

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Luka merupakan kerusakan kontinuitas kulit, mukosa membran, dan tulang atau organ tubuh lain sehingga menimbulkan efek yang traumatis (Ismail, 2009). Menurut Bachsinar (1995), luka merupakan gangguan kontinuitas jaringan pada kulit, sehingga terjadi pemisahan jaringan yang semula normal menjadi tidak normal. Luka terbuka sering mengalami infeksi dan menyebabkan keterlambatan kesembuhan luka. Salah satu contoh luka terbuka adalah luka akibat terapi reresi gingiva yang terjadi pada gusi. Perawatan reresi gingiva dapat dilakukan dengan cara bedah. Tindakan ini akan menimbulkan luka muko gingiva yang cukup besar sedangkan keadaan steril (bebas dari bakteri) sulit dilakukan dalam rongga mulut. Kontaminasi bakteri akan menyebabkan komplikasi lanjut sehingga terjadi *cellulitis*, abses bahkan *osteomyelitis*. Perawatan untuk reresi gingiva dapat dilakukan proses pembedahan sedangkan luka muko gingiva yang ditimbulkan hanya dilindungi dengan *periodontal pack* tanpa pemberian bahan aktif yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka.

Penelitian mengenai obat penyembuh luka dari bahan-bahan alami telah banyak dilakukan, seperti penggunaan ekstrak sirih merah (Wibawati, 2012), dan ekstrak buah *Elaeagnus angustifolia* (Natanzi dkk., 2012). Obat-obatan dengan bahan dasar alami lebih diminati oleh para ahli di bidang medis sebagai obat alternatif yang lebih murah, memiliki efek samping lebih kecil, ketersediaannya terus-menerus dan dalam jumlah besar. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk mempercepat proses penyembuhan luka adalah membran amnion. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan membuktikan bahwa membran amnion dapat digunakan untuk perawatan luka diantaranya pada perawatan luka bakar (Ley-Chaves dkk., 2003), serta luka di bagian mata (Heinz dkk., 2004; Takahiro dkk., 2004).

Penelitian Ashcroft dkk. (2000) dan Zhang dkk. (2001) menemukan bahan aktif alami dari membran amnion manusia yang berpengaruh terhadap

proses penyembuhan luka adalah *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI). Fungsi protein SLPI meliputi penghambatan protease, kontrol aktivitas leukosit, mengurangi  $TGF-\beta$ , anti inflamasi, anti bakteri, kontrol enzim intraseluler, menekan monosit dan *matriks metallo proteinase* (MMP) (Zhang dkk., 2002).

Munadzirah (2008) telah berhasil mengisolasi gen penyandi *SLPI* dari membran amnion manusia dan mengkloning gen ke dalam sel inang *Escherichia coli* BL21star. Penelitian Purnamasari (2011) telah berhasil memurnikan protein SLPI membran amnion manusia menggunakan *FPLC* dan menganalisis aktivitas inhibisinya dengan substrat *porcine pancreatic elastase* (PPE). Kelemahan ekspresi di sel inang *E. coli* adalah protein SLPI diekspresikan dalam jumlah kecil. Selain itu, protein SLPI tidak mampu disekresikan ke media pertumbuhan bakteri (ekstraseluler) sehingga kurang menguntungkan secara komersial. Protein intraseluler membutuhkan proses preparasi yang lebih rumit, mahal, dan kurang efisien. Awalnya proses produksi secara komersial untuk protein SLPI rekombinan diperoleh dengan menggunakan *E. coli* sebagai sel inang. Akan tetapi, ekspresi pada sel inang *E. coli* memiliki kelemahan karena *E. coli* merupakan mikroba prokariot sedangkan protein SLPI berasal dari membran amnion manusia (eukariot). Secara umum, organisme prokariot memiliki pirogen-pirogen dinding sel yang bersifat toksik (endotoksin) sehingga protein rekombinan yang dihasilkan akan terkontaminasi dan menimbulkan keraguan dalam aplikasi medis meskipun teknologi pemurnian protein sudah semakin canggih. Sel inang yang dianggap paling aman untuk keperluan komersial adalah ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Ragi ini telah dimanfaatkan dalam proses produksi makanan dan minuman. Ragi *Saccharomyces cerevisiae* menjadi mikroorganisme yang secara umum dikenal aman oleh *the American Food and Drug Administration* (FDA), disebut juga *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Banyak protein rekombinan telah diekspresi dan disekresi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* sebagai sel inang (Dominguez dkk., 1998). Protein yang diekspresikan di sel inang ragi umumnya ditargetkan untuk jalur sekresi ke media pertumbuhan sehingga mempermudah proses pemurnian protein.

