

Ekspresi Gen *Lon-like* Protease dari *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 pada *Escherichia coli* BL21(DE3)

(Expression of *lon-like* protease gene from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 in *Escherichia coli* BL21(DE3))

Olfa Mega¹, Cece Sumantri¹, Irma Isnafia Arief¹ dan Cahyo Budiman¹

¹Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, IPB University

ABSTRAK Protease merupakan enzim yang paling banyak diaplikasikan pada bidang sains, fisiologis dan industri. Enzim ini mendominasi dari total penjualan enzim dunia. *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 adalah bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi dari daging sapi Indonesia, Peranakan Ongol. Analisis awal pada total genomnya mengindikasikan bahwa strain bakteri ini mempunyai beberapa gen yang terlibat dalam degradasi protein dan kemungkinan dapat diaplikasikan lebih lanjut. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan urutan gen *Lon-like* protease *L. plantarum* IIA-1A5 untuk sistem ekspresi heterologus. Sistem ekspresi gen *Lon-like* dilakukan menggunakan gen yang telah dioptimalkan secara *in silico*. Evaluasi ekspresi *Lon-like* protease rekombinan dari *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 (*Lon-like*-IIA-1A5) dilakukan dengan menggunakan vektor ekspresi pET-28a(+), *E. coli* BL21(DE3) sebagai inang

dan enzim restriksi *NdeI* dan *BamHI*. Validasi bobot molekul menggunakan SDS-PAGE dan *software expasy.org*. Urutan gen penyandi *Lon-like*-IIA-1A5 dioptimasi kodonnya terlebih dahulu secara *in silico* dengan tujuan untuk meningkatkan kompatibilitas gen ini dalam proses ekspresi dalam sel inang tanpa merubah urutan asam aminonya. Hasil penelitian menunjukkan, optimasi kodon meningkatkan nilai indeks adaptasi kodon (CAI) dan kandungan GC menjadi 0,97 dan 56,57% yang sesuai untuk sistem ekspresi *E. coli*. Sebanyak 88% kodon terdistribusi dalam kelompok kualitas 91-100, 4% dalam kualitas 81-90 dan 8% dalam kualitas 71-80. *Lon-like* IIA-1A5 berhasil diekspresikan dalam sel inang yang diinduksi dengan 1 mM IPTG pada suhu 37°C. Induksi IPTG dilakukan pada jam ke-3 inkubasi dengan OD₆₀₀ 0,59 dan bobot molekul *Lon-like*-IIA-1A5 terdeteksi sekitar 43 kDa.

Kata kunci: *E. coli*, ekspresi gen, *L. plantarum*, *Lon-like* protease

ABSTRACT Proteases are one of most important and abundant enzymes produced by the biotechnology industry, for scientific, physiological and industrial application and dominates of the whole enzyme market. *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 is an Indonesian lactic acid bacteria (LAB) isolated from beef Peranakan Ongole cattle. Preliminary analysis on its whole genome sequence indicated that this strain harbours some genes involved in protein degradation and might be promising to be further applied. This study aims to optimize the gene sequence of a *lon-like* protease of *L. plantarum* IIA-1A5 for heterologous expression system. The *Lon-like*-IIA-1A5 gene expression system is made using genes that have been optimized first *in silico*. pET-28a(+), *E. coli* BL21(DE3), *NdeI* and *BamHI* were used in this study as a expression vector, a host and restriction enzyme,

respectively. Molecular weight was validated using SDS-PAGE and expasy.org software. The results showed that optimization increased codon adaptation index value (CAI) and GC content to 0.97 and 56.57%, respectively, which were suitable for the *E. coli* expression system. The *Lon-like*-IIA-1A5 gene was successfully expressed in the cell cytoplasm by induction of 1 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37 °C. As many as 88% of *Lon-like*-IIA-1A5 codons were distributed in the 91-100 quality group. *Lon-like*-IIA-1A5 was successfully expressed in a host cell induced with 1 mM IPTG at 37°C. IPTG induction was performed at the 3rd hour of incubation with OD₆₀₀ 0.59. In addition, *Lon-like*-IIA-1A5 molecular weight was detected approximately 43 kDa.

Keywords: *E. coli*, gene expression, *L. plantarum*, *Lon-like* protease.

PENDAHULUAN

Protease merupakan kelompok enzim yang sangat penting dan paling banyak (59%) diaplikasikan pada bidang sains, fisiologis (pengobatan) dan industri, baik pangan,

2019 Jurnal Agripet: Vol (19) No. 2: 149-158

maupun non-pangan (Li *et al.*, 2013). Sekitar 60% dari total penjualan enzim dunia diproduksi dari mikroba (Novelli *et al.*, 2016), karena pertumbuhannya relatif cepat dan mudah diatur sehingga mutu enzim yang dihasilkan lebih seragam (Stanbury *et al.*, 2016), kapasitas produksi dan aktivitas

Corresponding author: olfa_mega@unja.ac.id
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v19i2.14904>

katalitik dapat ditingkatkan (Uttatree dan Charoempanic, 2016).

Lactobacillus plantarum IIA-1A5 merupakan bakteri asam laktat (BAL) yang diisolasi dari daging sapi Peranakan Ongol Indonesia (Arief *et al.*, 2015). Aplikasi bakteri ini pada daging *Dark Firm Dry* (DFD) menghasilkan daging yang lebih empuk, warna lebih terang dan sarkomer lebih panjang (Arief *et al.*, 2006^b) yang mengindikasikan adanya proses proteolisis. Hasil sekuensing seluruh genom pada bakteri ini menunjukkan adanya gen penyandi beberapa enzim hidrolitik yang mempunyai prospek untuk diaplikasikan lebih lanjut. Salah satu gen tersebut adalah *Lon-like* yang termasuk dalam protease serine dan berperan penting dalam homeostasis protein seluler.

