

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI) merupakan protein non-glikosilasi yang memiliki pH isoelektrik  $\approx 9,5$  dan berat molekul sebesar 11,7 kDa. Protein ini berperan dalam mempercepat penyembuhan luka dengan cara menghambat proses proteolisis pada luka. Proteolisis disebabkan oleh produksi enzim serin protease yang berlebih. Ada beberapa tahap proses penyembuhan luka yaitu aktivasi hemostatis, inflamasi, proliferasi, dan pembentukan jaringan ikat (Grab and Smith, 2007). Suatu penelitian menunjukkan bahwa mencit yang kekurangan SLPI akan mengalami peningkatan inflamasi akibat degradasi jaringan oleh enzim serin protease. Hal ini menyebabkan penyembuhan luka pada mencit lebih lambat dibandingkan dengan mencit yang telah direkayasa dengan gen penyandi SLPI (Ashcroft *et al.*, 2000). Proses inflamasi ini melibatkan sel radang meliputi netrofil, monosit, eosinofil, basofil, limfosit, dan trombosit. Saat inflamasi terjadi akan disertai dengan degranulasi sel. Pada saat itu terjadi pelepasan beberapa serin protease (Doumas *et al.*, 2005). Aktivitas proteolitik dari serin protease dapat diregulasi oleh minimal tiga inhibitor protease, yakni tripsin, SLPI dan elafin (Zani *et al.*, 2004).

Kehadiran inhibitor serin protease seperti SLPI dapat mengurangi terjadinya inflamasi. SLPI melindungi jaringan dari degradasi protease melalui pembentukan kompleks reversibel dengan enzim serin protease seperti; elastase, *cathepsin G*, *trypsin* dan *chymotrypsin* yang dilepaskan dari leukosit selama proses inflamasi (Li *et al.*, 2010). Selain aktivitasnya sebagai anti-protease dan anti-inflamasi, SLPI juga diketahui memiliki aktivitas anti-bakteri, anti-jamur serta anti virus (Doumas *et al.*, 2005). Mekanisme antibakteri oleh SLPI adalah dengan pengikatan protease inhibitor ke dalam DNA atau mRNA bakteri. Sebagai antivirus, SLPI mampu menghambat pertumbuhan virus antara lain virus influenza A dan HIV tipe-I. SLPI memiliki aktivitas anti HIV dengan beberapa

penghambatan di antaranya antibodi spesifik virus, mucins, dan thrombospondins (McNeely *et al.*, 1995).

Gen penyandi SLPI tersusun atas dua domain dengan empat ekson dan tiga intron. Bagian domain yang mengikat dan menginhibisi protease target yaitu domain C-terminal. Sementara domain yang menstabilkan kompleks protease-inhibitor, memediasi pengikatan heparin, serta yang berperan sebagai anti-bakteri dan anti-fungal adalah domain N-terminal. Domain C-terminal terdapat pada residu 53 hingga 107 dan memiliki sisi pengikat protease pada residu 67 hingga 74. Sedangkan domain N-terminal terdapat pada residu 1 hingga 51. Antar domain C-terminal dan N-terminal dihubungkan oleh empat ikatan disulfida yang menyebabkan SLPI memiliki struktur protein yang kompak (Ying, 1994). SLPI dapat ditemukan pada darah, sekresi mukosal termasuk saliva, seminal plasma, dan servikal, nasal, dan bronkial mucus (Yang, *et al.*, 2005). SLPI dapat pula ditemukan pada membran amnion yang menyelubungi fetus. Membran amnion terdiri lapisan luar yang membentuk kantung dan membran dalam yang terfiksasi kuat dengan mesenkim (Helmig *et al.*, 1994).

Dewasa ini penggunaan membran amnion banyak dimanfaatkan untuk bidang kesehatan, seperti perawatan luka bakar, ulkus kronis, cacat dural, rekonstruksi peritoneal dan genital, perbaikan saraf, dan operasi plastik (Fairbrain *et al.*, 2014). Bahan aktif yang mempunyai pengaruh terbesar dalam penyembuhan luka pada amnion adalah SLPI. Seiring dengan kemajuan teknologi genetika, SLPI telah banyak diisolasi dan direkayasa ke dalam beberapa sel inang, baik bakteri maupun *yeast*. SLPI rekombinan pada membran amnion berpotensi sebagai kandidat obat yang mampu mempercepat penyembuhan luka. Hasil penelitian telah berhasil mengisolasi dan mengekspresikan gen penyandi SLPI dari membran amnion ke dalam *E. coli* BL21star sebagai *recombinant full-length* SLPI (Munadzirah, 2008). Penelitian selanjutnya juga berhasil menunjukkan adanya inhibisi SLPI terhadap *porcine pancreatic elastase* (PPE).

