

DESAIN SISTEM *E. coli* SEBAGAI PENGIKAT LIMBAH BESI UNTUK APLIKASI PENGOLAHAN AIR LIMBAH MENGGUNAKAN PENDEKATAN BIOLOGI SINTETIS

Indah Oktaviani¹

¹Program Studi Biologi, Jurusan Sains, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

Abstract:

The development of recombinant DNA technology and the emerging field of synthetic biology have open up a more advanced era of biotechnology. The discoveries are developed to solve the existing problems in the community. The presence of the iGEM competition initiated by the iGEM Foundation since 2003 adding up new data and a new discovery that is constantly being improved upon, so that peoples' interest and concern with synthetic biology in the world are increasing every year, including in Indonesia. This paper discusses the idea of design to develop an expression system with a synthetic biology approach using standard parts listed on the iGEM website. The system design uses *Escherichia coli* as its chassis to have the capability as an iron waste bioaccumulator agent in the waters. This idea is expected to be one of the contributions and inspiration for the future of the development of synthetic biology research and applications in handling environmental problems in Indonesia.

Keyword: synthetic biology, biotechnology, iGEM, *E. coli*, bioaccumulator

1. Pendahuluan

Biologi sintetis merupakan perancangan sistem biologis buatan yang lebih kompleks dalam menyelidiki fenomena biologis alami dan berbagai aplikasinya [1], berbeda dengan teknik rekayasa klasik yang memungkinkan peneliti mentransfer unit tertentu dari informasi genetik antar organisme untuk memperbaiki nilai mereka dengan menghasilkan protein atau materi yang diinginkan [2]. Sistem dalam biologi sintetis tersusun dari serangkaian komponen dasar (*basic building blocks*) yang secara sederhana sering diumpakan seperti penyusunan blok dalam permainan lego. Rangkaian komponen yang digunakan merupakan bagian biologis fungsional pengkode promoter, gen, ataupun terminator yang bertindak sebagai saklar untuk menghasilkan biokatalis atau protein di dalam suatu sistem. Berkat evolusi teknik *in vitro*, penyediaan komponen dalam sistem biologi sintetis dapat dilakukan dengan cara dirakit atau diubah kemudian disintesis secara kimiawi (misalnya nukleotida dan asam amino buatan) dan diterapkan ke dalam bagian fungsional, untuk memperbaiki sifat dan struktur kimianya sehingga memiliki sifat yang baru [3].

Selain kebutuhan akan tersedianya data dalam sistem biologi yang lebih lengkap untuk mendukung inovasi dan kebaruan dalam biologi sintetis, pengenalan pengetahuan baru mengenai biologi sintetis juga dibutuhkan. Pada tahun 2003, Yayasan *International Genetically Engineered Machine* (iGEM), yang diprakarsai oleh MIT, mengadakan kompetisi baru yang disebut sebagai kompetisi iGEM. Yayasan iGEM adalah organisasi nirlaba independen yang berdedikasi pada pendidikan dan kompetisi, kemajuan biologi sintetis, dan pengembangan komunitas dan kolaborasi terbuka [4]. Salah satu program utama dari iGEM adalah mengumpulkan koleksi bagian genetik yang dapat digunakan untuk membangun perangkat dan sistem biologi yang kemudian didaftarkan ke dalam website register standar parts biologis yang disebut sebagai Biobricks dan saat ini jumlahnya telah mencapai lebih dari 20.000 parts. Database biobricks bisa diakses secara bebas melalui situs iGEM. Keterbukaan dan kemudahan dalam mengakses penelitian yang dilakukan oleh siswa SMA, sarjana, dan mahasiswa pasca sarjana dapat membuka wawasan dalam menciptakan inovasi dan kolaborasi baru dalam mengkarakterisasi sistem yang sudah ada atau benar-benar menghasilkan suatu sistem baru.

