

Pemurnian Pretrombin-2_{pH} Hasil Ko-Ekspresi *Chaperone* pada *Escherichia coli* ER2566 Menggunakan Sistem IMPACT

Iman P. Maksum¹, Ogi Budiantoro¹, Khomaini Hasan², Soetijoso Soemitro¹, Toto Subroto^{1,*}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363

²Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jalan Terusan Jendral Sudirman, Cimahi, Jawa Barat, 40285

*Penulis korespondensi: t.subroto@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v5.n2.14605>

Abstrak: Pemurnian pretrombin-2 merupakan tahap penting dalam produksi trombin sebagai salah satu komponen lem fibrin untuk mengganti teknik jahitan pasca bedah mata. Pemurnian pretrombin-2 melalui sistem IMPACT memanfaatkan aktivitas pemotongan intein yang membawa penanda afinitas *chitin-binding domain* dan tidak memerlukan enzim protease tambahan. Pemotongan pretrombin-2_{pH} dari CBD-intein dapat dilakukan melalui *C-terminal* intein dengan induksi perubahan pH dan suhu tanpa memerlukan reagen kimia tambahan. Namun dibutuhkan kondisi pH, suhu dan waktu inkubasi yang sesuai untuk memotong pretrombin-2_{pH} dari *C-terminal* intein. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi pH, suhu dan waktu inkubasi pemotongan yang dibutuhkan dalam pemurnian pretrombin-2_{pH} dengan memanfaatkan aktivitas pemotongan *C-terminal* intein. Metode yang dilakukan adalah ekspresi gen *CBD-intein-pt2_{pH}* menggunakan vektor pTWIN1 dalam *E. coli* ER2566 disertai dengan ko-ekspresi *chaperone* menggunakan plasmid pG-KJE8, isolasi CBD-intein-PT2_{pH} dengan metode sonikasi, pemurnian pretrombin-2_{pH} menggunakan sistem IMPACT, serta karakterisasi pretrombin-2_{pH} hasil pemurnian dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi inkubasi pemotongan yang dibutuhkan untuk mendapatkan pretrombin-2_{pH} murni adalah pada suhu 25°C, selama 48 jam dengan perubahan pH lingkungan kolom dari 8,5 ke 7,0. Namun efisiensi pemotongan yang dihasilkan sangat kecil. Hal ini mungkin disebabkan oleh kondisi suhu dan waktu inkubasi yang belum optimum serta diduga masih terdapat reaksi proteolisis yang mendegradasi pretrombin-2_{pH} murni yang dihasilkan.

Kata kunci: Pretrombin-2, IMPACT, pemotongan *C-terminal* intein

Abstract: *Prethrombin-2 purification is an important step in the production of thrombin as a component of fibrin glue to replace the eye postoperative suture technique. Prethrombin-2 purification by the IMPACT system utilizes cleavage activities of intein that carries a tag affinity chitin-binding domain and does not require an additional protease. Cleavage of prethrombin-2_{pH} from CBD-intein can be done by C-terminal intein with the induction of pH and temperature shifting without additional chemical reagents. However, appropriate conditions of pH, temperature and incubation time for cleavage of prethrombin-2_{pH} from the C-terminal intein are required. The objective of this study was to obtain the appropriate conditions of pH, temperature and incubation time for prethrombin-2_{pH} purification by utilizing the C-terminal cleavage of intein. The methods performed were the expression of CBD-intein-pt2_{pH} using pTWIN1 in E. coli ER2566 accompanied by co-expression of chaperone using plasmid PG-KJE8, isolation of CBD-Intein-PT2_{pH} with sonication, purification of prethrombin-2 by the IMPACT system, and characterization of prethrombin-2 purified by SDS-PAGE. Overall, this work demonstrated that conditions of cleavage induction required to obtain pure prethrombin-2 were temperature of 25°C, for 48 hours with pH shifting from 8.5 to 7.0. The cleavage was not efficient due to the temperature conditions and the incubation time that were not optimum as well as the proteolysis reactions that degraded the resultant pure prethrombin-2.*

