

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker adalah penyebab utama kematian terbesar kedua secara global, telah terhitung terdapat sekitar 9,6 juta kasus kematian pada tahun 2018. Kanker paru-paru, prostat, kolorektal, lambung, dan hati adalah jenis kanker yang paling umum terjadi pada pria, sedangkan kanker payudara, kanker kolorektal, paru-paru, serviks dan tiroid adalah yang paling umum di antara wanita. (WHO, 2021). Secara umum, kanker dapat disebabkan karena adanya mutasi pada gen yang belum sempurna, Sehingga terjadi akumulasi penumpukan sel-sel yang rusak. Mutasi dapat disebabkan oleh paparan karsinogen, radiasi, atau infeksi oleh bakteri dan virus. (Ningrum, 2014). Pengobatan kanker dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti pembedahan, kemoterapi, radioterapi, imunoterapi, terapi gen, atau terapi protein.

Banyak penelitian yang telah dikembangkan untuk dapat memproduksi suatu obat atau protein terapeutik untuk terapi penyembuhan kanker. Salah satunya adalah Interferon- α 2b (IFN α 2b), karena protein tersebut memiliki aktivitas antiproliferatif. Protein terapeutik tersebut banyak diproduksi sebagai protein rekombinan dengan menggunakan teknologi DNA rekombinan. Suatu teknologi yang dapat digunakan untuk memproduksi suatu protein yang diinginkan dalam jumlah yang besar dengan menggunakan mikroorganisme sebagai sel inang (Brown, 2010). IFN α 2b rekombinan pertama kali disetujui sebagai protein terapeutik oleh *United States Food and Drug Administration* (FDA) pada tahun 1986. Hingga saat ini sebanyak 86 negara telah menggunakan IFN α 2b rekombinan dalam pengobatan kanker dan hepatitis (Ningrum, 2014). Protein dengan berat molekul 19,4 kDa tersebut memiliki fungsi dalam mengobati beberapa penyakit termasuk beberapa jenis kanker, seperti leukemia sel berbulu, melanoma, karsinoma sel ginjal, dan sarkoma kaposi terkait AIDS (Srivastava *et al.*, 2005). Selain itu, IFN α 2b juga digunakan untuk mengobati kutil kelamin dan beberapa jenis hepatitis (Guttermann, 1994).

Saat ini IFN α 2b rekombinan dan sebagian besar protein rekombinan untuk penggunaan terapeutik lainnya yang berasal dari manusia diekspresikan dalam mikroorganisme seperti bakteri, *yeast*, atau sel hewan dalam kultur. Ekspresi fungsional protein rekombinan pada sel inang prokariotik seperti *Escherichia coli* merupakan hal yang sangat dipertimbangkan dalam industri, dengan aplikasi mulai dari protein terapeutik hingga enzim rekombinan (Dragosits *et al.*, 2012). *E. coli* menjadi salah satu sel inang prokariotik yang paling menarik karena kemampuannya untuk tumbuh dengan cepat pada sumber karbon yang murah, akumulasi biomassa yang cepat, dan proses *scale up* yang mudah (Baneyx, 1999). Selain itu, genetika *E. coli* telah terkarakterisasi dengan baik sehingga banyak rekayasa genetika yang sudah dilakukan untuk memfasilitasi kloning dan ekspresi gen (Baneyx & Mujacic, 2004).

Tujuan utama dari ekspresi protein rekombinan dalam hal ini IFN α 2b adalah menghasilkan protein dalam jumlah besar dan fungsional serta terlarut. Namun, hal tersebut menjadi tantangan apabila menggunakan *E. coli* sebagai sel inang untuk memproduksi IFN α 2b rekombinan yang merupakan protein dari sel eukariotik. Kelemahan dari *E. coli* sebagai sel inang adalah kecenderungannya untuk memproduksi protein sel eukariotik dalam badan inklusi yang menyebabkan protein menjadi tidak aktif (Francis & Page, 2010). Badan inklusi merupakan agregat yang terbentuk pada saat proses ekspresi tingkat tinggi protein heterolog yang terjadi di *E. coli*. Badan inklusi yang terbentuk akan terlokalisasi di periplasma (García-Fruitós *et al.*, 2011). Agregasi protein tersebut dapat terjadi karena adanya proses salah pelipatan yang disebabkan oleh konsentrasi atau jumlah rantai polipeptida yang tinggi dari ribosom, pelipatan yang tidak efisien, dan tidak tersedianya *molecular chaperones* (Upadhyay *et al.*, 2012).