Kemampuan inhibisi SLPI dapat dianalisis melalui konstruksi gen penyandi SLPI. SLPI membran amnion diklon ke dalam pET30a dan diekspresikan ke dalam *E. coli* BL21. Keaktifan inhibisi dari SLPI akan dilihat

pengaruhnya terhadap letak polihistidin tag dari SLPI. Tiga konstruksi dibedakan menjadi; (i) SLPI dengan posisi his tag pada N-terminal (pET-NSLPI), (ii) SLPI dengan posisi his tag pada C-terminal (pET-CSLPI) dan (iii) SLPI dengan posisi his tag paralel di N- dan C-terminal (pET-PSLPI). Ketiga konstruksi ini akan diamplifikasi dengan desain primer sesuai dengan kebutuhan konstruksi.

Tag polihistidin berfungsi untuk mempermudah pemurnian protein dengan imobilisasi kromatografi afinitas. Tipe dan posisi tag secara signifikan dapat berpengaruh terhadap protein seperti pada tingkat ekspresi, kelarutan, dan abilitasnya dalam bentuk sampel yang cocok. Secara sistematis efek dari panjang his tag dan posisinya berhubungan dengan ekspresi dan purifikasi protein khususnya pada sistem *E. coli* vektor pET yang memiliki 6-10 his tag pada posisi N- atau C- terminal dari gen subklon. Panjang dan posisi tag berpengaruh pada saat pemurnian protein dalam pengikatannya terhadap resin Ni<sup>2+</sup> atau Co<sup>2+</sup>. Posisi tag N- atau C- terminal memiliki efek terhadap *yield* protein target (Mohanty and Wiener, 2004).

Aktivitas inhibisi dari *recombinant full-length* SLPI (Munadzirah, 2008) aktif pada domain C-terminal. SLPI ini memiliki histag yang terletak berdekatan dengan pusat inhibisi SLPI. Letak histag yang berdekatan dengan domain aktif SLPI memungkinkan terjadinya gangguan bioaktivitas SLPI, yaitu aktivitasnya dalam menginhibisi suatu enzim. Keadaan ini bisa diatasi dengan teknik konstruksi gen. Pengaturan posisi tag polihistidin bisa membantu agar tidak menyebabkan gangguan terhadap aktivitas inhibisi SLPI. Dengan membuat konstruksi posisi his tag berjauhan dengan domain aktif, diharapkan dapat aktivitas inhibisi dari SLPI tidak terganggu oleh adanya his tag.

## 1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah desain konstruksi vektor ekspresi gen penyandi SLPI dengan variasi posisi tag polihistidin yang tidak mengganggu aktivitas inhibisi protein SLPI membran amnion?

2. Bagaimanakah kemampuan inhibisi dari SLPI rekombinan pET-NSLPI, pET-CSLPI dan pET-PSLPI terhadap enzim *porcine pancreatic elastase*?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk melakukan konstruksi gen penyandi SLPI untuk meningkatkan aktivitas inhibisi sebagai kandidat bahan aktif penyembuhan luka.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Mendesain vektor ekspresi gen penyandi SLPI dengan variasi posisi tag polihistidin yang tidak mengganggu aktivitas inhibisi protein SLPI membran amnion.
2. Membandingkan kemampuan inhibisi dari SLPI rekombinan pET-NSLPI, pET-CSLPI dan pET-PSLPI terhadap enzim *porcine pancreatic elastase*.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat keilmuan**

Mendapatkan SLPI rekombinan yang lebih aktif dalam menghambat enzim *porcine pancreatic elastase*.

#### **1.4.2 Manfaat praktis**

Mendapatkan sediaan SLPI rekombinan untuk dapat digunakan sebagai bahan aktif untuk mempercepat penyembuhan luka