Protease *lon* adalah enzim yang terlibat dalam regulasi aktivitas seluler. Enzim ini membutuhkan ATP untuk fungsinya dan bertanggung jawab atas degradasi protein yang terlipat secara tidak tepat atau protein berumur pendek (Botos *et al.*, 2019; Pinti *et al.*, 2016). *Lon* pertama kali ditemukan pada *Escherichia coli*, saat ini homolog *lon* ditemukan secara luas dari prokariota sampai eukariota. Gen yang mengkode protein mirip *lon* (*Lon-like*) telah dikloning dari beberapa spesies bakteri seperti *Myxococcus xanthus* dan *Bacillus brevis* (Thies *et al.*, 1998) dan *Meiothermus taiwanensis* (Liao *et al.*, 2012). Gen penyandi *Lon-like* dari *L. plantarum* IIA-1A5 diproduksi melalui teknologi DNA rekombinan. Teknologi DNA Rekombinan adalah suatu cara untuk menyambung DNA yang berasal dari satu sumber atau lebih yang tergabung ke dalam satu molekul rekombinan (Barnum, 2005). Di dalam sel inang organisme tertentu, DNA rekombinan akan berekspresi menghasilkan protein. Inang yang umum dipakai adalah *Escherichia coli* karena mempunyai tingkat ekspresi yang tinggi, media pertumbuhannya murah, mudah dilakukan peningkatan skala produksi untuk industri (Gaffar, 2010), sifat-sifat fisiologi dan genetiknya telah banyak diketahui dan pertumbuhannya cepat dan mudah (Brown, 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi ekspresi dan memproduksi *Lon-*

like protease rekombinan dari *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 pada *E.coli* BL21 (DE3).

MATERI DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas genom penyandi protease dari isolat *L. plantarum* IIA-1A5 (Arief *et al.*, 2006^a), *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, Jerman), plasmid pET-28a(+) (Novagen, Jerman), Luria Bertani (LB) Broth, Miller (Difco, France), Luria Bertani (LB) Agar, gliserol, antibiotik kanamisin, *isopropyl thio-β-D-galactoside* (IPTG) (Sigma-Aldrich, Jerman), akrilamid (Sigma-Aldrich, Jerman), *N,N,N',N'*-bis-methylene-acrylamide, *sodium dodesil sulfat* (SDS) (Wako, Jepang), *tris base* (Wako, Jepang), *deionized water*, *bromophenol blue* (J.T. Baker, USA), glisin, amonium persulfat (APS) (Merck, Jerman) dan *N,N,N',N'*-tetraetilmetilenadiazina (TEMED) (Sigma-Aldrich, Jerman), *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma, USA), penanda protein *low molecular weight* (LMW), asam asetat, etanol dan akuades.

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, labu erlenmeyer, labu ukur, gelas piala, pemanas busen, ose, alat vortex (Gemmy Industrial Corp, USA), pH meter, pipet-volumetrik, cawan petri, mikropipet, tip plastik, *hot plate*, *heat block* (BIOER, China), autoklaf (TOMY), *magnetic stirrer*, tabung eppendorf, vial, inkubator, *laminar air flow*, oven, *freezer*, *refrigerator*, sonikator (Branson 8510), sentrifugator (Hettich, MIKRO 200R, Jerman), *sealer*, timbangan digital, UV-Vis spektrofotometer (Agilent, UV-VIS 8453, China), *waterbath shaker* (Mettler, Jerman) dan elektroforesis (Mini Protean[®] 3 Cell Bio-Rad, USA).

Identifikasi Gen Penyandi *Lon-like* Protease

Sekuens gen penyandi *Lon-like* protease diidentifikasi dari sekuens total genom dari *L. plantarum* IIA-1A5 menggunakan software *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) *Annotation Server*. Sekuen gen penyandi *Lon-like* protease yang diperoleh, dimodifikasi kodonnya secara *in silico* untuk

menyesuaikan dengan sistem ekspresi *E. coli* BL21(DE3).

Optimasi dan Kloning Gen Penyandi *Lon-like* Protease

Proses optimasi dilakukan oleh GenScript (New Jersey, USA), dengan menggunakan sistem Optimum™ yang ditujukan pada tiga parameter yaitu *codon adaptation index* (CAI), *GC content* dan *frequency of codon usage* (FOC). Gen yang telah dioptimasi selanjutnya disintesis dan diinsersi pada vektor ekspresi plasmid pET-28a(+) dengan menggunakan enzim restriksi *Nde*I dan *Bam*HI. Fragmen restriksi selanjutnya diamati dengan menggunakan 1% *gel agarose* untuk mengevaluasi keberhasilan penyisipan DNA target dalam plasmid pET-28a(+).

Transformasi Plasmid dan Seleksi Transforman

Sebanyak 5 µL DNA plasmid dicampurkan ke dalam 100 µL suspensi sel kompeten (*E. coli* BL21(DE3)) kemudian dihomogenkan. Campuran dibiarkan selama 30 menit di dalam es, selanjutnya diinkubasi (*heat-shocked*) pada suhu 42°C selama 90 detik menggunakan *heatblock*, lalu ditempatkan kembali di dalam es selama 30 menit, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dengan menambahkan 1 mL media LB Broth (tanpa antibiotik). Setelah 1 jam, sebanyak 0.3 mL sel hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB Agar yang mengandung antibiotik kanamisin (35 µg/mL) untuk seleksi transforman positif (Sambrook dan Russel, 2001).