Saat ini, produksi IFN α 2b rekombinan banyak dilakukan dengan menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Di mana protein rekombinan yang diekspresikan membentuk badan inklusi yang kemudian dilarutkan dengan menggunakan *refolding solution*. Hal ini tidak efektif, karena proses untuk memperoleh protein yang memiliki aktivitas biologis dari badan inklusi relatif mahal dan *yield* yang dihasilkan sangat rendah (Singh *et al.*, 2015). Sehingga perlu

adanya proses tambahan yang membutuhkan waktu dan juga penambahan biaya produksi. Oleh karena itu, produksi protein rekombinan yang terlarut perlu dimaksimalkan pada saat proses ekspresi itu sendiri berlangsung (Sørensen & Mortensen, 2005).

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Bui *et al* (2019) adalah membangun suatu sistem biologi sintetik di mana *molecular chaperone* dapat berinteraksi langsung dengan protein rekombinan tepat selama protein rekombinan disintesis pada proses translasi. Sistem tersebut adalah *chaperone-substrate co-localized expression* (CLEX). Secara singkat, sistem ini menempatkan gen penyandi *molecular chaperone* yakni DnaJ dan protein target secara berdekatan yang dipisahkan oleh *stop codon* dan *start codon* yang saling tumpang tindih dalam satu *cistron*. Sistem tersebut memungkinkan agar DnaJ dan protein target dapat berada dalam lokasi yang berdekatan serta dapat berinteraksi secara langsung selama proses translasi protein rekombinan untuk mencegah terjadinya agregasi. Sistem CLEX ini terbukti meningkatkan solubilitas protein yang memiliki ukuran kurang dari 57kDa, contohnya protein HIV1-Pr, UbiC, ScFv, dan Leptin. Bahkan pada kondisi optimum, protein rekombinan dapat diproduksi hingga 90% pada fraksi terlarutnya saat menggunakan sistem CLEX. Hingga saat ini, sistem *chaperone* belum pernah digunakan untuk meningkatkan produksi protein terapeutik IFN α 2b dalam kondisi terlarut.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan ekspresi IFN α 2b rekombinan yang terlarut dengan sistem CLEX di *E. coli*. dan ditentukan kondisi optimum ekspresinya. Beberapa kondisinya meliputi suhu saat induksi, konsentrasi Isopropil β -D-1-tiogalaktopiranosida (IPTG) sebagai *inducer*, serta waktu induksi. Dalam penelitian ini digunakan plasmid rekombinan pRSFDuet-1-IFN α 2b/J. Pada plasmid rekombinan tersebut terdapat gen yang menyandi penanda polihistidin atau *His-tag*, yakni urutan asam amino yang terdiri dari setidaknya enam residu histidin yang terdapat pada ujung N- dalam protein IFN α 2b rekombinan. *His-tag* merupakan protein penanda yang dapat digunakan untuk memurnikan protein rekombinan dengan metode kromatografi afinitas (Kinsland, 2010). Oleh karena itu, pada penelitian juga dilakukan purifikasi

IFN α 2b rekombinan terlarut secara parsial dengan menggunakan kromatografi afinitas.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kondisi optimum ekspresi IFN α 2b rekombinan terlarut di *E. coli* dengan sistem CLEX?
2. Apakah IFN α 2b rekombinan terlarut di *E. coli* dengan sistem CLEX dapat dimurnikan menggunakan kromatografi afinitas?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menentukan kondisi optimum ekspresi IFN α 2b rekombinan terlarut di *E. coli* dengan sistem CLEX
2. Memurnikan IFN α 2b rekombinan terlarut di *E. coli* dengan sistem CLEX menggunakan kromatografi afinitas.

1.4 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi riset dalam memproduksi protein-protein rekombinan terlarut yang lain dengan menggunakan sistem CLEX. Selain itu, penelitian dengan menggunakan sistem CLEX ini dapat berkontribusi bagi ilmu pengetahuan khususnya bidang bioteknologi di Indonesia.