Keywords: Prethrombin-2, IMPACT, *C-terminal* cleavage of intein

PENDAHULUAN

Dalam penelitian ini dilakukan pemurnian protein rekombinan pretrombin-2 manusia yang merupakan prekursor dari trombin sebagai salah satu komponen penyusun lem fibrin. Ekspresi pretrombin-2 dilakukan dalam *E. coli*, karena kemampuannya untuk tumbuh dengan cepat, densitasnya tinggi pada media pertumbuhan yang murah serta memiliki

ketersediaan vektor kloning dan galur inang mutan yang tinggi (Baneyx 1999).

Singh & Panda (2005) menyatakan bahwa ekspresi level tinggi protein rekombinan di dalam *E. coli* sering kali menghasilkan agregat tak larut yang disebut dengan badan inklusi. Badan inklusi merupakan protein yang tidak memiliki aktivitas biologis (Vallejo & Rinas, 2005). Ada beberapa cara

yang dapat digunakan untuk mengurangi badan inklusi pada ekspresi protein rekombinan dalam *E. coli*, antara lain, penggunaan penanda afinitas seperti *maltose-binding protein* (MBP), mengurangi suhu selama proses ekspresi, mengurangi laju ekspresi, optimasi parameter bioproses, atau dengan cara ko-ekspresi chaperone (Hartinger *et al.* 2010). Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan ko-ekspresi chaperone pada *E. coli* ER2566 menggunakan plasmid pG-KJE8 (Wildan 2014). Chaperone mengarahkan sejumlah besar proses pelipatan dalam seluruh siklus kehidupan protein, dari mulai sintesis hingga degradasi (Mogk *et al.* 2002). Plasmid pG-KJE8 memiliki gen yang mengekspresikan dua kelompok *chaperone* antara lain *dnaJ*, *dnaK* dan *grpE* dengan induksi L-arabinosa serta *groEL* dan *groES* dengan induksi tetrasiklin (Wilson 2009). Dalam penelitian sebelumnya dinyatakan bahwa induksi dengan tetrasiklin yang mengekspresikan *groEL* dan *groES* lebih efektif dalam meningkatkan protein terlarut dibandingkan induksi dengan L-arabinosa ataupun induksi dengan keduanya (Wildan 2014).

Protein rekombinan pretrombin-2 yang telah diekspresikan, selanjutnya dimurnikan dengan metode pemurnian yang menggunakan penanda afinitas. Menurut Lichty *et al.* (2005), penanda afinitas merupakan metode yang sangat efektif untuk pemurnian kompleks protein rekombinan. Metode pemurnian penanda afinitas memiliki beberapa keunggulan yaitu, pemurnian dilakukan dalam satu tahap, memiliki dampak yang kecil terhadap struktur tersier dan aktivitas biologis, serta dapat digunakan untuk memurnikan berbagai jenis protein yang berbeda (Terpe 2003). Beberapa jenis penanda afinitas yang dapat digunakan untuk pemurnian protein rekombinan antara lain, *polyarginine-tag* (*Arg-tag*), *polyhistidine-tag* (*His-tag*), *calmodulin-binding peptide*, *cellulose-binding domain*, *chitin-binding domain*, *glutathione S-transferase tag*, dan *maltose-binding protein* (Terpe 2003).

Penanda afinitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *chitin-binding domain* (CBD) yang diaplikasikan dalam sistem pemurnian protein yang disebut IMPACT. Sistem IMPACT memiliki keunggulan dibandingkan dengan sistem penanda afinitas lainnya. Sistem ini hanya memerlukan satu kolom, tidak perlu langkah tambahan untuk menghilangkan penanda afinitas, dapat dilakukan terhadap urutan protein natif, dapat dilakukan terhadap protein target yang dilekatkan pada intein melalui N-terminal maupun C-terminal, serta tidak memerlukan enzim protease tambahan (NEB 2013).