Ekspresi Protein Heterologus dalam *E. coli* BL21(DE3)

Sebanyak 1 mL sel *E. coli* rekombinan dikultur dalam 5 mL media LB (Luria Bertani) Broth yang mengandung antibiotik kanamisin pada konsentrasi akhir 35 µg/mL dan suhu 37°C selama 12-16 jam, 150 rpm pada *waterbath shaker*. Kultur dipindahkan dalam media baru yang lebih besar (250 mL) dan diinkubasi pada suhu dan pengocokan yang sama selama 3 jam. Kultur diinduksi dengan

IPTG (*isopropyl thio-β-D-galactoside*) pada konsentrasi akhir 1 mM ketika tingkat kekeruhan kultur mencapai 0.5-0.6 (OD₆₀₀). Kultur yang sudah diinduksi selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C, 150 rpm selama 5 jam. Panen sel dilakukan dengan cara kultur disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit dan suhu 4°C. Pelet sel yang dihasilkan disupensi ke dalam buffer lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) sebanyak 5% dari volume kultur dan disonikasi pada amplitudo 30 kHz selama 30 menit dalam air dingin (Kang *et al.*, 2015). Untuk melihat kurva pertumbuhan sel bakteri setelah diinduksi IPTG, sekitar 0,5 mL sampel diambil tiap jam dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

Ekspresi dan Bobot Molekul *Lon-like* Protease

Ekspresi dan bobot molekul *Lon-like* yang dipanen dari *E. coli* BL21 divalidasi dengan menggunakan SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Konsentrasi poliakrilamid untuk gel pemisah (*resolving gel*) adalah 15% dan untuk gel penggertak (*stacking gel*) adalah 5%. Elektroforesis dilakukan pada 15 A selama 15 menit, selanjutnya 30 A selama 35 menit atau sampai marker mencapai bagian batas bawah gel. Gel diwarnai dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250 selama 60 menit dan dibilas dengan larutan *distaining* yang mengandung 50% etanol, 10% asam asetat dan 40% aquades selama 24 jam. *Software expasy.org* juga digunakan untuk menghitung berat molekul dan nilai titik iso elektrik (PI) *Lon-like*.

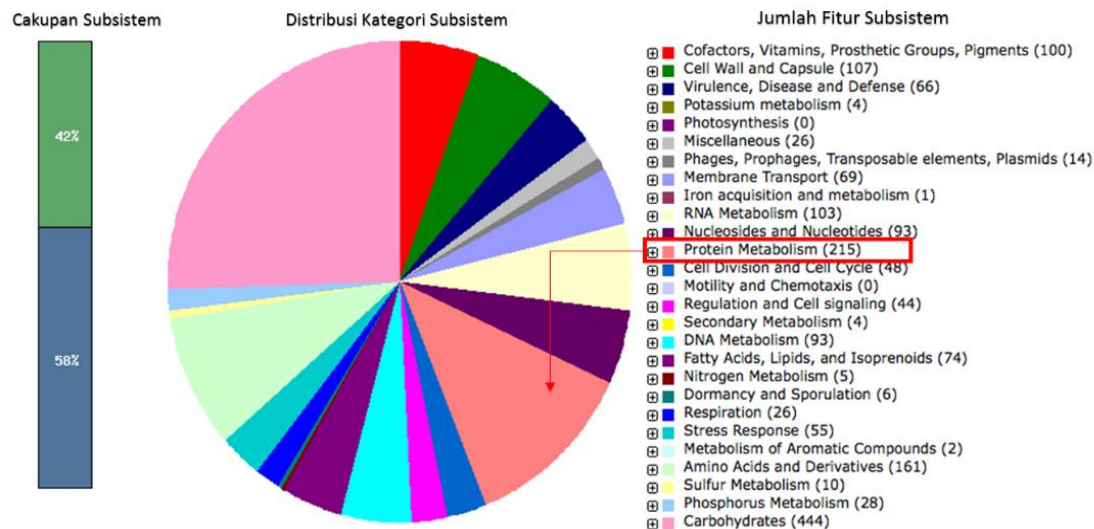
HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Gen Penyandi *Lon-like*-IIA-1A5

Hasil identifikasi urutan gen penyandi *Lon-like* protease dari *L. plantarum* IIA-1A5 menggunakan software *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) *Annotation Server* disajikan dalam Gambar 1. Hasil analisis menunjukkan bahwa posisi gen penyandi *Lon-like* protease dalam genom bakteri *L. plantarum* IIA-1A5 berada dalam

fitur subsistem protein metabolisme yang mengandung 215 fitur. Gen ini berlokasi antara subsistem *nucleosides & nucleotides* (93 fitur) dan subsistem *cell division & cell cycle* (48 fitur). Gen yang telah diidentifikasi tersebut kemudian dianotasi sebagai gen *Lon-like-IIA-*

1A5. Urutan basa DNA dari *Lon-like-IIA-1A5* yang diperoleh mempunyai ukuran 1080 pasang basa (*base pair/bp*) atau 360 asam amino (aa) dan tergolong ke dalam protease serin.



