

# Pemurnian Pretrombin-2 Manusia Rekombinan di *Escherichia coli* untuk Produksi Trombin sebagai Komponen Lem Fibrin

Saronom Silaban<sup>1,2\*</sup>, Iman Permana Maksum<sup>1</sup>, Khomaini Hasan<sup>3</sup>, Sutarya Enus<sup>4</sup>, Toto Subroto<sup>1</sup>, dan Soetjoso Soemitro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Universitas Padjadjaran, Bandung

<sup>2</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan, Medan

<sup>3</sup>Pusat Penelitian Biosains dan Bioteknologi, Institut Teknologi Bandung, Bandung

<sup>4</sup>Pusat Mata Nasional, Rumah Sakit Mata Cicendo, Bandung

silabans@gmail.com; s\_soemitro@unpad.ac.id

**Abstrak**—Pretrombin-2 adalah prekursor trombin yang berperan mengubah fibrinogen menjadi fibrin untuk proses penutupan luka. Bahan ini dapat diterapkan sebagai pengganti teknik jahitan pasca bedah mata. Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa ekspresi pretrombin-2 manusia rekombinan dalam inang *Escherichia coli* selalu menghasilkan badan inklusi. Namun, kami berhasil mengekspresikan pretrombin-2 manusia pada *E. coli* dalam bentuk protein larut. Optimasi kodon gen target sesuai kodon preferensi inang, perancangan gen target terfusi intein dalam vektor ekspresi pTWIN1, dan penggunaan galur *E. coli* BL21 (DE3) ArcticExpress yang mengandung chaperon, menjadi penunjang keberhasilan ekspresi pretrombin-2 manusia dalam *E. coli*. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan fusi pretrombin-2 dari penanda intein hasil ekspresi *E. coli* menggunakan kolom matriks kitin. Fusi pretrombin-2 berhasil dimurnikan menggunakan matriks kitin yang dimediasi intein. Walaupun begitu, pemotongan fusi pretrombin-2 dari penanda intein belum sempurna dan masih diperlukan optimasi lebih lanjut. Sistem pemurnian dimediasi intein menjadi menarik, karena protein diperoleh dengan satu tahap pemurnian, mampu melakukan pemotongan sendiri (*self-splicing*), dan pemotongan protein dari penanda intein dapat dilakukan menggunakan penambahan senyawa tiol atau dengan induksi perubahan pH/suhu.

**Kata kunci**—pretrombin-2; trombin rekombinan; lem fibrin; *E. coli* ArcticExpress; pemurnian dimediasi intein

## I. PENDAHULUAN

Meningkatnya jumlah pasien yang menjalani operasi di berbagai Rumah Sakit di Indonesia saat ini, menjadi tantangan serius terhadap dunia kesehatan, terutama dalam upaya meminimalkan kerugian pasca pelaksanaan operasi. Salah satu upaya yang perlu mendapat perhatian adalah mengembangkan teknik lain untuk mengganti teknik jahitan. Teknik jahitan merupakan standar emas untuk menutup luka. Namun penggunaannya menimbulkan kerugian, diantaranya waktu penyembuhan luka berlangsung lama, proses pembedahan lebih panjang, munculnya trauma tambahan bagi pasien saat pemasangan dan pencabutan benang, meningkatnya inflamasi, serta kemungkinan timbul komplikasi yang berhubungan dengan jahitan berupa infeksi [1,2].

Lem Fibrin (LF) pengganti teknik jahitan memiliki kemampuan untuk merekatkan dan menutup luka. LF sebagai bahan bioadesif, tersusun atas trombin, fibrinogen, kalsium dan faktor XIII. Bahan ini dirancang untuk menyerupai tahap akhir koagulasi dengan membentuk bekuan fibrin. LF digunakan sebagai bahan hemostatis yang menghentikan pendarahan dari celah insisi, matriks untuk penyembuhan luka dan perekat jaringan [3].

Meskipun luas penggunaannya, LF yang di dapat secara komersial relatif mahal, sehingga tidak ekonomis. LF komersial ini mengandung protein plasma yang dimurnikan dari sumber darah lain, yang beresiko terjadinya kontaminasi patogen secara bersamaan dengan perawatan. Untuk membuat LF diperlukan sumber bahan yang lebih berlimpah dan lebih aman. Saat ini,

trombin pada LF komersial biasanya terbuat dari plasma beku segar sapi [2]. LF komersial sebagai pengganti jahitan memberikan banyak keuntungan, yaitu operasi lebih nyaman, lebih cepat dan dapat terhindar kerugian akibat jahitan [4,5]. Sampai saat ini LF komersial untuk operasi mata belum tersedia di Indonesia, sehingga harus diimpor dengan harga yang sangat mahal dan perlu penyimpanan secara khusus. Permasalahan lain yang muncul adalah belum adanya izin khusus dari *Food and Drug Administration* untuk pemakaian LF komersial pada operasi mata, terkait transmisi penyakit karena terbuat dari plasma donor [4].

