

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Antibiotik merupakan salah satu jenis obat yang perkembangannya penting dalam industri farmasi karena fungsinya dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit. Penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dan tidak terkontrol dapat menyebabkan resistensi antibiotik karena bakteri patogen dalam tubuh telah beradaptasi dan kebal terhadap antibiotik. Hal tersebut menjadi permasalahan global karena menyebabkan sulitnya penanganan infeksi bakteri. Salah satu antibiotik yang banyak digunakan karena memiliki spektrum yang luas adalah antibiotik sefalosporin generasi III. Kebutuhan antibiotik sefalosporin secara global hingga tahun 2028 mencapai angka 24,1% (Arlinta, 2019).

Menurut data WHO (2019), antibiotik sefalosporin generasi 3, 4, dan 5 merupakan salah satu dari lima jenis antibiotik yang termasuk ke dalam *High Priority Critically Important Category*. Antibiotik sefalosporin merupakan antibiotik golongan β -laktam yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif. Sefalosporin bersifat lebih resisten terhadap enzim *beta lactamase* yang dihasilkan oleh bakteri untuk menghambat kerja antibiotik (Islamiati *et al.*, 2017). Antibiotik sefalosporin generasi ketiga termasuk cefotaxime dan ceftriaxone merupakan antibiotik yang sangat efektif terhadap bakteri gram negatif seperti bakteri yang dapat menyebabkan infeksi pneumonia, gangguan saluran pencernaan dan gangguan saluran kemih (Worotikan *et al.*, 2019). Antibiotik sefalosporin bekerja dengan merusak lapisan peptidoglikan dinding sel

bakteri oleh senyawa *7-Aminocephalosporanic acid* (7-ACA) (Zikri *et al.*, 2024) yang dihasilkan dari proses konversi senyawa Cephalosporin C (CPC) menjadi 7-ACA.

Senyawa *7-Aminocephalosporanic acid* (7-ACA) merupakan komponen prekursor dalam proses sintesis antibiotik sefalosporin semi-sintetik. Senyawa 7-ACA dalam antibiotik sefalosporin bekerja dengan merusak lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri (Hardianto *et al.*, 2016). Senyawa tersebut dihasilkan dari senyawa cephalosporin C (CPC) melalui konversi kimiawi dan enzimatik. Metode konversi kimiawi tidak mampu memenuhi produksi skala industri karena metodenya yang kompleks, tidak ramah lingkungan, dan menggunakan bahan kimia berbahaya sehingga menghasilkan limbah beracun. Proses enzimatik produksi 7-ACA kemudian dikembangkan melalui proses satu tahap menggunakan enzim Cephalosporin C Acylase (CCA) dalam skala industri karena kelebihanannya dalam proses produksi yang lebih sederhana, ekonomis dan konsumsi energi yang relatif rendah. (Mustika & Wibisana, 2017).

Penggunaan enzim CCA dalam bentuk bebas pada produksi skala industri memiliki beberapa kendala karena membutuhkan kondisi lingkungan khusus, stabilitas enzim yang rendah, dan pemisahan enzim dari produk yang sulit sehingga tidak dapat digunakan kembali secara berulang (Tong *et al.*, 2019). Hal tersebut berdampak pada biaya produksi yang tinggi karena enzim bebas diaplikasikan pada sistem homogen sehingga enzim hanya dapat digunakan dalam satu reaksi (Homaei *et al.*, 2013). Proses secara enzimatik dalam konversi senyawa CPC kemudian dikembangkan menggunakan enzim imobil. Enzim imobil dihasilkan melalui

teknik imobilisasi, di mana enzim ditempatkan dalam ruang tertentu sehingga enzim tidak dapat bergerak bebas karena adanya interaksi dengan bahan pendukung secara kimia atau fisik, dan memungkinkan enzim untuk digunakan berulang kali (Wening dan Herdyastuti, 2021). Penggunaan teknik imobilisasi enzim memiliki beberapa keuntungan karena dapat menghasilkan enzim dengan stabilitas yang lebih baik bahkan dalam kondisi lingkungan ekstrim seperti pH, suhu, dan pelarut organik, serta potensinya untuk dapat digunakan secara berulang.