Salah satu contoh yang dapat dilakukan dalam mempelajari dan mengembangkan biologi sintetis adalah dengan membuat suatu ide-ide sederhana menggunakan sekuens biobricks yang telah tersedia dan dapat diakses secara langsung di web iGEM sebagai suatu desain/rancangan/simulasi dalam menangani berbagai macam permasalahan yang ada saat ini. Disini kami mengambil salah satu permasalahan lingkungan untuk diselesaikan dengan menciptakan suatu rancangan desain ekspresi bakteri menggunakan pendekatan biologi sintetis. Tujuan dari rancangan desain ini adalah untuk merekonstruksi gen sintetis dalam suatu sistem baru untuk diterapkan dalam *Escherichia coli*, sehingga

bakteri tersebut dapat menangkap dan mengakumulasi limbah logam berat, yaitu besi dalam bentuk ion Ferri (Fe^{3+}) dan Ferro (Fe^{2+}) di lingkungan industri (Agen Bioakumulator). Hal ini dilakukan sebagai salah satu contoh upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi pencemaran perairan akibat logam berat dengan pengembangan pengetahuan berbasis biologi sintetis. Parts yang digunakan dalam desain ini diadopsi dari biobricks yang tersedia di website iGEM.

2. Rancangan Desain

2.1 Studi Literatur dan Perancangan Sistem*

Database yang terkumpul di website iGEM dikaji terlebih dahulu yang dilakukan secara bertahap dengan kajian teori dasar dan literatur pendukung, sebelum akhirnya dilakukan pemilihan parts yang akan digunakan di dalam sistem ekspresi *E. coli* (Seperti promoter, gen khusus, dan terminator). Sekuens parts standar yang akan digunakan dikumpulkan kemudian dirancang untuk membuat suatu sistem baru menggunakan pendekatan bioinformatika menggunakan software untuk membangun sirkuit yang akan memperkenalkan atau memodifikasi fungsi biologis. Software yang digunakan dalam perangkaian parts standar yang digunakan adalah snapgene[5].

*) Tahapan perancangan dalam studi ini hanya dilakukan hingga tahap perangkaian, tanpa optimasi kodon usage yang biasa dilakukan dalam tahapan transformasi untuk memastikan sistem buatan tidak ditolak oleh vektor, tahapan selanjutnya setelah optimasi kodon usage, dalam biologi sintetik biasanya adalah pemesanan gen sintetik yang dapat dilakukan menggunakan jasa pembuatan gen yang sudah tersedia seperti Integrated DNA Technologies (IDT)

2. 2 Analisis

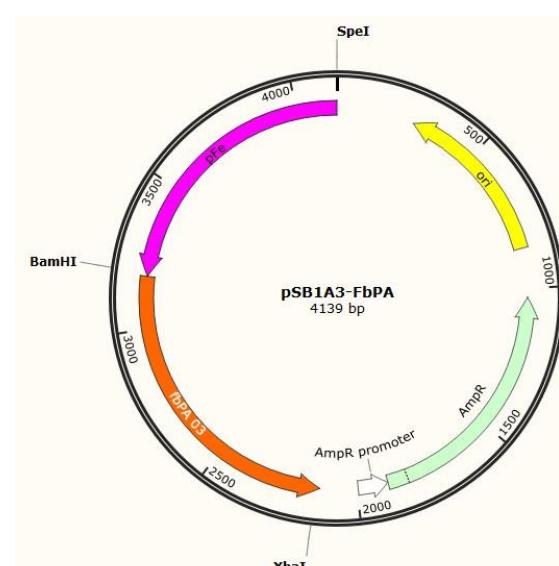
Analisis dilakukan berdasarkan studi literatur mengenai teori dan riset yang menggunakan standar part yang sama dan telah terkumpul dalam website part register iGEM yang terstandarisasi, serta website khusus tim-tim iGem yang mengembangkan parts tersebut.