Aplikasi teknologi rekombinan memungkinkan untuk memproduksi dan memasarkan protein plasma untuk aplikasi terapeutik manusia [6]. Penggunaan teknologi rekombinan untuk trombin manusia rekombinan yang pertama, diproduksi dari prekursor pretrombin-1 dalam kultur sel *Chinese Hamster Ovary* [7]. Kajian klinik produk tersebut mengindikasikan toleransi dan manfaat hemostatik yang baik [6],[7]. Produksi trombin manusia rekombinan telah dikembangkan dalam kultur sel *Chinese Hamster Ovary* [8]. Protein hasil ekspresi kultur sel mamalia dalam keadaan terlipat dan terglisosilasi sehingga tidak perlu dilakukan renaturasi. Namun, sistem ini membutuhkan kondisi media kultur yang kompleks juga berpotensi kontaminasi virus dan respon imun [9].

*E. coli* menjadi alternatif yang penting dan menarik untuk produksi protein rekombinan, karena sifatnya yang dapat tumbuh cepat dengan siklus hidup pendek, informasi dan karakter genomnya sudah lengkap sehingga mudah dimanipulasi, biaya produksi relatif murah, tingkat ekspresi protein target tinggi, cepat, juga teknologinya sudah mapan [10,11]. Namun inang ini juga memiliki kelemahan, seperti fenomena bias kodon [12], dan potensi menghasilkan protein agregat kompleks tidak aktif yang lazim dikenal sebagai badan inklusi [13].

Strategi yang dapat dilakukan untuk mengatasi kelemahan tersebut adalah dengan melakukan optimasi kodon gen target terhadap preferensi kodon inang [14]. Proses optimasi ini dilakukan dengan cara merubah kodon pengkode asam amino tertentu yang berasal dari sumber lain menjadi kodon dengan frekuensi tinggi di inang ekspresi [12],[14]. Strategi kedua adalah memanfaatkan teknologi gen sintetik berdasarkan kemampuan mengubah bias kodon dari gen target menjadi cocok dengan kodon preferensi inang rekombinan [15]. Pendekatan

gen sintetik dengan optimasi kodon merupakan strategi untuk mengatasi frekuensi yang rendah dari ekspresi gen. Keuntungan dari teknologi ini adalah efektifitas dan efisiensi yang tinggi dibandingkan dengan proses isolasi sendiri, serta terhindar dari transmisi penyakit dan reaksi alergi [16].

Penggunaan sistem ekspresi *E. coli* untuk memproduksi trombin rekombinan dari pretrombin-2 telah dilakukan oleh Soejima *dkk.* [17]. Seperti semua prokariot lainnya, *E. coli* tidak dapat melakukan modifikasi pasca-translasi yang sangat diperlukan oleh protein-protein eukariot. Namun walau tanpa modifikasi pasca-translasi, pretrombin-2 dapat diekspresikan dalam *E. coli* tetapi hanya sedikit kemudian yang aktif. Sering muncul kendala dimana trombin sebagai protein yang mudah larut menjadi tidak larut karena pembentukan badan inklusi sehingga harus dilarutkan dan dilipat ulang. Strategi untuk mengurangi pembentukan badan inklusi selama ekspresi dalam *E. coli* dapat dilakukan dengan mengurangi suhu dan laju ekspresi, optimasi parameter bioproses, menggunakan perangkat yang dirancang untuk mencari kondisi optimum dalam ekspresi protein terlarut dan ko-ekspresi chaperon [13,18]. Galur *E. coli* ArcticExpress mengandung chaperon (Cpn10 dan Cpn60) untuk membantu pelipatan protein. Inang ini mampu mengekspresikan Cpn60/Cpn10 *Oleispira antartica* dari bakteri psikrofilik laut Antartika, sehingga kegiatan pelipatan protein tinggi dengan mengatur pertumbuhan *E. coli* pada suhu rendah [19,20].

Pemurnian menggunakan domain pengikat kitin yang dimediasi intein menjadi menarik untuk dikembangkan. Sistem IMPACT-TWIN (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag-Two Intein*) merupakan vektor ekspresi sekaligus sebagai sistem pemurnian yang menggunakan induksi aktivitas pemecahan protein target dari penanda intein yang dapat melakukan pemotongan sendiri (*self-splicing*) dalam kolom kromatografi afinitas kitin. Pelepasan protein target dari protein penanda intein dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi ( $\beta$ -mercaptoetanol, BME) pada C-terminal [21] dan atau buffer perubahan pH/suhu pada N-terminal [22]. Manfaat utama dari strategi pemurnian protein yang dimediasi oleh intein adalah menghasilkan protein target dalam jumlah banyak, penggabungan protein target bisa dilakukan di ujung C ataupun ujung N protein intein, dan protein target dapat diisolasi dengan atau tanpa tambahan residu asam amino metionin [23],[24]. Penggunaan pemurnian dimediasi intein dilaporkan dapat memurnikan

protein hingga tingkat kemurnian mencapai 95% [21],[22],[25],[26].

