I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Permasalahan pencemaran lingkungan akibat pemakaian plastik berbasis petrokimia telah mendorong hadirnya produksi plastik yang lebih ramah lingkungan (Kunwar *et al*., 2016; Nielsen *et al*., 2020). Bioplastik merupakan material polimer berbasis sumber daya hayati terbarukan dan dapat terurai secara biologis (Singh *et al.,* 2022). *European Bioplastics* pada tahun 2021 memproyeksikan kapasitas produksi bioplastik global akan terus mengalami perkembangan dari 2,087 juta ton pada 2020 menjadi 7,593 juta ton pada 2026 (Costa *et al.,* 2023). Poli-asam laktat (*Polylactic acid /PLA)* merupakan biopolimer yang paling banyak diaplikasikan karena memiliki biokompatibilitas, elastisitas, perilaku termoplastik, kemudahan proses pencetakan, dan tingkat kekakuan yang baik. Kualitas dan sifat fisikokimia PLA sangat dipengaruhi oleh kemurnian optis monomernya yaitu, asam laktat (Swetha *et al*., 2023).

Asam laktat merupakan senyawa kiral yang mempunyai dua enansiomer, yaitu asam L-laktat dan asam D-laktat (Ojo & de Smidt, 2023; Wang *et al*., 2025). Ketersediaan asam laktat dengan kemurnian optis tinggi merupakan faktor penting dalam produksi PLA berkualitas. Asam laktat dapat dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL) melalui proses fermentasi karbohidrat, sedangkan asam fenil laktat disintesis melalui jalur metabolisme asam amino aromatik (Wang *et al*., 2021; Bintsis, 2018; Sun *et al.,* 2019).

BAL merupakan kelompok bakteri gram positif yang menggunakan karbohidrat sebagai sumber karbon utamanya (George *et al*., 2018).

Pediococcus pentosaceus merupakan salah satu BAL yang mampu memproduksi asam laktat dan asam fenil laktat dengan kemurniaan optis tinggi, salah satunya pada strain InaCC B159 (Mumtazah, 2025). Kemampuan tersebut didorong oleh adanya dua gen penyandi berupa *ldhD* dan *ldhL* yang mengkodekan pembentukan enzim D dan L Laktat dehidrogenase (LDH) untuk sintesis asam L-Laktat dan asam D-Laktat (Botthoulath *et al*., 2025).

LDH merupakan enzim golongan oksidoreduktase yang penting dalam proses metabolisme karbohidrat melalui katalis reaksi interkonversi laktat dan piruvat dalam sistem koenzim NAD+/NADH (Klein *et al*., 2020). Peran penting LDH dalam biosintesis asam laktat menjadikan enzim ini perlu diproduksi dalam jumlah besar. Namun, enzim yang diperoleh dari mikroorganisme asalnya mempunyai tingkat produksi yang terbatas, kompleksitas proses purifikasi, dan biayanya yang tinggi (De Marco, 2025). Oleh karena itu diperlukan solusi lain, yaitu penggunaan sistem ekspresi rekombinan seperti *Escherichia coli* (Rosano *et al*., 2019). Sistem ekspresi rekombinan *E. coli* memiliki siklus hidup yang pendek, mudah dimodifikasi, dan memiliki sistem fisiologis yang telah diketahui (Hemamalini *et al*., 2020).

E. coli BL21 (DE3) merupakan strain yang sering digunakan sebagai inang ekspresi karena mempunyai lisogen λDE3 yang mengkode gen T7 RNA polymerase di bawah kendali promoter lacUV5, sehingga gen target

yang berada di bawah promoter T7 dapat diekspresikan dengan tingkat tinggi (Du *et al*., 2021). Tingkat keberhasilan ekspresi protein rekombinan tidak hanya dipengaruhi oleh jenis strain yang digunakan, tetapi juga oleh kondisi kultur dan parameter ekspresi seperti suhu, pH, konsentrasi inducer, waktu induksi, dan komposisi medium kultur (Hayat *et al*., 2018).