IMPACT adalah suatu sistem pemurnian protein yang dikembangkan oleh *New England Biolabs* (NEB). Sistem IMPACT memanfaatkan aktivitas pemotongan terinduksi dari suatu protein yang disebut intein. Intein adalah protein analog dari intron, berada dalam kerangka yang diapit urutan protein lain yang disebut ekstein (Wu *et al.* 2002).

Protein target, dalam hal ini pretrombin-2, menyatu dengan penanda yang terdiri dari intein dan CBD, sehingga memungkinkan dilakukan pemurnian secara afinitas pada kolom kitin. Intein dapat mengalami pemotongan dengan penambahan reagen tiol atau perubahan suhu dan pH, sehingga memfasilitasi pretrombin-2 untuk terlepas dalam keadaan murni (NEB 2013).

Pretrombin-2 digabungkan pada bagian C-terminal dari intein agar dapat mengalami pemotongan dengan cara terinduksi oleh perubahan pH dan suhu tanpa memerlukan reagen kimia tambahan. Dalam petunjuk pengerjaan yang dijelaskan oleh NEB (2013), pemotongan protein target dari C-terminal intein dapat dilakukan dengan inkubasi selama 16 jam pada suhu 25°C dengan induksi perubahan pH dari 8,5 ke 7,0. Jika pada kondisi tersebut pemotongan tidak terjadi, NEB (2013) menyarankan untuk meningkatkan waktu inkubasi menjadi 40 jam atau mengubah pH pemotongan menjadi 6,5 sampai 6,0. Beberapa peneliti telah berhasil melakukan pemurnian protein rekombinan menggunakan sistem IMPACT, namun kondisi inkubasi pemotongan optimum yang didapatkan oleh para peneliti sebelumnya seringkali berbeda. Guo *et al.* (2004) berhasil memurnikan protein gelonin (29 kDa) menggunakan sistem IMPACT melalui induksi pemotongan pada suhu 25°C, pH 6,5 selama 48 jam, sedangkan Singleton *et al.* (2002) telah berhasil memurnikan protein RecA (37 kDa) dengan kondisi inkubasi pemotongan pada suhu 37°C, pH 6,0 selama 16 jam. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan kondisi inkubasi pemotongan yang dibutuhkan dalam pemurnian pretrombin-2_{pH} menggunakan sistem IMPACT.

Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan kondisi pH, suhu dan waktu inkubasi pemotongan yang diperlukan dalam pemurnian pretrombin-2_{pH} menggunakan sistem IMPACT dengan induksi pemotongan melalui perubahan pH dan suhu. Maksud penelitian ini adalah untuk mengembangkan produksi trombin rekombinan sebagai komponen lem fibrin pengganti teknik jahitan pascabedah mata. Dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan suatu alternatif baru yang memiliki nilai lebih dalam dunia medis, khususnya dalam teknik perekatan pasca bedah mata. Selain itu diharapkan dapat menambah wawasan dan ilmu pengetahuan baru dalam bidang biomolekular tentang sistem pemurnian protein.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan media LB 500 mL

Sebanyak 5 g tripton, 2,5 g *yeast extract*, dan 5 g natrium klorida dilarutkan dengan akuabides pada labu erlenmeyer. Mulut labu erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dibungkus kassa-aluminium foil. Larutan tersebut kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*.