## II. METODE

### A. Galur, vektor, bahan kimia, media

Untuk kloning dan peremajaan plasmid menggunakan *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen, USA), inang ekspresi yang digunakan adalah *E. coli* ER2566 (New England, Biolabs, USA), BL21(DE3), BL21(DE3) Rosetta dan BL21(DE3) ArcticExpress (didukung oleh Prof. Jiri Damborsky, Masaryk University, Brno, Czech Republic). Inang ditumbuhkan dalam media luria bertani (LB) dengan komposisi (tripton 1%, ekstrak ragi 0,5%, dan natrium klorida 1%) yang disuplemen dengan antibiotik tetrasiklin (100 µg/mL), dan ampisilin (100 µg/mL). Untuk media padat, komponen media LB ditambahkan dengan 2% agar. Semua enzim restriksi dan T4-DNA ligase dibeli secara komersial dari (New England Biolabs, USA). Vektor ekspresi menggunakan pTWIN1 diperoleh dari NEB (New England Biolabs, USA). Gen *pretrombin-2* manusia disintesis oleh GeneArt (Life Technologies, Jerman). Kit isolasi DNA (Roche Applied Science, USA), Kit fragmen ekstraksi gel (Geneaid, Taiwan). *Isopropyl-β-D-thiogalactoside* (IPTG) dan *β-mercaptoethanol* (*B-ME*) diperoleh dari Sigma. Poliakrilamid dan Coomassie Brilliant Blue R250 (Biorad, Richmond, USA). Matriks kitin diperoleh dari NEB (New England, Biolabs, USA). *Anti-Chitin Binding Domain Serum (Rabbit)* (New England Biolabs, USA), *Goat Anti Rabbit IgGH&L HRP* (Abcam). Bahan kimia lainnya tersedia di laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Universitas Padjadjaran, dengan tingkat *pro-analysis* (p.a.).

### B. Konstruksi dan optimasi kodon gen *pretrombin-2* manusia

Gen *pretrombin-2* manusia (*hpt2*) sintetik di desain ke dalam vektor ekspresi pTWIN1 menggunakan dua sisi restriksi pada ujung 5' dan 3' berturut-turut *Bam*HI dan *Xho*I. Urutan asam amino *hpt2* termuat dalam data *GenBank* Accession number: NM\_000506.3. Asam amino *hpt2* selanjutnya dioptimasi menggunakan perangkat lunak OPTIMIZER [27] sesuai kodon preferensi *E. coli* yang termuat dalam *Codon Usage Database*. Kodon *hpt2* hasil optimasi kemudian dianalisis menggunakan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) [28].

### C. Kloning gen *pretrombin-2*

Plasmid pMA-T-*hpt2* dipotong menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xho*I

sesuai rancangan gen sintetik sebelumnya. Secara paralel, pTWIN1 dipotong dengan menggunakan enzim restriksi yang sama. Hasil pemotongan selanjutnya dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Selanjutnya fragmen *hpt2* dan pTWIN1 hasil pemotongan diekstraksi dari gel agarosa, dan dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1%. Selanjutnya fragmen *hpt2* diligasi ke dalam vektor pTWIN1 menggunakan enzim T4 DNA ligasi hingga diperoleh plasmid pTWIN1 yang mengandung sisipan *hpt2* (pTWIN1-*hpt2*). Selanjutnya, dilakukan transformasi sel kompeten *E. coli* TOP10F' dengan plasmid pTWIN1-*hpt2* [29]. Untuk mendapatkan plasmid pTWIN1-*hpt2*, maka koloni transforman *E. coli* TOP10F' diisolasi. Penentuan urutan nukleotida dengan DNA sequencer (*MacroGene*, Korea) dilakukan untuk memverifikasi keberhasilan kloning.

### D. Ekspresi fusi protein *pretrombin-2* dalam *E. coli*

Tes ekspresi dilakukan untuk mencari inang *E. coli* yang dapat mengekspresikan rhPT2 dengan baik dalam bentuk protein terlarut. Tes ekspresi dilakukan dengan menggunakan penginduksi IPTG di 4 galur *E. coli* BL21(DE3) ArcticExpress, ER2566, BL21(DE3) dan BL21(DE3) Rosetta. Galur-galur ini merupakan *E. coli* dengan sistem promoter T7 yang sesuai dengan vektor pTWIN1. Koloni tunggal transforman *E. coli* ditumbuhkan dalam 5 mL media LB cair yang mengandung antibiotik sesuai untuk tes ekspresi, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C semalaman. Sebanyak 1 mL kultur semalam, ditumbuhkan ke dalam 100 mL LB cair yang ditambahkan antibiotik ampisilin (100 µg/mL) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3-4 jam dengan pengocokan 150 rpm hingga OD<sub>600</sub> 4-6. Sebanyak 1 mL kultur diambil sebagai sampel sebelum diinduksi. Ke dalam kultur sisa, ditambahkan IPTG (100 mg/mL) dengan konsentrasi akhir 0,1 mM. Pertumbuhan *E. coli* ER2566, BL21(DE3) dan BL21(DE3) Rosetta pada suhu 30 °C selama 4 jam, sedangkan BL21(DE3) ArcticExpress pada suhu 12 °C semalaman. Sebanyak 1 mL kultur diambil sebagai sampel setelah induksi. Pelet dikumpul dengan sentrifugator pada suhu 4 °C, 7500 g. Selanjutnya pelet disuspensi dengan buffer lisis A (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM, PMSF 1 mM pH 8.5, Triton X-100 1%), kemudian dilisis menggunakan sonikator selama 15 menit. Lisat kemudian disentrifugasi pada 7500 g selama 20 menit. Sebanyak 40 µL supernatan diambil sebagai protein terlarut. Pelet ditambahkan dengan 50 µL urea 8 M, dipanaskan pada suhu 95 °C selama 15 menit dan disentrifugasi selama