3. Hasil dan Diskusi

3. 1 Desain *E. coli* sebagai pengikat limbah besi

Dalam menangani pencemaran limbah industri yang mengandung logam berat besi dengan menggunakan pendekatan biologi sintetik, dilakukan pencarian database di website iGEM [6] dan konstruksi menggunakan software snapgene. Berdasarkan hasil pencarian terdapat beberapa parts Biobricks standar yang dapat digunakan dalam rancangan penanganan limbah besi, yaitu Promoter: BBa_I765000 (Promoter sensitif Fe; PFe) yang akan bekerja ketika di lingkungan air sekitarnya terdapat Fe, Coding sequences: BBa_K1122702 (FbPA = Ferric Binding Protein) yang dapat mengekpresikan kemampuan alamiah bakteri dalam menangkap Fe di sekitarnya, dengan menggunakan Backbones plasmid: psB1A3 (Ampisilin resisten, Ori) yang memiliki resistensi ampisilin sebagai indikator seleksi bakteri rekombinan berikut dengan RBS dan terminator. Urutan sekuens dapat dilihat di gambar 1. Chasis yang digunakan adalah *E. coli* sesuai dengan standar laboratorium yang relatif mudah ditemukan. Hasil rancangan konstruksi dapat dilihat pada gambar 2.

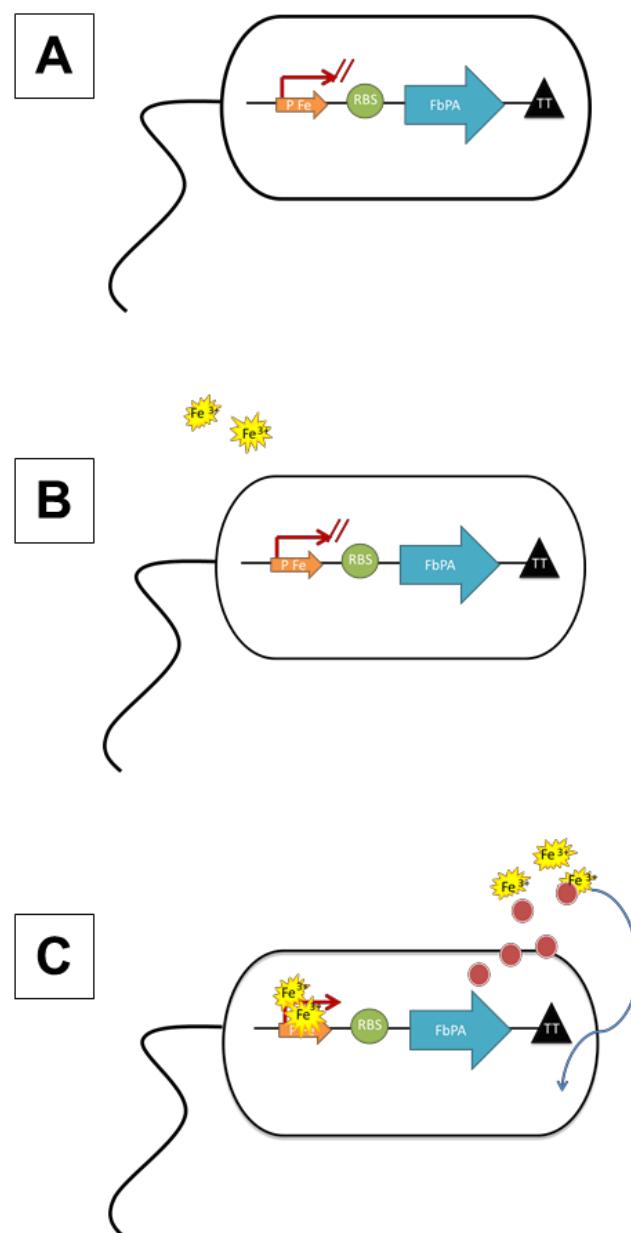
Gambar 1. Urutan sekuens yang digunakan dalam rancangan sistem, tersedia di situs website: ([www. http://parts.igem.org](http://parts.igem.org)).



Gambar 2. Desain konstruksi plasmid di dalam *E. coli* untuk sistem pengikatan limbah besi menggunakan database parts Biobricks yang telah terstandar, tersedia di situs website: (www.igem.org).

