

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

L-asparaginase, sebuah enzim yang mengkatalisis hidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia, memainkan peran penting dalam berbagai industri, termasuk farmasi, biosensor, dan industri pangan (Tiwari, 2024). Dalam industri pangan, L-asparaginase sangat berharga karena dapat mengurangi pembentukan akrilamida, karsinogen potensial yang terbentuk selama reaksi Maillard antara asparagin dan gula pereduksi seperti glukosa (Dash *et al.*, 2014). Selain itu, enzim ini banyak diterapkan dalam farmasi karena sifat antitumornya dan kemampuannya untuk mengobati kanker tertentu (Duarte, 2024). Enzim L-asparaginase telah diidentifikasi sebagai komponen vital dalam pengobatan leukemia limfoblastik akut (ALL) dan limfoma Hodgkin (Shastri, 2023; Kumar, 2024).

L-Asparaginase telah ditemukan pada hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Namun, hanya L-Asparaginase mikroba yang menawarkan sumber daya tinggi sebagai agen terapeutik serta memiliki signifikansi komersial karena sifatnya yang sangat efisien dan murah sehingga mampu memfasilitasi produksi skala industri (Chand *et al.*, 2020). Hingga saat ini, sifat-sifat L-Asparaginase dari berbagai mikroorganisme telah dikarakterisasi (Chand *et al.*, 2020; Krishnapura *et al.*, 2016), seperti L-Asparaginase dari *Erwinia*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus*, *Aspergillus*, dan *Escherichia coli* (Ali *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). L-asparaginase dari *Escherichia coli* dan

Erwinia chrysanthemi yang termasuk ke dalam tipe II, telah digunakan secara luas dalam dunia kedokteran, tetapi komplikasi yang berkembang seperti hipersensitivitas, antigenisitas, dan neurotoksisitas bergantung pada L-glutaminase yang kurang baik sehingga memerlukan alternatif yang lebih sesuai (Nguyen *et al.*, 2018; Radadiya *et al.*, 2020; Sobot *et al.*, 2020). Asparaginase Tipe I cenderung memiliki struktur yang lebih stabil yang memicu respons imunogenisitas lebih ringan, menjadikannya pilihan yang lebih sesuai pada pasien dengan riwayat hipersensitivitas terhadap Asparaginase Tipe II (Pokrovsky *et al.*, 2016). Di sisi lain, L-Asparaginase yang disetujui secara komersial yang digunakan dalam produksi pangan untuk mitigasi akrilamida hanya berasal dari *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae* (Wang *et al.*, 2021). *A. oryzae* dan *A. niger* L-Asparaginase stabil pada rentang pH alkali yaitu 5,0-8,0 (Dias *et al.*, 2019), sesuai dengan stabilitas pH enzim asparaginase yang diperlukan untuk aplikasi industri yang melibatkan suhu tinggi biasanya berada dalam rentang pH alkali yaitu pH 7,5-9,0 (Mohamed *et al.*, 2015; Zuo *et al.*, 2015). Namun, suhu optimum *A. niger* L-Asparaginase hanya 30 °C, yang akan membatasi aplikasinya dalam pemrosesan makanan termal (Chakraborty & Shivakumar, 2021; Saeed *et al.*, 2018). Mempertimbangkan permintaan akan spesifisitas tinggi, termostabilitas tinggi, dan stabilitas rentang pH yang luas dari L-Asparaginase dalam aplikasi industri pangan dan farmasi, salah satu alternatifnya adalah dengan menggunakan L-asparaginase tipe I yang berasal

dari mikroba lain dengan sifat termostabil yang tinggi untuk mengatasi masalah ini.

L-asparaginase tipe 1 yang berasal dari bakteri, termasuk dari *Arthrobacter*, saat ini digunakan untuk mengobati leukemia limfoblastik akut dan limfoma ganas, yang menunjukkan efektivitas asparaginase dari *Arthrobacter* dalam terapi leukemia (Iraci *et al.*, 2017; Karuppaija *et al.*, 2017; Azmi & Chaudhary, 2018). Berdasarkan studi pendahuluan yang dilakukan dengan metode genom mining, didapatkan fakta bahwasanya gen Asparaginase juga dapat ditemukan pada strain bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus*. Selain itu, pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Laksmi *et al.* (2022), diketahui bahwa enzim D-allulose epimerase yang diisolasi dari *Arthrobacter psychrolactophilus* (ApDAE) menunjukkan kestabilan pada suhu yang tinggi, yaitu suhu 70 °C. Pada penelitian yang dilakukan oleh Nirwantono *et al.*, (2023) juga dapat diketahui bahwa stabilitas termal L-arabinose isomerase (ApL-AI) menunjukkan kestabilan aktivitas enzimatis di atas 70% pada suhu kisaran 50-60 °C. Berdasarkan penjabaran tersebut, diharapkan enzim L-Asparaginase yang diisolasi dari strain bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* (ApL-Asn) juga dapat bersifat termostabil yang dapat menunjukkan kestabilan pada suhu tinggi, sehingga menjadi pilihan yang tepat dalam mitigasi akrilamida tinggi pada pangan dan terapi leukimia dengan imunogenisitas yang lebih rendah.