10 menit, sebanyak 40  $\mu$ L supernatan diambil sebagai protein tidak larut. Masing-masing sampel ditambahkan 5  $\mu$ L SDS-Dye, kemudian dipanaskan pada suhu 95  $^{\circ}$ C selama 15 menit dan disentrifugasi 7500 *g* selama 1 menit Untuk memverifikasi ekspresi rhPT2 dan kelarutannya, sebanyak 10  $\mu$ L sampel dimuat dalam poliakrilamid gel 12,5%. Pita protein divisualisasikan dengan pewarna Coomassie Brilliant Blue R250.

#### E. Pemurnian fusi pretrombin-2 dengan pemotongan pada C-terminal intein

Fusi CBD-intein-rhPT2 dari supernatan dimasukkan ke dalam 5 mL matriks kitin yang disetarakan dengan buffer B (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM pH 8.5) 4  $^{\circ}$ C sebanyak 10 kali volume kolom dan ditampung sebagai sampel *flowthrough* untuk karakterisasi SDS-PAGE. Protein yang tidak diinginkan dicuci dengan buffer B sebanyak 20 kali volume kolom dan ditampung sebagai sampel pencuci untuk karakterisasi SDS-PAGE, selanjutnya resin diambil sebanyak 100  $\mu$ L sebagai sampel resin sebelum pemotongan. Sebanyak 15 mL buffer pemotong (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM pH 6.5) dimasukkan ke dalam kolom, kemudian kolom diinkubasi pada suhu 25  $^{\circ}$ C selama 48 jam. Setelah inkubasi, kolom dielusikan dengan buffer pemotong sebanyak 8 mL dan fraksi ditampung masing-masing 1 mL dalam tabung mikro. Resin diambil kembali sebanyak 100  $\mu$ L sebagai sampel setelah pemotongan. Semua sampel dan fraksi dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE 12.5% [22].

### III. HASIL DAN DISKUSI

#### A. Optimasi, kloning dan ekspresi pretrombin-2 manusia dalam *E. coli*

Urutan asam amino *hpt2* dianalisis menggunakan perangkat lunak OPTIMIZER. Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase GC *hpt2* sebesar 56,8% dengan *Codon Adaptation Index* (CAI) sebesar 0,336 [30]. Hasil analisis kodon *hpt2* menggunakan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA), diperoleh 21 asam amino *hpt2* dikode oleh kodon-kodon yang tidak preferensi bagi *E. coli* [30-32]. Setelah kodon *hpt2* dioptimasi diperoleh persentase GC *hpt2* 53,1% dengan CAI sebesar 1.000 [30].

Untuk mendapatkan fragmen *hpt2*, plasmid pMA-T-*hpt2* dipotong menggunakan enzim *Bam*HI dan *Xho*I. Dengan enzim yang sama, pTWIN1 dipotong dan dikarakterisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1%.

Hasil karakterisasi gel menunjukkan bahwa fragmen *hpt2* berhasil dipotong dari pMA-T, dimana terdapat dua pita sebesar 939 pb (*hpt2*) dan 2374 pb (pMA-T). Demikian juga hasil karakterisasi pTWIN1 dalam gel, diperoleh dua pita sebesar 6536 pb (pTWIN1) dan 839 pb (*Multi Cloning Site*) [30,31].

Fragmen *hpt2* dan pTWIN1 yang diperoleh selanjutnya diekstrak dan dimurnikan menggunakan kit isolasi DNA. Hasil karakterisasi dengan gel agarose 1% menunjukkan bahwa, *hpt2* dan pTWIN1 berhasil diekstrak dan dimurnikan dari gel. Terdapat dua pita 939 pb (*hpt2*) dan 6536 pb (pTWIN1) [30,31].

Selanjutnya fragmen *hpt2* diligasi ke dalam vektor pTWIN1 menggunakan enzim T4 DNA ligase. Untuk mengkonfirmasi keberhasilan proses ligase, urutan pTWIN1-*hpt2* dikonfirmasi oleh DNA *sequencing*. Hasil penjejakan urutan nukleotida menunjukkan, *hpt2* berhasil diinsert ke pTWIN1 [30,31].