Gambar 1. Subsistem informasi genom *L. plantarum* IIA-1A5

Optimasi Gen Penyandi *Lon-like* Protease

Kodon dari sekuen gen penyandi *Lon-like-IIA-1A5* dianalisis secara *in silico* (bioinformatika) untuk mengetahui nilai indeks adaptasi kodon (CAI) dan rasio GC. Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai CAI dan rasio GC dari gen penyandi *Lon-like-IIA-1A5* berturut-turut adalah 0,43 dan 48,34% (Gambar 2b dan 3b). Nilai CAI yang dihasilkan tergolong rendah sehingga perlu dilakukan optimasi. Optimasi kodon gen penyandi *Lon-like-IIA-1A5* dilakukan dengan tujuan untuk menyesuaikan dengan preferensi kodon yang ada pada *E. coli* sebagai inang. Setelah dilakukan optimasi kodon, nilai CAI meningkat menjadi 0,97 dan rasio GC meningkat menjadi 56,57% (Gambar 2a dan 3a).

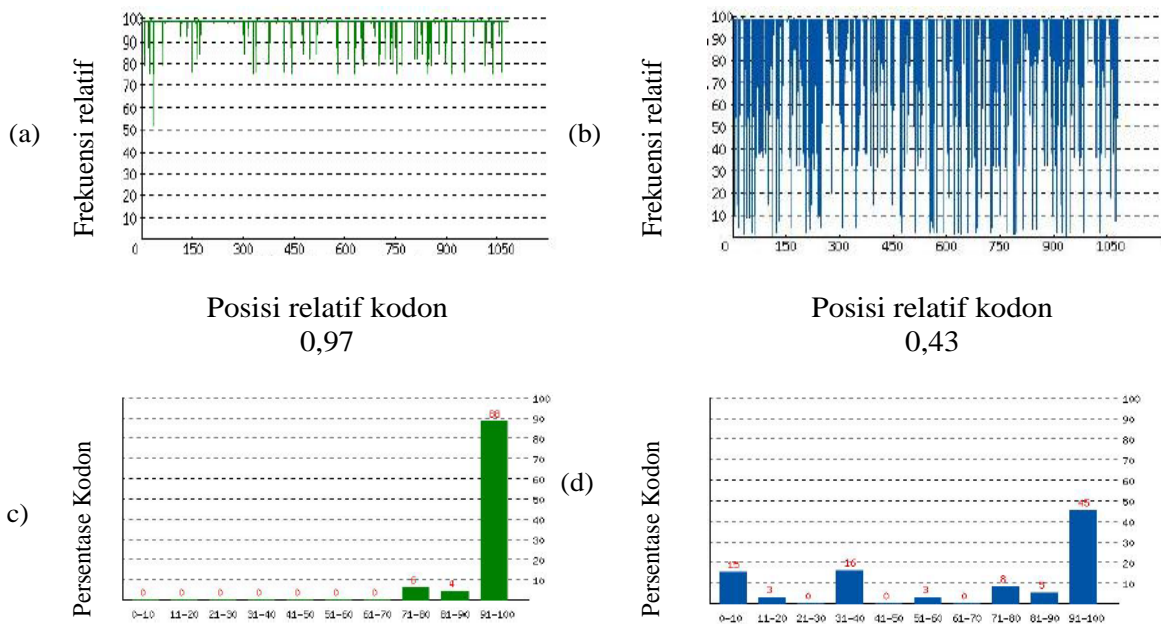
Nilai CAI merupakan salah satu parameter yang digunakan untuk memprediksi tingkat ekspresi gen yang nilainya berkisar dari nol hingga satu (Gun *et al.*, 2018). Nilai CAI *Lon-like* IIA-1A5 setelah dioptimasi adalah 0,97, nilai ini dikategorikan baik karena menunjukkan tingkat ekspresi gen yang tinggi.

Kisaran nilai CAI yang baik adalah $> 0,8 - 1,0$ (GenScript, 2019). Semakin besar nilainya, maka semakin kuat bias penggunaan kodon, bernilai satu jika gen selalu digunakan untuk sintesis setiap asam amino yang dikodekan (Gun *et al.*, 2018). Persentase kandungan GC dari gen hasil optimasi meningkat menjadi 56,57% dan berada dalam kisaran persentase ideal yaitu 30-70% (GenScript, 2019). Correddu *et al.*, (2019) melaporkan translasi yang disebabkan oleh kodon arginin langka (AGG-AGA) pada *E. coli*, menghasilkan produksi protein RioK2 terpotong. Penggantian kodon langka AGG-AGA dengan kodon arginine CGC-CGT yang dikenali oleh *E. coli* sebagai inang mencegah produksi protein terpotong.

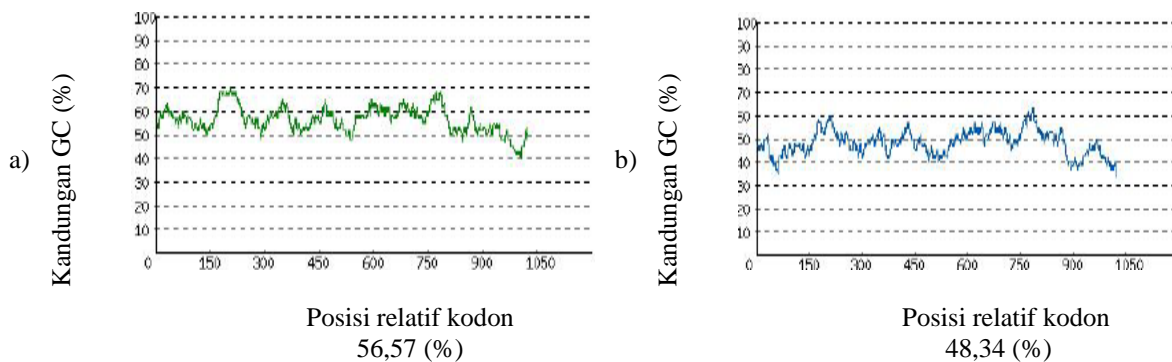
Frequency of optimal codons (FOP) adalah indeks untuk menunjukkan tingkat optimisasi pemilihan kodon identik pada setiap gen untuk proses penerjemahan, sedangkan kodon optimal adalah kodon yang dikenali paling banyak oleh *isoaccepting* tRNA (Nakamura *et al.*, 2000). Persentase distribusi kodon dalam kelompok kualitas kodon yang

