

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagian besar bahan plastik yang diproduksi di dunia ini berasal dari fosil. Bahan termoplastik seperti polietilen (PE), poliuretan (PUR), polivinil klorida (PVC), polipropilena (PP), dan polietilen tereftalat (PET) merupakan 80% dari total penggunaan plastik global (Urbanek *et al.*, 2018). Menurut Badan Statistik Lingkungan Hidup dan Kehutanan Republik Indonesia (2023), pada tahun 2022 timbunan sampah di Indonesia adalah 35,9 juta ton dimana 18% merupakan sampah plastik. Jadi timbunan sampah plastik di Indonesia mencapai 6,49 juta ton di tahun 2022 (SIPSN, 2023). Plastik adalah bahan yang sering digunakan oleh manusia dan terbuat dari bahan polimer dengan proses penguraianya berlangsung lama. PET (*polyethylene terephthalate*) merupakan salah satu jenis plastik *non-biodegradable* yang banyak digunakan untuk membuat botol minuman, bungkus sirup, dan plastik pembungkus makanan karena memiliki sifat yang kuat terhadap pelarut serta gas, ketahanan tinggi, kaku, dan tahan terhadap bahan kimia serta panas. Disisi lain, PET memiliki ikatan karbon yang kuat dari polimer termoplastik yang telah mengalami proses kimia menjadi benda yang susah diuraikan oleh mikroorganisme (Mawardi & Lubis, 2018). Dengan demikian limbah plastik tersebut akan semakin menumpuk di bumi seiring berjalannya waktu. *Polyethylene terephthalate hydrolase* (PETase) merupakan enzim yang mampu untuk mendegradasi *Polyethylene terephthalate* (PET) menjadi bentuk yang lebih sederhana (Urbanek *et al.*, 2021).

PETase pertama kali ditemukan pada bakteri *Ideonella sakaiensis* 201-F6 oleh Yoshida *et al.* (2016). PETase akan mendegradasi PET menjadi *mono (2-hydroxyethyl) terephthalate* (MHET) sebagai produk utama, kemudian *bis (2-hydroxyethyl) terephthalate* (BHET) dan *ethylene glycol* (EG) sebagai produk sampingan (Urbanek *et al.*, 2021). Berbagai rekayasa *Ideonella sakaiensis* PETase (IsPETase) telah dilakukan karena IsPETase *wild type* memiliki stabilitas panas yang terbatas. Son *et al.* (2019), melakukan rekayasa protein rasional berbasis struktur yang menghasilkan IsPETase dengan peningkatan stabilitas panas dan aktivitas degradasi PET. Kemudian Son *et al.* (2020) juga telah berhasil menciptakan dua varian IsPETase (IsPETaseS242T dan IsPETaseN246D) dengan aktivitas enzimatis yang lebih besar dibandingkan *wild type* serta varian mutasi empat kali (IsPETaseS121E/D186H/S242T/N246D) dimana melalui rekayasa protein berbasis bioinformatika mampu mempertahankan aktivitas degradasi selama 20 hari.

Selain merekayasa protein untuk meningkatkan kemampuan degradasi dan stabilitas PETase, meningkatkan efektivitas dan efisiensi PETase dalam proses aplikasi degradasi PET juga dapat dilakukan dengan mengoptimalkan efisiensi sekresi PETase (Aji *et al.*, 2022). Peningkatan tersebut dilakukan dengan pengembangan rekayasa genetik, termasuk berbagai vektor ekspresi, promoter, pengatur elemen dan sinyal peptida. Promoter merupakan salah satu elemen terpenting untuk memfasilitasi produksi protein rekombinan tingkat tinggi. Promotor P₄₃ *B. subtilis* dikenal sebagai promotor terkuat yang sering digunakan dalam sistem ekspresi rekombinan dari *B. subtilis* (Miao *et al.*,