Untuk memperoleh inang ekspresi yang baik mengekspresikan rhPT2 dalam bentuk larut, dilakukan ekspresi rhPT2 ke dalam 4 inang *E. coli*. Hasil karakterisasi menggunakan gel SDS-PAGE 12,5%, menunjukkan bahwa inang *E. coli* BL21(DE3) ArcticExpress mampu mengekspresikan protein fusi CBD-Intein-rhPT2 dalam bentuk larut. Sedangkan inang ER2566, BL21(DE3) dan BL21(DE3) Rosetta mengekspresikan protein fusi rhPT2 dalam bentuk tidak larut (badan inklusi). Perbandingan kemampuan inang *E. coli* mengekspresikan rhPT2 dirangkum pada Tabel 1. [30].

TABEL I. PERBANDINGAN KEMAMPUAN *E. COLI* DALAM MENGEKSPRESIKAN FUSI PRETROMBIN-2 (30)

Galur <i>E. coli</i>	Fusi CBD-intein-rhPT2	
	Larut	Tidak larut
BL21 (DE3) ArcticExpress	+++++	++
ER2566	+	+++
BL21 (DE3)	-	+++
BL21 (DE3) Rosetta	-	+++

Pemilihan sistem ekspresi yang tepat sangat penting untuk produksi dalam jumlah yang lebih besar protein yang larut dalam sel inang. Untuk mencapai hal ini, vektor ekspresi pTWIN1 telah digunakan. Vektor pTWIN1 dilaporkan telah berhasil digunakan untuk ekspresi protein rekombinan dengan hasil tinggi [33]. Penggunaan vektor pTWIN1 dalam sistem

ekspresi, karena kemampuannya untuk memproduksi protein larut dalam jumlah besar. Kemampuan ini disebabkan kekhususan promotor T7, yang hanya mengikat T7 RNA polimerase. Diperkirakan bahwa induksi transkripsi dalam sistem vektor T7 lebih besar dari 1000 kali lipat, sedangkan besarnya induksi yang diperoleh dengan promotor lac represor umumnya diatur sekitar 50 kali lipat. Sistem ekspresi T7 akan aktif dengan adanya enzim T7 RNA polimerase. T7 RNA polimerase tidak terdapat pada bakteri secara alami, namun *E. coli* ArcticExpress telah dirancang untuk membawa gen yang mengkode RNA polimerase pada segmen DNANYa. Induksi ekspresi PT2 dilakukan dengan penambahan IPTG. IPTG merupakan substansi yang mencegah lac represor terikat pada lac operator sehingga menginduksi ekspresi gen untuk membentuk protein aktif. Hal ini mengawali pembentukan T7 RNA polimerase dalam jumlah yang lebih substansial, karena T7 RNA polimerase spesifik untuk promotor T7, maka gen *pt2* yang dikode di dalam plasmid tersebut akan mengalami over-ekspresi [34].

Perbedaan penggunaan kodon preferensi antara organisme, dapat menyebabkan berbagai masalah pada ekspresi protein heterolog. Gengen *pt2* manusia yang banyak mengandung kodon langka pada *E. coli* tidak akan diekspresikan secara efisien, dan dapat menyebabkan kesalahan translasi [14,35]. Kodon yang tidak disenangi *E. coli* sebagai kodon langka seperti AGG dan AGA yang mengkode arginin, kodon ini sering dijumpai pada gen manusia. Masalah lain yang muncul adalah bahwa ekspresi protein heterolog dalam *E. coli* cenderung menghasilkan protein agregat kompleks tidak aktif yang lazim dikenal sebagai badan inklusi [13]. Namun, masalah ini dapat diatasi dengan optimasi kodon [14] dan memanfaatkan teknologi gen sintetik berdasarkan kemampuan mengubah bias kodon dari gen target menjadi cocok dengan kodon preferensi inang rekombinan [15]. Kodon yang jarang diekspresikan dioptimasi sehingga kodon diekspresikan dengan frekuensi tinggi [36]. Setiap gen dalam genom memiliki nilai numerik yang disebut indeks adaptasi kodon (*Codon Adaptation Index*, CAI) Berdasarkan nilai tersebut, bias penggunaan kodon sebelum dan setelah optimasi dapat dihitung. Beberapa peneliti melaporkan bahwa nilai CAI dapat digunakan untuk memprediksi tingkat ekspresi protein heterolog [37-39]. Oleh karena itu, dalam laporan sebelumnya, badan inklusi PT2 yang dihasilkan mungkin disebabkan oleh frekuensi kodon yang rendah dari kodon *hpt2*, yang

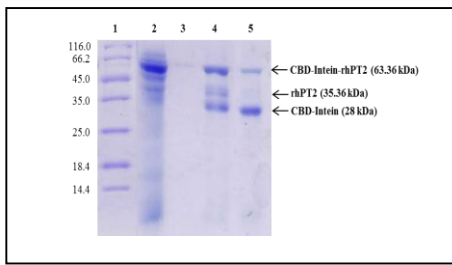
digunakan dalam *E. coli*. Teknologi optimasi gen dapat mengubah urutan gen untuk mencapai tingkat produktivitas yang lebih tinggi dalam sistem ekspresi yang diberikan. Meskipun badan inklusi dapat dimurnikan, proses tahapan pelipatan dan pemulihan enzim aktif tidak pasti dilipat secara benar [17].