Teknik imobilisasi enzim dapat dilakukan dengan penambahan matriks dan tanpa matriks. Teknik imobilisasi dengan penambahan matriks memiliki kekurangan karena selama proses reaksi, pengenceran enzim dapat terjadi akibat unit non-katalitik dari matriks hingga 95% (Chauhan *et al.*, 2022) yang menyebabkan enzim imobil kehilangan 50% dari aktivitasnya (Cao *et al.*, 2003). Penggunaan bahan matriks akan meningkatkan biaya enzim serta menghasilkan limbah matriks dari biokatalis yang tidak aktif setelah pemakaian (Julkipli *et al.*, 2022). Metode imobilisasi enzim tanpa matriks (*carrier-free*) kemudian dikembangkan dengan menggunakan teknik *Cross-linking Enzyme* (CLE). Metode imobilisasi tanpa matriks mampu meningkatkan aktivitas enzim 10-1000 kali lebih tinggi dibandingkan dengan imobilisasi enzim dengan penambahan matriks (Cao *et al.*, 2003).

Salah satu teknik imobilisasi enzim tanpa matriks yang efektif dan berpotensi di industri adalah *Cross-linked Enzyme Aggregates* (CLEA). Teknik CLEA memiliki beberapa kelebihan dibandingkan teknik imobilisasi lainnya, yaitu menghasilkan aktivitas enzim yang tinggi, meningkatkan stabilitas produk,

meningkatkan toleransi terhadap lingkungan ekstrim, tidak membutuhkan kemurnian tinggi, serta mencegah terlarut dalam media. Selama proses preparasi CLEA, enzim akan diagregasi melalui proses presipitasi menggunakan pelarut organik, larutan garam, dan polimer non-ionik untuk menghasilkan agregat yang akan diikat silang menggunakan reagen bifungsional seperti glutaraldehida yang bekerja dengan membentuk ikatan kovalen antar molekul protein (Yusof & Khanahmadi, 2018). Penggunaan teknik CLEA pada enzim dengan residu lisin yang rendah pada permukaannya memiliki banyak kendala, karena proses pengikatan silang antara gugus aldehida dengan gugus amino pada residu lisin tidak berlangsung secara efektif. Salah satu solusi untuk meningkatkan aktivitas enzim dengan residu lisin yang rendah adalah menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai koagregat atau *proteic feeder*. BSA digunakan untuk meningkatkan jumlah residu lisin pada permukaan enzim, sehingga gugus amina yang tersedia dapat berikatan secara kovalen dengan glutaraldehida dan meningkatkan *expressed activity* enzim (Perwez *et al.*, 2019). Datta *et al.* (2013) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa koagregat seperti BSA dapat membantu pembentukan agregat enzim yang lebih teratur serta mengurangi denaturasi selama agregasi.

Permasalahan lain pada CLEA dengan ukuran agregat enzim yang kecil menurut Chi *et al.* (2021) adalah saat proses mekanik seperti sentrifugasi dan filtrasi untuk memisahkan CLEA. Proses mekanik tersebut dapat menyebabkan terjadinya aglomerasi, sehingga pemisahan CLEA akan sulit untuk dilakukan. Penambahan *Magnetic Nanoparticles* (MNPs) pada teknik CLEA menjadi salah satu cara untuk meningkatkan proses pembentukan CLEA. *Magnetic CLEA* (mCLEA) memiliki

sifat yang tidak beracun, permukaan yang luas, ukuran partikel yang kecil, aktivitas yang tinggi, dan efektif dalam pemuatan enzim (Ifko *et al.*, 2023). Penggunaan nanopartikel dalam imobilisasi enzim telah diketahui mampu meningkatkan stabilitas dan aktivitas katalitik pada beberapa jenis enzim, sehingga enzim dapat digunakan kembali pada siklus produksi selanjutnya. Aplikasi magnetik dalam proses sintesis CLEA dapat memudahkan dalam proses pemisahan pada skala industri melalui pemisahan magnetik menggunakan magnet eksternal. Permukaan MNP tanpa modifikasi memiliki sifat hidrofobik dan permukaannya luas yang dapat menyebabkan aglomerasi dan dapat mempengaruhi aktivitas katalitik enzim (Seenuvasan *et al.*, 2018), sehingga diperlukan modifikasi pada permukaannya dengan penambahan aminosilan yang mengandung gugus amina (NH_2). Modifikasi tersebut dilakukan agar nanopartikel memiliki sifat yang biokompatibel, menghindari korosi, dan meningkatkan stabilitas. Penambahan gugus amina dapat berfungsi sebagai titik reaktif yang dapat berinteraksi dengan agen pengikat silang sehingga akan membentuk ikatan kovalen dengan enzim. Menurut Talekar *et al.* (2012), penggunaan *Aminosilanized Magnetic Nanoparticles* pada enzim dengan gugus amina yang rendah mampu menghasilkan CLEA yang stabil dan tidak mudah terlarut.