2020). Menurut penelitian Miao *et al.* (2020), berdasarkan transkriptom data dan evaluasi eksperimental didapatkan promotor p2069 dari *B. pumilus* mampu mendorong gen rekombinan asing mencapai ekspresi yang paling tinggi dalam *B. subtilis*. P2069 mencapai aktivitas proteolitik tertinggi dibandingkan dengan yang lain dengan nilai 757,6 U/mL dimana 3,65 kali lebih tinggi dibandingkan aprE promoter (PaprE) yang merupakan kontrol positif dan memiliki ekspresi GFP 18,4 kali lebih tinggi dibandingkan dengan PaprE. Jika dibandingkan dengan promotor P43, P2069 dalam ekspresi GFP memiliki ekspresi 3,48 kali lebih tinggi di jam ke-24 dan 4,48 kali lebih tinggi di jam ke-48. Menurut penelitian Miao *et al.* (2020), rekayasa promotor P2069 dengan mutagenesis saturasi menyebabkan ekspresi yang dikendalikan promotor P2069 mutan meningkat 3,67 kali lipat dibandingkan dengan P2069. Dalam penelitiannya didapatkan bahwa aktivitas proteolitik di bawah kontrol promotor P2069 Mutan tertinggi sebesar 1400 U/mL di jam ke-36 dalam *Bacillus subtilis* WB600. Namun penggunaan promotor P2069 mutan belum pernah diterapkan untuk ekspresi gen PETase dengan sel inang *E. coli* karena promotor yang sering digunakan dalam ekspresi PETase di *E. coli* yaitu promotor T7. Promotor T7 merupakan promotor yang mendorong ekspresi gen pengkode protein target yang secara spesial dikenali oleh *bacteriophage* T7 RNA Polimerase (T7 RNAP) sehingga mampu meningkatkan transkripsi delapan kali lebih cepat dari *E. coli* RNA Polimerase. T7 RNAP di *E. coli* BL21 (DE3) dalam mengkode gen perlu untuk diinduksi oleh *isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) karena memiliki komponen *inducible* promotor

lacUV5 yang merupakan varian terkuat dari *wild type* lac promotor sehingga akan mudah menciptakan sistem ekspresi protein yang berlebih (Du *et al.*, 2021). Namun IPTG merupakan penginduksi yang dapat bersifat toksik terhadap sel dan perlu memonitoring kerapatan sel dalam penginduksiannya. Menurut Dvorak *et al.* (2015), IPTG dapat mengganggu kemampuan sel dalam mempertahankan plasmid rekombinan yang dibawa serta menghambat pertumbuhan sel. Selain itu penggunaan *inducer* IPTG juga kurang efisien dalam skala industri karena harga *inducer* IPTG yang tinggi (Duzenli dan Okay (2020). Oleh sebab itu diperlukan media yang mampu menggantikan induksi dengan IPTG yaitu dengan menggunakan media autoinduksi seperti media *Auto Induction Medium* (AIM) dan ZYM-5052. *Autoinduction medium* digunakan untuk memproduksi protein target secara otomatis tanpa memonitor kepadatan sel dan penambahan penginduksi pada waktu yang tepat karena komposisinya yang telah seimbang antara substrat karbon glukosa, gliserol, dan laktosa. Penggunaan *autoinduction medium* dapat menghasilkan tingkat protein target fungsional yang lebih tinggi dari induksi konvensional dan manual dengan IPTG (Fathi-Roudsari *et al.*, 2018). *Defined medium* seperti Luria Bertani (LB) dan *Teriffic Broth* (TB) digunakan sebagai media pembanding karena merupakan media yang umum digunakan dalam ekspresi gen di *E. coli*. *Defined medium* digunakan karena seluruh metabolit dapat diperhitungkan dan media dapat dibuat secara reproduktif (de Raad *et al.*, 2022). Oleh sebab itu dilakukan upaya untuk mengetahui produksi enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) dibawah kontrol promotor P2069 mutan

dan T7 di *defined medium* dan *autoinduction medium* dimana gen yang dikontrol di bawah promotor P2069 mutan yaitu *IsPETase* sedangkan gen yang dikontrol promotor T7 yaitu *IsPETase wild type* dan ICCG.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana ekspresi enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di bawah kontrol promotor P2069 Mutan dari *Bacillus pumilus* di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052)?
- 1.2.2 Bagaimana ekspresi enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di bawah kontrol promotor T7 di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052)?
- 1.2.3 Bagaimana aktivitas enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) dan konsentrasi protein di bawah kontrol promotor P2069 Mutan dibandingkan dengan promotor T7 pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052)?

1.3 Tujuan

- 1.3.1 Mengkaji promotor P2069 Mutan dari *Bacillus pumilus* dalam mengekspresikan enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).
- 1.3.2 Mengetahui ekspresi enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di bawah kontrol promotor T7 di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).
- 1.3.3 Mengetahui perbandingan aktivitas enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) dan konsentrasi protein di bawah kontrol promotor P2069 Mutan dengan promotor T7 pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).

1.4 Manfaat

- 1.4.1 Dapat menginformasikan mengenai pengaruh promotor P2069 Mutan dari *Bacillus pumilus* dalam mengekspresikan enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).
- 1.4.2 Memberikan informasi terkait ekspresi enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) di bawah kontrol promotor T7 di *Escherichia coli* pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).
- 1.4.3 Dapat menginformasikan mengenai perbandingan perbandingan aktivitas enzim pengurai plastik PET (PET *hydrolase*) dan konsentrasi protein di bawah kontrol promotor P2069 Mutan dengan promotor T7 pada *defined medium* (LB dan TB) dan *autoinduction medium* (AIM dan ZYM-5052).