Pembentukan badan inklusi selama produksi protein dalam inang prokariot dapat dicegah dengan mengurangi suhu selama ekspresi protein, karena suhu rendah biasanya meningkatkan kelarutan protein [13]. Namun, penurunan suhu dapat memperlambat pertumbuhan sel, sehingga tingkat sintesis protein lebih rendah. Untuk mengatasi masalah ini, *E. coli* BL21 (DE3) ArcticExpress merupakan inang yang direkayasa untuk mampu tumbuh pada suhu rendah. Inang ini mampu mengekspresikan Cpn60/Cpn10 *Oleispira antarctica* dari bakteri psikrofilik laut Antartika, sehingga kegiatan pelipatan tinggi dengan mengatur pertumbuhan *E. coli* pada suhu rendah [19,20,40]. Karakterisasi hasil ekspresi menunjukkan bahwa sel-sel *E. coli* (DE3) ArcticExpress mampu mengekspresikan rhPT2 secara optimal dalam bentuk larut.

#### B. Pemurnian protein fusi CBD-Intein-rhPT2 diinduksi pH/suhu dan karakterisasi

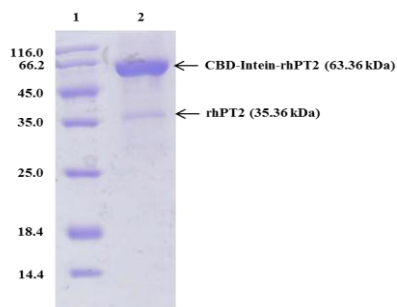
Fusi CBD-Intein-rhPT2 dimurnikan menggunakan kolom matriks kitin dimediasi intein. Fraksi protein terlarut dimasukkan ke resin kitin. Hasil karakterisasi SDS-PAGE menunjukkan bahwa setelah dicuci dengan buffer kolom untuk menghilangkan protein-protein lain yang tidak spesifik, tidak ada protein fusi intein-CBD yang terlihat (lajur 3, Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa protein fusi terikat pada resin kitin karena adanya aktivitas pengikatan yang tinggi dari domain pengikat kitin yang terletak pada intein.

Selanjutnya pemotongan diri fusi rhPT2 yang dimediasi intein, diinduksi melalui perubahan pH 6.5 dari pH 8.5 pada kolom dengan induksi kolom pada suhu 25 °C selama 48 jam. Pemotongan fusi rhPT2 dipisahkan dari kitin menggunakan pengelusi buffer pemecah.



Gambar 1. Analisis SDS-PAGE 12,5% hasil pemurnian protein fusi rhPT2 dimediasi intein. lajur 1: marker protein standar, lajur 2: *flowthrough*, lajur 3: buffer pencuci, lajur 4: resin kitin pH 8.5 sebelum dipotong, dan lajur 5: resin kitin setelah dipotong menggunakan buffer pH 6.5 dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 25 °C.

Tingkat keberhasilan pemecahan dapat dilihat dari perbandingan matriks kitin sebelum dan sesudah pemecahan (Gambar 1). SDS-PAGE menunjukkan bahwa sampel matriks sebelum pemecahan terdapat pita 35,36 kDa (rhPT2), 28 kDa (intein-CBD) dan 63,36 kDa (CBD-Intein-rhPT2) (lajur 4). Hal ini mengindikasikan bahwa proses pemecahan rhPT2 dari CBD-intein telah terjadi. Sementara sesudah pemecahan, pita 35,36 kDa (rhPT2) sudah terelusi (lajur 5). Sehingga pita yang terdeteksi hanya yang berbobot molekul 28 kDa (intein-CBD) dan 63,36 kDa (CBD-Intein-rhPT2). Adanya perbedaan pola pita protein dari sampel matriks kitin sebelum dan setelah pemecahan mengindikasikan bahwa sebagian fusi rhPT2 telah terlepas dari intein (Gambar 2). Hanya saja, rhPT2 belum terpisah sempurna. Optimasi pemecahan rhPT2 sampai saat ini masih terus dilakukan.



Gambar 2. Analisis SDS-PAGE 12,5% fraksi protein fusi rhPT2 hasil pemotongan. lajur 1: marker protein standar, lajur 2: fraksi rhPT2 hasil elusi setelah dipotong dengan pH 6.5 dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 25 °C.