Protein yang disekresikan oleh ragi (sel eukariot) biasanya memiliki perpanjangan hidrofobik pada ujung amino disebut signal peptida. Signal peptida akan memediasi translokasi ko-translasi protein untuk masuk ke retikulum endoplasma (RE) yang merupakan tahap awal jalur sekresi (Simonen dan Palva, 1993; Chung dkk., 1996). Penelitian yang dilakukan oleh Wirajana (2010) telah berhasil mengkonstruksi vektor sekresi pYHM1 dari vektor pYES2 yang disisipi signal peptida HM1, yang merupakan *killer toxin* dari *Hansenula mrakii* IFO 0895. Konstruksi vektor pYHM1-Af menggunakan sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 mampu mengekspresikan dan mensekresikan  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (AbfA) termostabil. Vektor pYHM1 mampu mensekresi protein rekombinan menggunakan sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 karena gen penyandi protein rekombinan telah difusikan dengan signal peptida HM1.

Penelitian konstruksi gen penyandi *secretory leukocyte protease inhibitor* di ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini menggunakan vektor sekresi pYHM1 dan sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 untuk mengkloning gen penyandi *SLPI* dari membran amnion manusia. Vektor pYHM1 dipilih agar didapatkan protein *SLPI* rekombinan yang tersekresi ke media pertumbuhan (ekstraseluler). Penelitian ini penting untuk dilakukan karena diharapkan akan mengekspresikan protein *SLPI* dalam konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan di sel inang *E. coli* BL21star, sehingga dapat digunakan sebagai kandidat biomaterial yang mampu mempercepat proses penyembuhan luka. Pada penelitian ini dilakukan uji kemampuan inhibisi *SLPI* terhadap enzim *porcine pancreatic elastase* (PPE) dalam rangka studi karakterisasi protein *SLPI* rekombinan. Aplikasi *SLPI* lebih lanjut akan digunakan untuk kepentingan klinis dan diproduksi dalam bentuk salep penyembuh luka.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut.

1. Apakah gen penyandi *SLPI* dapat diekspresikan menggunakan sistem vektor pYHM1 di sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 ?
2. Apakah protein SLPI rekombinan dapat disekresikan ke dalam medium pertumbuhan ?
3. Bagaimanakah kemampuan inhibisi protein SLPI dari membran amnion dengan menggunakan sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 terhadap enzim PPE ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum**

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan SLPI membran amnion rekombinan sebagai kandidat biomaterial yang berperan mempercepat penyembuhan luka dalam proses degradasi jaringan saat terjadi inflamasi.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

Tujuan khusus dari penelitian ini meliputi.

1. Mengekspresikan gen penyandi *SLPI* menggunakan sistem vektor pYHM1 di sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824.
2. Mensekresikan protein SLPI rekombinan ke dalam medium pertumbuhan.
3. Mengetahui kemampuan inhibisi protein SLPI dari membran amnion dengan menggunakan sel inang ragi *Saccharomyces cerevisiae* BJ1824 terhadap enzim PPE.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah protein SLPI rekombinan yang disekresikan ke medium pertumbuhan dapat digunakan sebagai biomaterial yang dapat mempercepat penyembuhan luka terbuka.