3. 2 Prediksi Hasil dari Desain Sistem

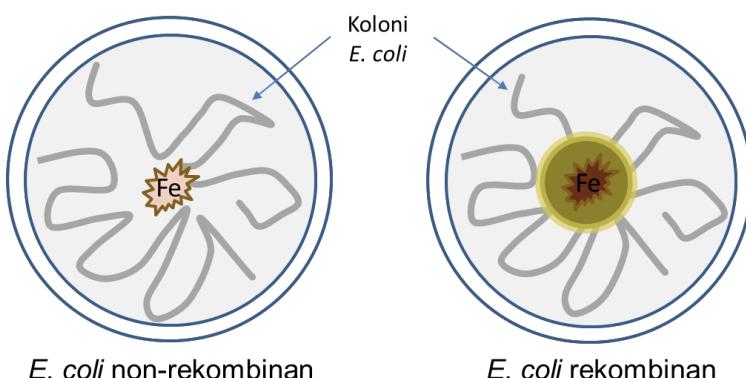
Berdasarkan desain konstruksi plasmid yang dibuat, bakteri *E. coli* akan memiliki kemampuan dalam mengikat limbah besi (Fe) seperti rancangan kerja sistem ekspresi pada gambar 3. Prinsip ini diadopsi dari kemampuan alamiah bakteri dalam mengambil besi dari lingkungan untuk pertumbuhannya. Bakteri memperoleh zat besi ferri dengan memproduksi dan absorpsi dari siderophores atau melalui sistem transpor FbpABC yang berikatan dengan reseptor membran luar khusus yang spesifik untuk mengambil sumber zat besi seperti transferin dan lakoferin dari inang [7][8][9]. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penambahan sistem ke dalam sel bakteri sehingga bakteri akan memiliki kemampuan lebih tinggi dalam mengabsorpsi limbah besi ke dalam sel. Namun karena keterbatasan parts yang tersedia di website iGEM, sistem yang dirancang baru menggunakan sistem transport FbPA saja [10].



Gambar 3. Proses kerja yang diharapkan dari rancangan sistem ekspresi *E. coli* dalam mengikat limbah besi dari lingkungan yang terkontaminasi. A) Mekanisme dalam sel *E. coli* rekombinan tidak bekerja ketika tidak ada besi (Fe) di lingkungan; B) & C) Promotor Fe-sensitif (Pfe) akan bekerja ketika ada Fe di lingkungan sehingga gen FbPA akan diatur dan kemudian meningkatkan kemampuan bakteri *E. coli* untuk mengikat Fe dari lingkungan ke dalam selnya.

Hasil rancangan *E. coli* dalam studi ini menggunakan part promoter konstitutif yang sensitif akan keberadaan Fe di lingkungan, sehingga ketika promoter mendeteksi keberadaan Fe, protein pengakumulasi Fe akan terus diekspresikan. Promoter sensitif Fe diadaptasi dari hasil penelitian tim iGem Colombia-Israel yang dapat diregulasi dalam kondisi lingkungan yang mengandung Fe [11]. Berdasarkan gambar 3, ketika rancangan sistem berhasil bekerja dan sel *E. coli* memiliki kemampuan dalam mengikat besi, maka sel-sel bakteri akan berwarna merah kecoklatan sebagai hasil dari proses akumulasi besi di dalam sel (Gambar 4). Hasil prediksi ini didasarkan pada hasil eksperimen yang telah dilakukan oleh tim iGEM dari Evry [12] dan Edinburgh [10].

Kedua tim berhasil mengekspresikan proses pengikatan besi dengan menggunakan sistem FUR dan biosintesis protein yang berbeda, namun proses tersebut masih membutuhkan regulasi dari IPTG dalam menginduksi operon Lac yang terdapat dalam plasmid. Tim Evry mengembangkan *E. coli* yang memiliki peningkatan kemampuan dalam mengikat besi dengan menghasilkan enterobacter dan aplikasinya ditujukan dalam bentuk kapsul dengan target pasien penderita talasemia. Sedangkan tim Edinburgh mengkelat besi dengan protein A pengikat ion besi (FbpA) (yang digunakan dalam rancangan sistem ini). Protein ini berasal dari *Neisseria gonorrhoeae* yang mampu mengelat berbagai ion dalam larutan seperti Fe^{3+} , Ti^{4+} , Cu^{2+} , Zr^{4+} (ion Zirkonium) atau Hf^{4+} (Hafnium ion) [13]. Hasil penelitian kedua tim menunjukkan adanya peningkatan aktivitas sel bakteri dalam mengakumulasi Fe. Bakteri yang dapat mengakumulasi Fe mengalami perubahan warna sel seperti yang terdapat pada gambar 4. Sistem ekspresi ini merupakan pengembangan sistem sederhana yang tidak memerlukan kontroling, karena promoter yang digunakan akan terus tereskpresi sehingga Fe kan terus dimasukkan ke dalam sel, Bakteri yang telah mengalami fase jenuh, kemudian akan mengalami kematian dan sel bakteri akan tetap berwarna merah kecoklatan seperti gambar 4.