#### IV. KESIMPULAN

Tidak semua inang *E. coli* mampu mengekspresikan rhPT2 dalam bentuk larut. Dalam studi ini, kami mengoptimalkan ekspresi rhPT2 dalam *E. coli*. Protokol dioptimalkan, termasuk penggunaan: (i) penggunaan kodon gen

hpt2 yang cocok dengan kodon inang *E. coli*, (ii) vektor ekspresi dengan promotor T7 yang kuat, dan (iii) Galur *E. coli* yang mampu tumbuh dengan penurunan suhu. Protokol ini menghasilkan rhPT2 larut. Pemurnian dalam kolom matriks kitin yang dimediasi intein dapat memurnikan rhPT2, dan fusi rhPT2 dapat dipotong dari intein-tag menggunakan buffer pemecah pH 6.5 dan inkubasi selama 48 jam pada suhu 25 °C.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, Republik Indonesia atas bantuan dana penelitian melalui program Penelitian Unggulan Strategis Nasional (PUSNAS) 2013-2015 dan Penelitian Hibah Disertasi Doktor (PHDD) 2015.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] H.S. Uy, J.M.G. Reyes, J.D.G. Flores and R.L.B. Siong, "Comparison of fibrin glue and sutures for attaching conjunctival autografts after pterygium excision," *Ophthalmology*, vol. 112, pp. 669-671, April 2005.
- [2] S. Enus, G. Natadisastra, M.N. Shahib dan R. Sulaiman, "Peran lem fibrin otologus pada penempelan tandur konjungtiva bulbi mata kelinci terhadap ekspresi gen fibronektin dan integrin," *MKB*, vol. 43, pp. 183-188, 2011.
- [3] W.D. Spotnitz and R. Prabhu, "Fibrin sealant Tissue Adhesive," *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, vol. 15, p. 245-270, 2005.
- [4] S. Enus, N.Z. Dalimoenthe dan A. Kartiwa, "Teknik lem fibrin otologus pada cangkok konjungtiva bulbi mata kelinci," *MKB*, vol. 41, pp. 169-173, 2009.
- [5] B. Yuksel, S.K. Unsal and S. Onat, "Comparison of fibrin glue and suture technique in pterygium surgery performed with limbal autograft," *Int. J. Ophthalmol*, vol. 3, pp. 316-320, Desember 2010.
- [6] T. Burnouf, "Recombinant plasma proteins," *Vox Sanguinis*, vol. 100, pp. 68-83, Januari 2011.
- [7] P.D. Bishop, K.B. Lewis, J. Schultz and K.M. Walker, "Comparison of recombinant human thrombin and plasma-derived human  $\alpha$ -thrombin," *Semin. Thromb. Hemost*, vol. 32, pp. 086-097, 2006.
- [8] H. Yonemura, T. Imamura, K. Soejima, Y. Nakahara, W. Morikawa, Y. Ushio, dkk, "Preparation of recombinant  $\alpha$ -thrombin: high-level expression of recombinant human prethrombin-2 and its activation by recombinant ecarin," *J. Biochem*, vol. 135, pp. 577-582, Maret 2004.
- [9] A.L. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms," *Biotechnology. Advances*, vol. 27, pp. 297-306, Mei-Juni 2009.
- [10] F. Baneyx and M. Mujacic, "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*," *Nature. Biotechnology*, vol. 22, pp. 1399-1408, November 2004.
- [11] L.D. Cabrita, W. Dai and S.P. Bottomley, "A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high