dihitung setelah optimasi meningkat (Gambar 2c dan 2d). Sebanyak 88% kodon terdistribusi dalam kelompok kualitas 91-100, 4% dalam kelompok kualitas 81-90 dan ada 8% kodon terdistribusi dalam kelompok kualitas 71-80. Hal ini berarti semakin besar persentase jumlah kodon dengan kualitas yang baik dibanding sebelum optimasi. Semakin baik kualitas kodon maka semakin banyak jumlah kodon yang dikenali oleh DNA inang dan semakin tinggi tingkat ekspresi dari asam amino atau protein yang dihasilkan. Nilai frekuensi

optimal kodon (FOP) 100 diberikan untuk kodon dengan frekuensi penggunaan paling tinggi yang menyumbangkan asam amino dalam organisme ekspresi (GenScript, 2019). Tian *et al.*, (2017) menyatakan, metode optimasi cenderung memilih kodon penggunaan frekuensi tinggi dari inang untuk gen heterologus dan pendekatan ini berhasil digunakan untuk produksi heterologus dari beberapa protein terutama yang dikodekan oleh kodon “yang disukai” dalam inang.



Gambar 2. Posisi relatif kodon *lon-like* IIA sebelum (b) dan sesudah optimasi (a) dan persentase distribusi kodon dengan frekuensi penggunaannya sebelum (d) dan sesudah optimasi (c)



Gambar 3. Rasio GC dari gen *lon-like* IIA sebelum optimasi (b) dan sesudah optimasi (a).

Salah satu faktor yang mempengaruhi ekspresi protein heterologus dalam inang

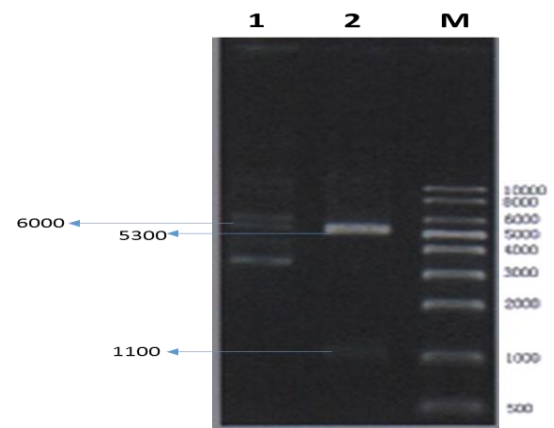
adalah bias kodon. Protein heterologus tidak akan terekspresi dengan baik jika pada gen

target ditemukan banyak kodon yang jarang digunakan dalam sel inang (Kaur, 2018). Optimasi kodon melalui metode *in silico* merupakan cara untuk meningkatkan ekspresi protein heterologous tanpa mengubah urutan asam amino dari protein yang dikodekan. Metode analisis ini berbasis komputasi yang dikombinasikan dengan algoritma matematika, kimia dan biologi untuk memprediksi dan menganalisis struktur dan aktivitas suatu protein (Singh *et al.*, 2016). Penerapan teknologi ini lebih efisien dan efektif dibanding dengan isolasi gen secara langsung karena selain dapat mencegah penularan penyakit (Hughes *et al.*, 2011) juga menghemat waktu dan biaya yang digunakan dalam penelitian (Yaraguppi *et al.*, 2012).

Kloning Gen Penyandi *Lon-like* Protease

Kloning gen (DNA) adalah teknik untuk menggabungkan molekul-molekul DNA secara *in vitro* sehingga diperoleh molekul DNA rekombinan sesuai dengan yang diharapkan (Yuwono, 2008). Setelah disintesis, DNA penyandi *lon-like* IIA diinsersi ke dalam vektor pET-28a(+). Pemotongan DNA menggunakan enzim endonuklease restriksi, yaitu *Nde*I dan *Bam*HI. Kedua enzim ini dapat mengenali situs restriksi pada situs *Multi Cloning Site* (MCS) yang ada pada plasmid pET-28a(+). Enzim restriksi *Nde*I memotong fragmen DNA dalam urutan 5'-CA↓TATG-3' dan komplemennya 3'-GTAT↓AC-5' (Watson *et al.*, 1982), sementara enzim *Bam*HI memotong fragmen DNA dalam urutan 5'-G↓GATCC-3' dan komplemennya 3'-CCTAG↓G-5' (Newman *et al.*, 1995). Kedua enzim ini memotong DNA plasmid dan DNA hasil sintesis yang menghasilkan fragmen DNA dengan ujung komplementer yang lengket, sehingga DNA dapat disisipkan ke dalam plasmid dengan membentuk ikatan hidrogen yang relatif stabil. Selanjutnya adalah penyambungan molekul-molekul DNA dengan menggunakan enzim DNA ligase ke dalam molekul DNA vektor. Ikatan hidrogen yang stabil memaksimalkan kerja enzim ligase dalam menghubungkan DNA dengan plasmid melalui ikatan fosfodiester (Brown, 2001).