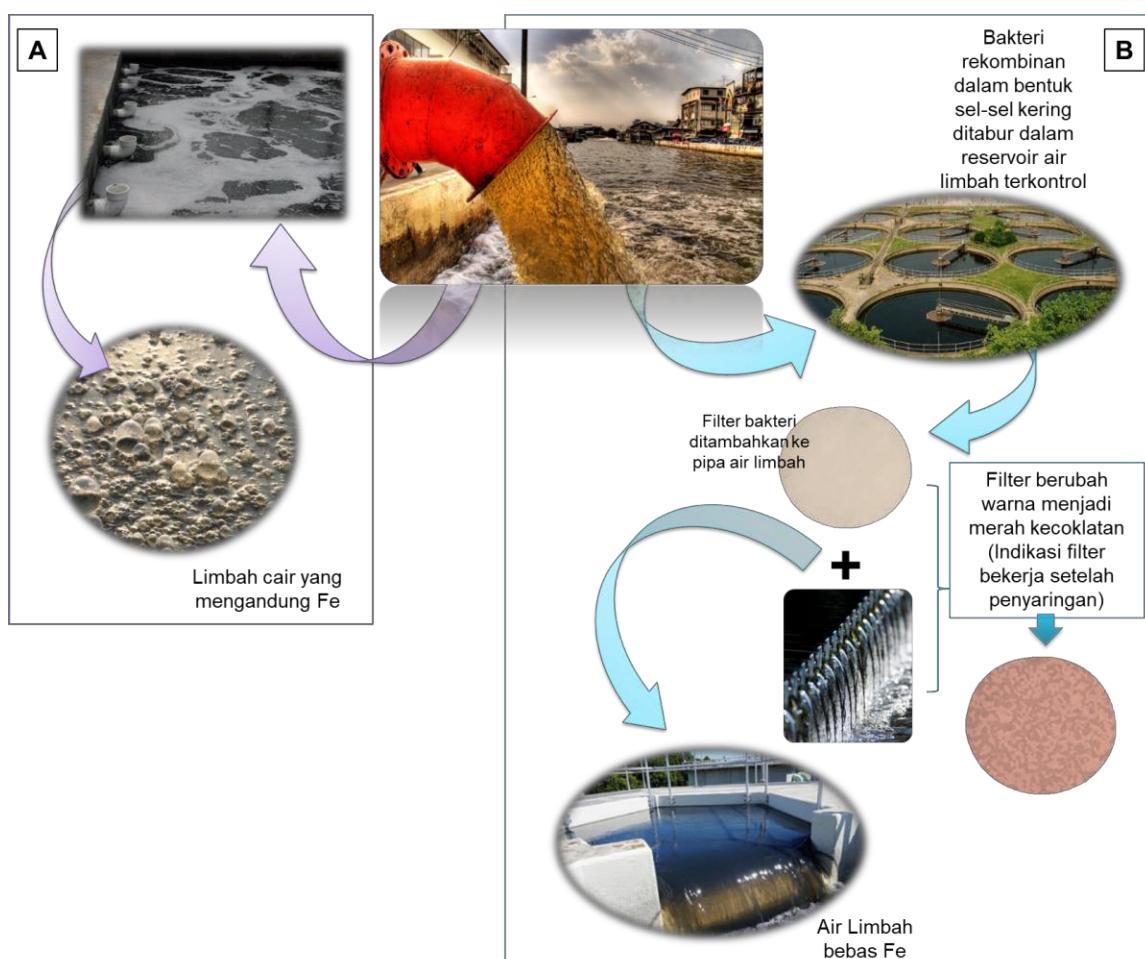
Gambar 4. (Kanan) Koloni *E. coli* rekombinan dapat mengekspresikan FbPA ketika besi diletakkan di tengah cawan petri, dan warna koloni akan menjadi merah kecoklatan akibat dari proses akumulasi. (Kiri) Koloni *E. coli* non-rekombinan tidak dapat mengakumulasi besi dari lingkungan. (Prediksi didasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh tim iGem^[11])