- throughput soluble protein production," *BMC.Biotechnology*, vol. 6, p. 12, Maret 2006.
- [12] H.P. Sorensen and K.K. Mortensen, "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*," *J. Biotechnol.*, Vol. 115, pp. 113-128, Januari 2005.
- [13] E.J. Freydel, M. Ottens, M. Eppink, G.V. Dedem and L.V. Wielen, "Efficient solubilization of inclusion bodies," *Biotechnology.Journal*, vol. 2, pp. 678-684, Juni 2007.
- [14] C. Gustafsson, S. Govindarajan and J. Minshall, "Codon bias and heterologous protein expression," *TRENDS in Biotechnology*, vol. 22, pp. 346-353, Juli 2014.
- [15] S. Graslund, P. Nordlund, J. Weigelt, B.M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, dkk, "Protein production and purification," *Nature Method*, vol. 5, pp. 135-156, April 2008.
- [16] R.A. Hughes, A.E. Miklos, and A.D. Ellington, "Gene synthesis: methods and applications," *Methods in Enzymology*, vol. 498, pp. 277-309, 2011.
- [17] K. Soejima, N. Mimura, H. Yonemura, H. Nakatake, T. Imamura and C. Nozaki, "An efficient refolding method for the preparation of recombinant human prethrombin-2 and characterization of the recombinant-derived  $\alpha$ -thrombin," *J. Biochem*, vol. 130, pp. 269-277, April 2001.
- [18] D. Hartinger, S. Heini, H.E. Schwartz, R. Grabherr, G. Schatzmayr, D. Haltrich and W.D. Moll, "Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B1," *Microbial Cell Factories*, vol. 9, pp.1-14, 2010.
- [19] M. Ferrer, T.N. Chernikova, K.N. Timmis and P.N. Golyshin, "Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain," *APPL. Environ. Microbiol.*, vol. 70, p. 4499-4504, Agustus 2004.
- [20] M. Stocchi, M. Ferrer, K.N. Timmis and P.N. Golyshin, "Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: Insights from rescue by cold-adapted chaperones," *Proteomics*, vol. 6, pp. 193-206, 2006.
- [21] J. Li, L. Zheng, P. Li and F. Wang, "Intein-mediated expression, purification, and characterization of thymosin  $\alpha$ 1-thymopentin fusion peptide in *Escherichia coli*," *Protein Expression & Purification*, vol. 84, pp. 1-8, April 2012.
- [22] C. Guo, Z. Li, Y. Shi, M. Xu, J.G. Wise, W.E. Trommer and J. Yuan, "Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin," *Protein Expression & Purification*, vol. 37, pp. 361-367, Agustus 2004.
- [23] S. Chong, G.E. Montello, A. Zhang, E.J. Cantor, W. Liao, M.Q. Xu and J. Benner, "Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step," *Nucl. Acids. Research*, vol. 26, pp. 5109-5115, Oktober 1998.
- [24] M.Q. Xu and T.C. Evans Jr, "Intein-mediated ligation and cyclization of expressed proteins," *Methods*, vol. 24, pp. 257-277, 2001.
- [25] W. Wu, D.W. Wood, G. Belfort, V. Derbyshire and M. Belfort, "Intein-mediated purification of cytotoxic endonuclease I-TevI by insertional inactivation and pH-controllable splicing. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, pp. 4864-4871, September 2002.
- [26] S.S. Sharma, S. Chong and S.W. Harcum, "Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*," *J. Biotechnology*, vol. 125, pp. 48-56, Januari 2006.
- [27] P. Puigbo, E. Guzman, A. Romeu and S.G. Vallve, "OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences," *Nucleic. Acids. Research*, vol. 35, pp. W126-W131, 2007.
- [28] J.O. McInerney, "GCUA: General Codon Usage Analysis," *Bioinformatics. Applications. Note*, vol. 14, pp. 372-373, 1998, Oxford University Press.
- [29] J. Sambrook and D.W. Russell, "Molecular cloning: A laboratory manual 3rd Ed," Cold Spring Harbor. Laboratory. Press, 2001, New York.
- [30] S. Silaban, I.P. Maksun, S. Ghaffar, K. Hasan, S. Enus, T. Subroto and S. Soemitro, "Codon optimization and chaperone assisted solubilization of recombinant human prethrombin-2 expressed in *Escherichia coli*," *Journal. Microbiology.Indonesia*, vol. 8, Desember 2014.
- [31] S. Silaban, I.P. Maksun, S. Ghaffar, S. Enus, K. Hasan, T. Subroto and S. Soemitro, "Konstruksi dan optimasi gen pretrombin-2 manusia dalam *Escherichia coli* untuk produksi trombin sebagai komponen lem fibrin," *Prosiding Nasional MIPA, Universitas Padjadjaran*, pp. 68-72, Bandung, Oktober 2014.
- [32] S. Silaban, I.P. Maksun, S. Ghaffar, S. Enus, K. Hasan, T. Subroto and S. Soemitro, "Desain, optimasi dan kloning gen pretrombin-2 manusia sintetik untuk produksi trombin sebagai komponen lem fibrin," *Prosiding Nasional Inovasi dan Teknologi Informasi*, pp. 3-6, Samosir, Oktober 2014
- [33] L.E. Smith, J. Yang, L. Goodman, X. Huang, R. Huang, J. Dressman, J. Morris, R.A.G.D. Silva, W.S. Davidson and G. Cavignolo, "High yield expression and purification of recombinanthuman apolipoprotein A-II in *Escherichia coli*," *J. Lipid. Res.* Vol. 53, pp. 1708-1715, Mei 2012.
- [34] J. W. Dubendorf and F.W. Studier, "Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor," *Journal of Molecular Biology*, vol. 219, pp. 45-59, May 1991.
- [35] R. Merkl, "A survey of codon and amino acid frequency bias in microbial genomes focusing on translational efficiency," *Journal of Molecular Evolution*, vol. 57, pp. 453-466, Oktober 2003.
- [36] A.S. Xiong, R.H. Peng, J. Zhuang, F. Gao, Y. Li, Z.M. Cheng and Q.H. Yao, "Chemical gene synthesis: strategies, softwares, error corrections, and applications," *FEMS. Microbiol.*, vol. 32, pp. 522-540, April 2008.
- [37] A. Carbone, A. Zinovyev and F. Kepes, "Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias," *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 2005-2015, April 2003.
- [38] X. Xia, "An Improved Implementation of Codon Adaptation Index," *Evolutionary. Bioinformatics*, vol. 3, pp. 53-58, 2007.
- [39] J.M. Fox and I. Erill, "Relative codon adaptation: a generic codon bias index for prediction of gene expression," *DNA Research*, vol. 17, pp. 185-196, Mei 2010.
- [40] M. Ferrer, T.N. Chernikova, M.M. Yakimov, P.N. Golyshin and K.N. Timmis, "Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures," *Nature. Biotechnology*, vol. 21, pp. 1266-1267, 2003.