Penelitian Zhang *et al.* (2018) dan Mani *et al.* (2024) melaporkan bahwa perlakuan variasi suhu inkubasi pascainduksi, konsentrasi Isopropil β-D-1-tiogalaktopiranosida (IPTG), dan waktu pascainduksi berpengaruh signifikan terhadap tingkat ekspresi dan kualitas protein rekombinan. Studi ekspresi LDH rekombinan oleh Ali *et al*. (2023) menyebutkan bahwa penggunaan suhu rendah (15 °C) dan konsentrasi IPTG 0,1 mM dapat meningkatkan kelarutan LDH rekombinan dan mengurangi terjadinya *inclusion body*. Penelitian lain oleh Esa *et al*. (2023) berhasil mengekspresikan LDH rekombinan dengan aktivitas biologis yang signifikan.

Hingga saat ini, penelitian yang mengkaji tentang pengaruh konsentrasi inducer, suhu dan waktu pasca induksi pada ekspresi LDH rekombinan dari *P. pentosaceus* masih terbatas. Lebih lanjut, belum ada penelitian yang menggunakan pendekatan *One Factor at a Time* (OFAT) sebagai optimasi awal pada produksi enzim LDH rekombinan untuk memperoleh data awal sebelum optimasi lanjutan yang lebih kompleks (Uhoraningoga *et al*., 2018).

Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk menilai dan menetapkan kondisi optimal konsentrasi inducer, suhu dan waktu pascainduksi agar dapat meningkatkan produksi sekaligus mengevaluasi

aktivitas enzimatik D-LDH dan L-LDH terhadap substrat piruvat sebagai prekursor asam laktat pada kondisi optimal yang telah ditentukan, sehingga menyediakan data empiris sebagai acuan untuk produksi LDH rekombinan pada skala laboratorium maupun industri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka didapatkan rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

1.2.1 Bagaimana pengaruh variasi suhu, konsentrasi IPTG, dan waktu pascainduksi terhadap produksi protein dan aktivitas enzim D-LDH dan L-LDH rekombinan *P. pentosaceus* InaCC B159 pada sistem ekspresi *E. coli* BL21 (DE3)?

1.2.2 Berapakah kondisi optimal suhu, konsentrasi IPTG, dan waktu pascainduksi yang menghasilkan tingkat produksi tertinggi enzim D-LDH dan L-LDH rekombinan tersebut pada sistem ekspresi *E. coli* BL21 (DE3)?

1.2.3 Bagaimana aktivitas enzimatik D-LDH dan L-LDH rekombinan tersebut terhadap substrat piruvat?

1.2.4 Bagaimana pengaruh penyisipan gen *ldhD* dan *ldhL* terhadap tingkat produksi asam laktat pada *E. coli* BL21 (DE3)?

1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin dicapai melalui penelitian ini, yaitu:

1.3.1 Menganalisis pengaruh variasi variasi suhu, konsentrasi IPTG, dan waktu pascainduksi terhadap produksi protein D-LDH dan L-LDH rekombinan *P. pentosaceus* InaCC B159.

1.3.2 Menetapkan kondisi optimal suhu, konsentrasi IPTG, dan waktu pascainduksi yang mampu meningkatkan produksi enzim D-LDH serta L-LDH rekombinan tersebut.

1.3.3 Mengevaluasi aktivitas katalitik D-LDH dan L-LDH rekombinan tersebut terhadap susbtrat piruvat pada kondisi produksi optimum.

1.3.4 Menganalisis pengaruh penyisipan gen *ldhD* dan *ldhL* dari *P. pentosaceus* terhadap tingkat produksi asam laktat pada *E. coli* BL21 (DE3).

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat sebagai berikut:

1.4.1 Memberikan gambaran awal mengenai pengaruh variasi suhu, konsentrasi IPTG, dan waktu pascainduksi terhadap produksi protein serta aktivitas enzim D-LDH dan L-LDH rekombinan *P. pentosaceus* InaCC B159.

1.4.2 Menetapkan kondisi ekspresi optimal yang dapat digunakan sebagai acuan dasar dalam produksi enzim D-LDH dan L-LDH rekombinan tersebut pada skala laboratorium maupun pengembangan awal skala industri.

1.4.3 Memberikan kajian aktivitas enzimatik D-LDH dan L-LDH rekombinan tersebut terhadap substrat piruvat sebagai landasan pemanfaatan kedua isoenzim tersebut pada aplikasi biokatalis maupun bioproduksi.

1.4.4 Mengetahui pengaruh penyisipan gen *ldhD* dan *ldhL* dari *P. pentosaceus* terhadap tingkat produksi asam laktat yang dihasilkan pada *E. coli* BL21 (DE3).