3. 3 Rancangan Penerapan Sistem Ekspresi

Salah satu permasalahan serius yang terjadi akibat meningkatnya aktivitas perindustrian adalah dihasilkannya berbagai jenis limbah logam berat yang dapat menjadi permasalahan bagi kesehatan dan lingkungan baik untuk manusia, hewan, maupun tumbuhan. Jenis logam yang sering ditemukan diantaranya adalah besi. Besi di perairan dapat menyebabkan berbagai masalah estetika dan operasional termasuk bau, perubahan warna, pengendapan dalam distribusi sistem yang mengarah ke pada ledakan populasi dan tingginya tingkat kekeruhan [14].

Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor: 416/ MENKES/PER/IX/90 tentang baku mutu air bersih, kadar besi (Fe) yang diizinkan untuk air bersih maksimal adalah 1,0 mg/l [15]. Pada umumnya ion limbah logam cair biasanya dihilangkan dengan proses presipitasi, evaporasi, ekstraksi pelarut, pertukaran ion, reverse osmosis, atau separasi membran. Namun proses presipitasi dipercaya membutuhkan bahan kimia yang besar dan menghasilkan sampah dalam jumlah besar, sehingga cara ini dirasa belum optimal [16]. Oleh karena itu, dengan menggunakan pendekatan biologi sintetis dilakukanlah perancangan sistem ekspresi untuk dikaji dalam skema penerapan yang memiliki kemungkinan kecocokan dalam penggunaan aplikasi bakteri *E. coli* rekombinan. Salah satu pendekatan

yang dilakukan adalah dengan cara mengeringkan sel bakteri (*dry cell*) kemudian menaburkannya ke dalam reservoir air limbah dengan durasi pengontrolan waktu, termasuk waktu untuk mengaktifkan kembali sel, hingga waktu yang dibutuhkan bakteri untuk mengakumulasi limbah besi. Setelah treatment dilangsungkan maka air kembali dialirkan melalui pipa yang telah diberi beberapa lapis filter dengan ukuran khusus yang dapat menahan sel-sel bakteri *E. coli* yang telah mati agar tidak terlepas ke alam bebas (Gambar 5. B). Sebelum dilepaskan ke alam air limbah diuji terlebih dahulu meliputi keberadaan bakteri rekombinan dan kualitas air limbah yang telah diolah.



Gambar 5. Limbah industri yang mengandung logam berat tidak bisa langsung dibuang ke perairan bebas. Salah satu jenis logam berat yang sering mencemari lingkungan adalah besi (Fe). A) Limbah besi (Fe) dalam yang larut dalam air umumnya berbentuk ion ferric (Fe^{3+}) dan ferro (Fe^{2+}), tersuspensi dalam butir koloid (diameter <1 mm) atau lebih besar seperti $Fe(OH)_3$ [17]; B) Urutan rencana penerapan rancangan desain *E. coli* rekombinan sebagai pengikat limbah besi untuk aplikasi pengolahan air limbah.