Ekspresi *CBD-intein-pt_{2pH}*

Sebanyak 100 μ L sel transforman *E. coli* ER2566[pG-KJE8+pTWIN1-*pt_{2pH}*] ditumbuhkan dalam 5 mL media LB yang telah mengandung antibiotik ampisilin (100 μ g/mL) dan kloramfenikol (50 μ g/mL) selama 16 jam pada suhu 37°C dengan laju pengocokan 150 rpm. Kultur diambil sebanyak 500 μ L, kemudian dimasukkan ke dalam media LB cair 500 mL yang mengandung ampisilin 100 μ g/mL, kloramfenikol 50 μ g/mL, dan *inducer* tetrasiklin 10 ng/mL, diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37°C dengan laju pengocokan 150 rpm. Kultur diambil 1 mL untuk pengukuran nilai OD_{600nm} pada spektrofotometer UV-Vis (OD_{600nm} sekitar 0,5-0,8). 1 mL kultur diambil dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 g, suhu 4°C selama 10 menit untuk diambil peletnya, kemudian dilarutkan dalam 40 μ L bufer glisin (t₀: sel transforman sebelum induksi oleh IPTG). Kultur diinduksi oleh IPTG dengan konsentrasi akhir 75 μ M, lalu diinkubasi selama 6 jam pada suhu 22°C, dengan laju pengocokan 150 rpm. Sebanyak 1 mL diambil dan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 g, suhu 4°C selama 10 menit untuk diambil peletnya, kemudian dilarutkan dalam 40 μ L bufer glisin (t₁: sel transforman setelah induksi oleh IPTG). Hasil ekspresi dipanen pada tabung *falcon* dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 8.000 g, suhu 4°C selama 10 menit. Pelet hasil ekspresi ditambahkan dengan 15 mL bufer A (Tris-HCl 20 mM pH 8,5; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM; tween-20 1%; PMSF 20 μ M), lalu dilakukan sonikasi selama 3×10 menit (2 detik *on*/ 2 detik *off*), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan diambil 1 mL, disimpan pada suhu -20°C sebagai fraksi terlarut (S) untuk karakterisasi, dan sisa dari supernatan digunakan sebagai fraksi terlarut untuk dilanjutkan pada proses pemurnian. Pelet yang masih ada pada tabung *falcon* diambil dengan tip pipet, dimasukkan ke dalam tabung mikro lalu ditambahkan 100 μ L urea 8 M, lalu dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil 40 μ L ke dalam tabung mikro sebagai fraksi tidak larut (IF).

Pemurnian pretrombin-2_{pH} dengan sistem IMPACT

Sebanyak 5 mL matriks kitin dikemas ke dalam kolom. Matriks kitin dielusi dengan akuabides 200 mL, selanjutnya disetimbangkan dengan 60 mL bufer B (Tris-HCl 20 mM pH 8,5; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM) pada suhu 4°C. Fraksi terlarut CBD-intein-PT2_{pH} dimasukkan ke dalam kolom kitin dengan laju alir 6 tetes/menit, lalu ditampung sebagai *flow-trough*. Kolom dicuci dengan 80 mL bufer B, dengan laju alir 2 mL/menit, selanjutnya dicuci dengan bufer C (Tris-HCl 20 mM; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM) sebanyak 60 mL dan ditampung sebagai *flush* dengan variasi pH bufer C terdiri atas

pH 7,0; 6,5 dan 6,0. Resin kitin diambil 100 μ L sebagai Resin-1 (Resin sebelum induksi pemotongan). Selanjutnya dilakukan induksi pemotongan, optimasi pH dilakukan pada variasi pH 7,0; 6,5 dan 6,0. Kolom diinkubasi pada variasi suhu 25°C dan 37°C dengan variasi waktu inkubasi 16 dan 48 jam. Setelah inkubasi pemotongan, resin kitin diambil 100 μ L sebagai Resin-2 (Resin setelah induksi pemotongan). Kemudian kolom dielusi dengan bufer C sebanyak 18 mL dan ditampung 8 fraksi dengan volume masing-masing 2 mL.

Kolom kitin yang telah digunakan diregenerasi dengan 15 mL SDS 1%, didiamkan selama 30 menit, dan ditampung sebagai hasil regenerasi (*stripping*). Kemudian dielusi dengan 25 mL akuabides dan 25 mL bufer B.