Teknik CLEA dengan penambahan *Magnetic Nanoparticles* (MNP) telah diaplikasikan pada beberapa penelitian dalam mengimobilisasi berbagai enzim. Talekar *et al.* (2012) melakukan penelitian magnetik α -amilase-CLEA menggunakan *Magnetic Nanoparticles* (MNPs) yang di fungsionalisasi menggunakan gugus amina (NH_2). CLEA dengan perlakuan magnetik memiliki

expressed activity α -amilase 100% sedangkan CLEA α -amilase tanpa magnetik memiliki *expressed activity* sebesar 45%. Hal tersebut disebabkan karena gugus amina yang rendah pada amilase. Penggunaan magnetik-CLEA (mCLEA) mampu meningkatkan stabilitas penyimpanan dan stabilitas terhadap suhu ekstrim. Ifko *et al.* (2023) melaporkan Cellulase-mCLEA mampu mempertahankan 100% aktivitas awalnya setelah 2 siklus dan mengalami penurunan setelah 10 siklus menjadi 65% aktivitas awal. Hingga saat ini, belum ada penelitian yang melaporkan penggunaan *Aminosilanized Magnetic Nanoparticles* (AMN) untuk meningkatkan aktivitas dan stabilitas CLEA pada enzim Cephalosporin C Acylase (CCA). Penelitian imobilisasi enzim CCA dengan teknik mCLEA diharapkan mampu meningkatkan efisiensi produksi 7-ACA dan meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim yang lebih baik.

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi proses imobilisasi enzim CCA dengan teknik CLEA yang dikombinasikan dengan AMN. Analisis potensi penambahan AMN dalam teknik CLEA dilakukan dengan membandingkan efektivitas imobilisasi sampel yang mengandung AMN (mCLEA-CCA) dan sampel tanpa AMN (CLEA-CCA) melalui nilai yield imobilisasi, *expressed activity*, dan stabilitas terhadap pH dan suhu. Penambahan AMN dalam sistem imobilisasi akan memudahkan dalam proses pemisahan enzim (Ifko *et al.*, 2023). Enzim imobil yang dihasilkan (mCLEA-CCA dan CLEA-CCA) selanjutnya dikarakterisasi dengan uji stabilitas pH dan suhu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas dan aktivitas imobilisasi enzim berdasarkan pengaruh parameter seperti konsentrasi koagregat BSA, konsentrasi AMN, dan konsentrasi *cross-linker*

glutaraldehida (GA). Pengaruh perubahan suhu dan pH terhadap stabilitas mCLEA-CCA juga dibandingkan dengan stabilitas pada enzim CCA bebas.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka masalah pada penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

- 1.2.1. Bagaimana pengaruh konsentrasi *Aminosilanized Magnetic Nanoparticles* (AMN) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA?
- 1.2.2. Bagaimana pengaruh konsentrasi koagregat *Bovine Serum Albumin* (BSA) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA dibandingkan CLEA-CCA?
- 1.2.3. Bagaimana pengaruh konsentrasi pengikat silang glutaraldehida (GA) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA dibandingkan CLEA-CCA?
- 1.2.4. Bagaimana karakteristik pH dan suhu optimum enzim mCLEA-CCA dan CLEA-CCA?
- 1.2.5. Bagaimana stabilitas enzim mCLEA-CCA terhadap pH dan suhu dibandingkan CLEA-CCA?

1.3. Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian sebagai berikut:

- 1.3.1 Mengetahui pengaruh konsentrasi *Aminosilanized Magnetic Nanoparticles* (AMN) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA.
- 1.3.2 Mengetahui pengaruh konsentrasi koagregat *Bovine Serum Albumin* (BSA) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA dibandingkan CLEA-CCA.
- 1.3.3 Mengetahui pengaruh konsentrasi pengikat silang glutaraldehida (GA) terhadap yield imobilisasi dan *expressed activity* mCLEA-CCA dibandingkan CLEA-CCA.
- 1.3.4 Mengetahui karakteristik pH dan suhu optimum enzim mCLEA-CCA dan CLEA-CCA.
- 1.3.5 Mengetahui stabilitas enzim mCLEA-CCA terhadap pH dan suhu dibandingkan CLEA-CCA.

1.4. Manfaat

- 1.4.1 Memberikan informasi dasar untuk pengembangan teknologi imobilisasi enzim mCLEA pada aplikasi skala industri.
- 1.4.2 Meningkatkan efisiensi produksi 7-ACA melalui penggunaan metode enzimatis mCLEA-CCA.

- 1.4.3 Menghasilkan metode imobilisasi enzim CCA yang lebih stabil dan memiliki aktivitas tinggi melalui teknik CLEA dengan penambahan *Aminosilanized Magnetic Nanoparticles* (AMN).