4. Kesimpulan

Seiring dengan perkembangan dan pemanfaatan bioteknologi terdapat solusi-solusi yang tersedia dalam menangani masalah lingkungan, salah satunya dengan perancangan bakteri atau mikroorganisme dengan kemampuan bioremediasi yang dapat dikontrol dan dikendalikan sehingga dapat bekerja dengan lebih efektif dan efisien. Pendekatan manipulasi ekspresi gen dengan biologi sintetis menggunakan parts biobricks terstandardisasi yang ada saat ini telah memperluas akses pengembangan sistem ekspresi yang dapat digunakan. Hal ini tentu mempermudah perancangan sistem dan simulasi teori sebelum sistem buatan dalam bakteri diaplikasikan dalam kehidupan nyata. Salah satu contohnya adalah pengembangan bakteri yang memiliki kemampuan sebagai bioakumulator besi yang terdapat dalam limbah perairan. Sistem yang dirancang dalam studi ini masih memerlukan kajian mendalam dan lebih detail dalam aplikasi buatan, uji coba di lapangan, hingga pembuatan sistem kontrol yang lebih efektif dan efisien kedepannya. Diharapkan kajian ini dapat menjadi salah satu inspirasi pengembangan sistem ekspresi organisme dengan pendekatan biologi sintetis di Indonesia.

5. Daftar Pustaka

- [1] E. Andrianantoandro, S. Basu, D. Karig, and R. Weiss. "Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. Molecular Systems Biology", *Molecular Systems Biology*, 0028: pp. 1 – 14, May 2006.
- [2] B.R. Glick, J.J. Pasternak, and C.L. Patten. "Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA", 4th Ed., Washington DC : American Society for Microbiology (ASM) Press, 2010.
- [3] S. Ausländer, D. Ausländer, and M. Fussenegger. "Synthetic Biology—The Synthesis of Biology", *Angew. Chem. Int.*, 56, 6396–6419, 2017.
- [4] The International Genetically Engineered Machine (iGEM) Foundation, "Synthetic Biology : based on standard parts," 2017, http://igem.org/Main_Page.
- [5] GSL Biotech, "Snapgene : Software for everyday molecular biology", 2017, <http://snapgene.com>.
- [6] iGEM, "Registry of Standard Biological Parts", 2017, http://parts.igem.org/Main_Page.
- [7] J. Leong, and J. B. Neilands, "Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria," *J Bacteriol.* 126(2): 823–830, 1976.
- [8] C. Ferreiros, M. Criado, and J. Gomez, "The Neisserial 37kDa ferric binding protein (FbpA)," *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 123, pp. 1-7, 1999.
- [9] S. A. Tom-Yew, D. T. Cui , E. G. Bekker, and M. E. Murphy, "Anion-independent Iron Coordination by the *Campylobacter jejuni* Ferric Binding Protein," *The Journal of Biological Chemistry*, 280, pp. 9283-9290, 2005.
- [10] iGEM: The Edinburgh team, "WastED", 2013, <http://2013.igem.org/team:edinburgh/introduction>
- [11] iGEM: The Colombian-Israeli team, "A Microbial Biosensor Device Assembled with Ion Channels for Iron Detection under UV Irradiation and Different Levels of Oxygen", 2007, http://2007.igem.org/wiki/index.php/IGEM_2007_Project
- [12] iGEM: The Evry team, "Iron Coli Project", 2013,<http://2013.igem.org/Team:Evry>
- [13] C. Y. Chen, S. A. Berish, S. A. Morse, and T. A. Mietzner, "The ferric iron-binding protein of pathogenic *Neisseria* spp. functions as a periplasmic transport protein in iron acquisition from human transferrin," *Mol. Microbiol*, 10(2), pp. 311-8, 1993.
- [14] J.T. O'Connor, "Iron and Manganese.In: *Water Quality & Treatment—A Handbook of Public Water Supplies*," New York: McGraw Hill, pp.378–396, 1971.
- [15] Peraturan Menteri Kesehatan RI. Nomor: 416/ MENKES/PER/IX/90. "Syarat-syarat Dan Pengawasan Kualitas Air", Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 3 September 1990, http://web.ipb.ac.id/~tml_atsp/.
- [16] Y.F. Shen, Y.F.Shen, J.Tang, Z.H.Nie, Y.D.Wang, Y.Ren, and L.Zuo, "Tailoring Size and Structural Distortion of Fe₃O₄ nanoparticles for the purification of contaminated water", *Biosource Technology*, Vol. 100 (18), pp. 4139-4146, September 2009.
- [17] A.G. Tekerlekopoulou, I.A. Vasiliadou, and D.V. Vayenas, "Physico-chemical and biological iron removal from potable water", *Biochemical Engineering Journal*, 31, pp. 74–83, 2006.