Validasi plasmid rekombinan dilakukan dengan *elektroforesis gel agarose* 1%. Pemotongan ganda dengan enzim restriksi *Nde*I dan *Bam*HI pada plasmid rekombinan menghasilkan dua fragmen DNA. Terlihat ada dua pita muncul dengan berat molekul ± 5300 bp menunjukkan plasmid pET-28a(+) dan ± 1100 bp menunjukkan *Lon-like*-IIA-1A5 (Gambar 4). Plasmid rekombinan tanpa pemotongan dengan enzim restriksi menghasilkan pita sekitar 6000 bp, lebih besar dari ukuran plasmid pET-28a (+) yaitu 5369 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa DNA target yaitu *Lon-like*-IIA-1A5 berhasil terinsersi ke dalam plasmid pET-28a (+).

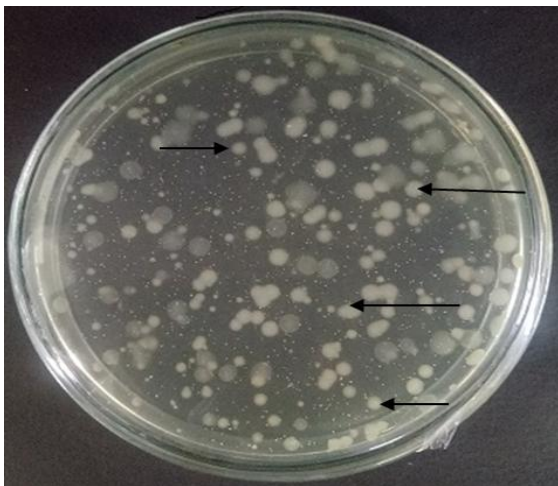


Gambar 4. Analisis restriksi plasmid rekombinan pada *elektroforesis gel agarosa* 1%, 1 = plasmid rekombinan tanpa pemotongan enzim restriksi, 2 = plasmid rekombinan yang dipotong dengan enzim *Nde*I dan *Bam*HI, M = marker

Seleksi Transforman Positif

Plasmid rekombinan yang mengandung gen penyandi *Lon-like*-IIA-1A5 diekspresikan dalam sel inang *E. coli* BL21(DE3). Kemampuan resistensi terhadap keberadaan kanamisin pada medium merupakan bentuk ekspresi dari gen *Lon-like*-IIA-1A5 yang terdapat pada vektor pET-28(+). Hal ini menandakan bahwa plasmid vektor telah berhasil masuk ke dalam sel *E. coli* BL21(DE3) dan mampu terekspresi, karena plasmid pET-28a(+) dilengkapi dengan seleksi marker berupa gen yang resisten terhadap antibiotik kanamisin. Hasil penelitian menunjukkan *E.*

E. coli BL21(DE3) yang mengandung transforman positif tumbuh membentuk koloni seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5. Tanda panah pada Gambar 5 adalah beberapa contoh *E. coli* transforman positif dengan ciri-ciri warna putih yang lebih pekat. Untuk analisis ekspresi lebih lanjut, *E. coli* yang mengandung transforman positif (*E. coli* BL21(BE3)+pET-28a(+)) ditumbuhkan dalam media *LB Broth* dan disimpan dalam bentuk *gliserol stock*.

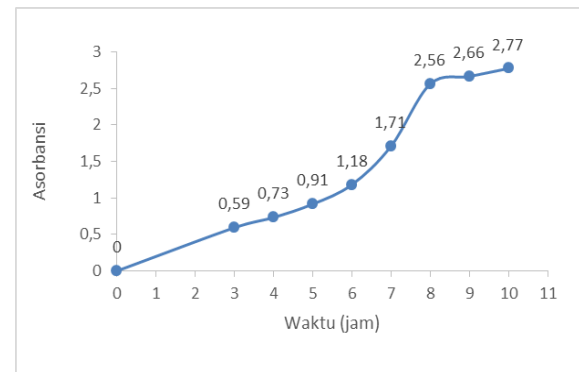


Gambar 5. *E. coli* BL21 (DE3) yang membawa plasmid rekombinan

Pertumbuhan *E. coli*

Pertumbuhan *E. coli* BL21(DE3) diukur satu jam sekali dimulai pada jam ke-3 waktu inkubasi atau awal induksi dengan IPTG sampai jam ke-10. Gambar 6 menunjukkan grafik pertumbuhan bakteri BL21(DE3) yang mengandung plasmid rekombinan. Pada jam ke-3 nilai *optical density* (OD₆₀₀) dari kultur adalah 0,59. Pada nilai OD ini pertumbuhan sel *E. coli* berada pada fase eksponensial. Soto-Rodriguez *et al.* (2017) menyatakan sintesis protein diinduksi dengan penambahan 1 mM IPTG, pada saat kultur berada pada pertengahan fase eksponensial atau fase log (telah mencapai 0,5 pada OD₆₀₀). Fase log adalah fase dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat, sehingga bila dilakukan penambahan inducer (IPTG) pada fase log akan meningkatkan produksi protein rekombinan yang diinginkan. IPTG merupakan inducer untuk meningkatkan ekspresi protein

