efektivitas metode *Aqueous Two-Phase System* (ATPS) dibandingkan metode pemurnian konvensional.

1.4 Manfaat

Mendapatkan metode pemurnian yang lebih efisien dan ramah lingkungan untuk memperoleh enzim sefalosporin-c asilase dari bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan industri farmasi.