Pada penelitian ini, akan dilakukan kloning, ekspresi, serta pemurnian ApL-Asn melalui teknologi DNA rekombinan menggunakan mikroba

sebagai sel inang sehingga lebih efisien dalam menghasilkan protein rekombinan dalam jumlah yang tinggi. Tidak seperti teknik kloning konvensional yang mengandalkan ligasi DNA in vitro, rekombinasi kloning mencapai ikatan kovalen elemen genetik in vivo melalui rekombinasi homolog (Xu *et al.*, 2012). Keunggulan metode ini yaitu urutan DNA yang diinginkan dikloning tanpa penambahan basa tambahan, karena ekstensi primer hanya homolog dengan ujung vektor target itu sendiri sehingga meningkatkan akurasi penyisipan gen. Selain itu, tidak ada batasan yang signifikan pada urutan homologi yang digunakan, sehingga memungkinkan kloning di lokasi mana pun yang diinginkan (Irwin *et al.*, 2012). Sistem T7 pada vektor rekombinan dapat mengurangi pembentukan agregat ini dengan menyesuaikan kondisi ekspresi, seperti suhu dan waktu induksi (Xiao *et al.*, 2018). Teknologi DNA rekombinan memungkinkan penambahan tag yang memfasilitasi purifikasi protein melalui kromatografi afinitas, secara signifikan meningkatkan hasil dan kemurnian produk akhir (Hanif *et al.*, 2010).

Tahapan kloning diawali dengan mempersiapkan insert DNA target Asn dari genom bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* dan vektor ekspresi pET28a(+). Gen Asn diisolasi dari genom bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Sedangkan plasmid pET28a(+) diisolasi menggunakan kit isolasi yang dilanjutkan dengan melakukan digesti vektor ekspresi pET28a(+) dengan memanfaatkan kemampuan enzim restriksi (McLennan *et al.*, 2012).

Selanjutnya, gen Asn hasil PCR dan plasmid pET28a(+) hasil digesti dengan enzim restriksi dilakukan ekstraksi dari gel agarose untuk didapatkan Gen Asn dan plasmid pET28a(+) murni. Kemudian, gen Asn dan plasmid pET28a(+) yang murni dikloning dengan metode *homologous recombination* menggunakan In-Fusion HD Cloning Kit dan kemudian ditransformasikan ke *E. coli* BL21 Star (DE3) *Competent Cell* sebagai salah satu tahapan pada kloning. Selanjutnya, plasmid pET28a(+) yang berhasil dimasuki oleh gen Asn (pET28a(+).ApLAsn) akan dilakukan transformasi ke *E. coli* BL21 Star (DE3) dengan tujuan untuk dilakukan tahapan ekspresi. Pada tahapan ekspresi, bakteri *E. coli* BL21 Star (DE3) sendiri dipilih sebagai host ekspresi dan pET28a(+) sebagai vektor ekspresi. Keberhasilan ekspresi pET28a(+)-ApLAsn pada *E. coli* BL21 Star (DE3) akan dikonfirmasi dengan metode elektroforesis SDS gel poliakrilamida (SDS-PAGE).

Enzim rekombinan ApL-Asn ini perlu dilakukan uji aktivitas enzim untuk mengetahui kondisi optimum dari ApL-Asn sendiri. Namun, sebelum dilakukan uji aktivitas, enzim ini perlu dilakukan pemurnian untuk mengeliminasi protein lain selain protein target (ApL-Asn), sehingga dapat meningkatkan aktivitas spesifik dari enzim tersebut. Salah satu metode yang paling sederhana, murah, dan kerap kali dipilih untuk memurnikan enzim ialah metode *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) yang memanfaatkan ikatan spesifik antara kolom nikel (Ni) atau kobalt (Co) dengan His-tag pada protein rekombinan. Tahapan dialisis dilakukan setelah protein murni didapat guna menghilangkan kadar NaCl dan imidazole sisa

pemurnian dengan metode IMAC. Selanjutnya, uji kadar total protein ApL-Asn dilakukan dengan metode *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA Protein Assay).

Berdasarkan penjelasan tersebut, maka dilakukan penelitian sebagai salah satu langkah dalam penyusunan tugas akhir dengan judul “Kloning, Ekspresi, dan Purifikasi Protein Rekombinan L-Asparaginase dari Isolat Bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus*”. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi satu langkah kecil yang berperan penting dalam industri farmasi sebagai pengobatan leukemia limfoblastik akut (ALL), serta dalam industri pangan sebagai penurun kadar akrilamida pada makanan yang diolah dengan suhu tinggi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dibatasi masalah penelitian meliputi:

- 1.2.1 Apakah gen Asparaginase dari isolat bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* dapat dikloning?
- 1.2.2 Apakah protein rekombinan L-Asparaginase dapat diekspresikan sebagai protein target?
- 1.2.3 Berapa berat molekul dan jumlah total protein rekombinan L-Asparaginase yang dimurnikan dengan memanfaatkan His-tag dari enzim tersebut?

1.3. Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, penelitian bertujuan untuk:

- 1.3.1 Memperoleh kloning gen Asparaginase dari isolat bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus*
- 1.3.2 Memperoleh ekspresi protein rekombinan L-Asparaginase sebagai protein target
- 1.3.3 Memperoleh L-Asparaginase yang dimurnikan dengan memanfaatkan His-tag dan mengetahui ukuran berat molekul asparaginase berdasarkan *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan jumlah protein asparaginase berdasarkan *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA)

1.4. Manfaat

Adapun penelitian ini dilakukan dengan harapan dapat memberikan manfaat untuk berbagai pihak, yakni:

- 1.4.1 Menjadi media penambahan pengetahuan dan pengalaman mahasiswa terkait proses kloning, ekspresi, dan pemurnian enzim rekombinan
- 1.4.2 Menjadi perintis dalam meneliti enzim rekombinan L-Asparaginase dari bakteri *Arthrobacter psychrolactophilus* sehingga dapat dilakukan uji aktivitas enzim rekombinan L-Asparaginase
- 1.4.3 Menghasilkan L-Aspartat dan ammonia yang dapat menghambat pembentukan akrilamida pada proses pengolahan makanan pada suhu tinggi serta sifat antitumornya dalam pengobatan leukemia limfoblastik akut (ALL)