rekombinan. IPTG merupakan senyawa yang memiliki struktur mirip laktosa dan berfungsi sebagai penginduksi ekspresi gen di bawah kontrol promotor (Griffiths *et al.*, 2015). IPTG bekerja dan menginduksi promotor T7 untuk mengekspresikan gen *lon-like-IIA-1A5*. Dengan diproduksinya protein, pertumbuhan *E. coli* relatif melambat setelah induksi sampai jam ke-6, mengalami peningkatan pada jam ke-7 dan mencapai titik stasioner pada jam ke-8. Marbach and Bettenbrock (2012) melaporkan tingkat pertumbuhan *E. coli* yang diinduksi IPTG bervariasi dalam kisaran 0,46-0,52 per jam tanpa korelasi yang jelas antara jumlah inducer dan hambatan pertumbuhan. Panen sel dilakukan pada jam ke-5 setelah induksi (jam ke-8 pertumbuhan) (Kang *et al.*, 2015) pada saat bakteri memasuki fase stasioner.

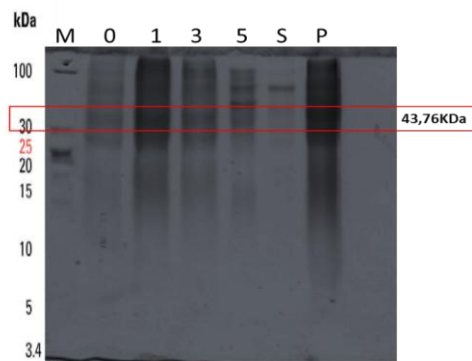


Gambar 6. Kurva pertumbuhan *E. coli* BL21(DE3) mengandung pET-28a(+)-*Lon-like IIA* yang diinduksi dengan IPTG.

Bobot Molekul *Lon-like-IIA-1A5*

E. coli BL21 (DE3) berhasil mengekspresikan *Lon-like-IIA-1A5* dalam bentuk terlarut pada lama induksi 5 jam dengan berat molekul total adalah sekitar 43,76 kDa (Gambar 7). Estimasi berat molekul *Lon-like-IIA-1A5* yang dihitung dengan menggunakan aplikasi *software expasy.org* adalah 38,83 kDa dengan nilai titik isoelektrik 9,71 (Gambar 8). Perbedaan estimasi berat molekul tersebut disebabkan karena estimasi berat molekul yang dihasilkan dari *software expasy.org* hanya didasarkan pada sekuen asam amino *Lon-like-IIA-1A5 native* saja, sedangkan estimasi berat molekul yang dihasilkan dari SDS-PAGE sudah termasuk *his-tag* dan asam amino lain yang terdapat pada vektor plasmid pET-28a

(+). Berat molekul protein *Lon-like*-IIA-1A5 yang sudah disisipkan dalam pET-28a(+) adalah 43,63 kDa. Nilai ini sama dengan hasil yang diperoleh dengan menggunakan SDS-PAGE yaitu 43,76 kDa. Hal ini berarti protein yang terekspresi pada gel hasil elektroforesis adalah protein target. Berat molekul *Lon* ditentukan oleh jumlah residu asam amino pada protein tersebut. Liao *et al.* (2012) melaporkan berat molekul *Lon* protease dari *Meiothamus taiwanensis* adalah 76 kDa.



Gambar 7. Validasi ekspresi dan bobot molekul *Lon-like* IIA dengan SDS-PAGE, M adalah marker, baris 0 adalah *E. coli* tanpa induksi IPTG, baris 1, 3 dan 5 adalah *E. coli* setelah diinduksi IPTG selama 1, 3 dan 5 jam, P adalah pelet dari *E. coli* setelah diinduksi IPTG selama 5 jam, S adalah supernatant dari *E. coli* setelah diinduksi IPTG selama 5 jam.



Gambar 8. Perhitungan nilai pI dan berat molekul dengan *software expasy.org*

KESIMPULAN

Gen *Lon-like*-IIA-1A5 terekspresi dalam sel inang *E. coli* BL21 (DE3). Pendekatan dengan kodon optimasi dan gen sintesis dapat

digunakan dalam produksi protein *Lon-like*-IIA-1A5 dengan menggunakan sel inang *E. coli* BL21 (DE3). *Lon-like*-IIA-1A5 rekombinan yang dihasilkan memiliki berat molekul sekitar 43 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kemenristek Dikti dan LPDP yang telah mendanai penelitian ini melalui Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia Dalam Negeri (BUDI-DN) dengan Nomor : PRJ-6187 /LPDP.3/2016..

DAFTAR PUSTAKA

- Arief, I.I., Budiman, C., Jenie, B., Andreas, E., Yuneni, A. 2015. Plantarisin IIA-1A5 from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 displays bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*. *Beneficial Microbes*. 6:603-613.
- Arief II, Maheswari, R.R.A., Suryati, T., Hidayati. 2006^a. Karakteristik *Lactobacillus spesies* yang diisolasi dari daging sapi. Dalam Prosiding: *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Bogor*. 861-865.
- Arief II, Suryati T, Maheswari RRA. 2006^b. Sifat fisik daging sapi *Dark Firm Dry* (DFD) hasil fermentasi bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum*. *Med Pet*. 29(2):76-82.
- Barnum, S.R. 2005. *Biotechnology an Introduction*. International Student Edition. Ed ke-2. Belmont, Thompson Brooks/Cole.
- Botos, I., Lountos, G.T., Wu, W., Cherry, S., Ghirlando, R., Kudzhaev, A.M., Rotanova, T.V., de Val, N., Tropea, J.E., Gustchina, A., Wlodawer, A. 2019. Cryo-EM structure of substrate-free *E. coli* Lon protease provides insights into the dynamics of Lon machinery. *Current Research in Structural Biology*. 1:13-20.
- Brown, T.A. 2001. *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. 4th ed, Blackwell Science Ltd., USA.

- Correddu, D., Montañó López José de Jesús., Angermayr, S.A., Middleditch, M.J., Payne, L.S., Leung, I.K.H. 2019. Effect of consecutive rare codons on the recombinant production of human proteins in *Escherichia coli*. IUBMB Life.1-9.
<https://doi.org/10.1002/iub.2162>
- Gaffar, B. 2010. Produksi Protein Rekombinan dalam Sistem Ekspresi *Pichia pastoris*. Unpad Press, Bandung.
- GenScript. 2019. Optimum Gene™ Codon: Optimization Analysis. GenScript USA Inc, Centennial Ave, USA.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Carroll, S.B., Doebley, J. 2015. *An Introduction to Genetic Analysis* (11th ed.). Freeman, W.H. & Company. pp. 400-412. ISBN 9781464109485.
- Gun, L., Yumiao, R., Haixian, P., Liang, Z. 2018. Comprehensive analysis and comparison on the codon usage pattern of whole *Mycobacterium tuberculosis* coding genome from different area. *Hindawi. Bio. Med. Research International*.
<https://doi.org/10.1155/2018/3574976>
- Hughes, R.A., Miklos, A.E., Ellington, A.D. 2011. Gene synthesis: methods and applications. *Methods Enzymol*. 498:277-309. doi: 10.1016/B978-0-12-385120-8.00012-7.
- Kang, Y.S., Song, J.A., Han, K.Y., Lee, J. 2015. *Escherichia coli* EDA is a novel fusion expression partner to improve solubility of aggregation-prone heterologous proteins. *J. Biotech*. 194: 39-47.
- Kaur, J., Kumar, A., Kaur, J. 2018. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Bio Macromol*. 106:809-822
- Laemmi, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., Iverson, B.L. 2013. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*.doi: 10.1016/j.febslet.2012.12.019.
- Liao, J.H., Kuo, C.I., Huang, Y.Y., Lin Y.C., Lin, Y.C., Yang, C.Y., Wu, W.L., Chang, W.H., Liaw, Y.C., Lin, L.H., Chang, C.I., Wu1, S.H. 2012. A lon-like protease with no ATP-powered unfolding activity. *PLoS ONE*. 7(7): e40226.
doi:10.1371/journal.pone.0040226
- Marbach, A., Bettenbrock, K. 2012. Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*.157 :82–88
- Nakamura, Y., Gojobori, T., Ikemura, T. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year. *Nucleic Acids Res*. 28:292.
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L.F., Schildkraut, I., Aggarwal, A.K. 1995. Structure of endonuclease *BamHI* and its relationship to *EcoRI*. *Nature*. 368: 660-664.
- Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F. 2016. Novel inexpensive fungi protease: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem*. 198:119-124.
doi:10.1016/j.foodchem2015.11.089.
- Pinti, M., Gibellini, L., Nasi, M., De Biasi, S., Bor, tolotti, C.A., Iannone, A., Cossarizza, A. 2016. Emerging role of Lon protease as a master regulator of mitochondrial functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 : 1300-1306.
- Rosen, R., Biran, D., Gur, E., Becher, D., Hecker, M., Ron, E.Z. 2002. Protein aggregation in *Escherichia coli*: Role of

- proteases. *FEMS Microbiol. Lett.* 207:9-12.
- Sambrook, J., Russel, D.W. 2001. Expression of cloned genes in *Escherichia coli* (chapter 15). In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Singh, N., Upadhyay, S., Jaiswar, A., Mishra, N. 2016. In silico Analysis of Protein. *J Bioinform, Genomics, Proteomics* 1(2): 1007
- Soto-Rodríguez, J., Coyle, B.L., Samuelson, A., Aravagiri, K., Baneyx, F. 2017. Affinity purification of Car9-tagged proteins on silica matrices: optimization of a rapid and inexpensive protein purification technology. *Protein Expr. Purif.* 135:70-77.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. 2016. *Principles of Fermentation Technology*. 3th Ed. Heinemann, Butterworth.
- Tian, J., Yan, Y., Yue, Q. Liu, X., Chu, X., Wu, N., Fan, Y.. 2017. Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in *E. coli*. *Sci Rep.* 7: 9926. doi:10.1038/s41598-017-10546-0
- Thies, F. L., Hartung, H.P., Giegerich, G.1998. Cloning and expression of the *Campylobacter jejuni* lon gene detected by RNA arbitrarily primed PCR. *FEMS Microbiology Letters.* 165: 329-334.
- Uttatree, S., Charoempanic, J. 2016. Isolation and characterization of a broad pH and temperature active, solven and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 8:32-38. doi:10.1016/j.bcab.2016.08.003.
- Yaraguppi, D.A., Udupudi, B.B., Patil, L.R., Hombalimath, V.S., Shet, A.R. 2012. *In-silico* analysis for predicting protein ligand interaction for snake venom protein. *J. Adv. Bioinform. Appl Research.*3(3): 345-356.
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Watson, R.J., Schildkraut, I., Qiang, B.Q., Martin, S.M., Visentin, L.P. 1982. *NdeI*: a restriction endonuclease from *Neisseria denitrificans* which cleaves DNA at 5'-CATATG-3' sequences. *Febs Letters.* 150(1):114-116.