Karakterisasi hasil pemurnian dengan analisis SDS-PAGE

Karakterisasi hasil ekspresi protein dilakukan dengan metode SDS-PAGE. Sampel hasil ekspresi dan pemurnian diambil sebanyak 40 μ L dan dicampur dengan 5 μ L bufer sampel 5× di dalam tabung mikro 1,5 mL. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit pada *waterbath*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 g selama 1 menit pada suhu 4°C. Masing-masing sampel sebanyak 10 μ L dan marker protein sebanyak 5 μ L dimasukkan ke dalam *well*. Kabel elektroda dipasangkan dengan perangkat elektroforesis kemudian gel di-*running* pada 100 volt selama 100-120 menit. Selanjutnya, gel direndam dalam larutan *coomassie brilliant blue R-250 staining solution* selama 24 jam. Gel dibilas dengan larutan *destaining solution* selama 24 jam, kemudian direndam dalam akuades dan dapat disimpan dalam plastik mika sampai kering agar dapat didokumentasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi *CBD-intein-pt_{2pH}*

CBD-intein-pt_{2pH} diekspresikan menggunakan vektor pTWIN1 yang memiliki dua buah gen *mini-intein*, yaitu *Ssp dnaB* dan *Mxe gyrA*. Dalam penelitian ini, pretrombin-2 digabungkan pada *C-terminal* CBD-*Ssp DnaB mini-intein*, sehingga pemotongan pretrombin-2 dilakukan dengan induksi perubahan pH dan suhu tanpa memerlukan zat kimia tambahan seperti reagen tiol. Ekspresi dilakukan dalam sel inang *E. coli* ER2566. Galur ini membawa salinan kromosom dari gen T7 RNA polimerase yang disisipkan ke dalam gen *lacZ* di bawah kendali promotor lac (NEB 2013), sehingga sesuai dengan vektor pTWIN1 yang memiliki promotor T7 dan dapat mengendalikan laju ekspresi hingga lima kali lebih cepat dari pada *E. coli* RNA polimerase (Grossman *et al.* 1998). Untuk mengurangi protein target yang diekspresikan dalam bentuk badan inklusi, dalam penelitian sebelumnya, Wildan (2014) telah melakukan ko-ekspresi chaperon menggunakan

plasmid pG-KJE8 ke dalam *E. coli* ER2566, sehingga terdapat *chaperon* eksogen di dalam sel inang yang membantu proses pelipatan protein membentuk konformasi yang benar.

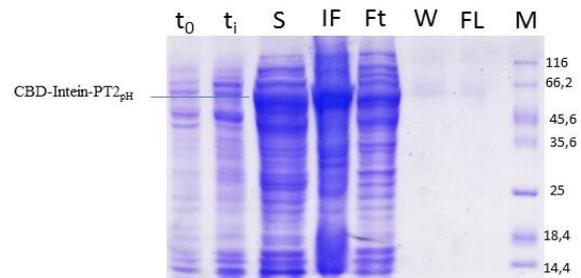
Eksresi dilakukan dalam media LB 500 mL yang mengandung antibiotik ampicilin (100 µg/mL) dan kloramfenikol (50 µg/mL). Kedua antibiotik ini merupakan sistem seleksi pertumbuhan bakteri, plasmid pTWIN1 mengandung gen yang resisten terhadap ampicilin sementara plasmid pG-KJE8 mengandung gen yang resisten terhadap kloramfenikol. pG-KJE8 memiliki dua kelompok *chaperone*, yaitu DnaK-DnaJ-GrpE yang diekspresikan oleh promotor *araB* melalui induksi L-arabinosa dan GroEL/GroES yang diekspresikan oleh promotor *pzt1* melalui induksi tetrasiklin. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wildan (2014), penggunaan *inducer* tetrasiklin lebih efektif dalam meningkatkan fraksi terlarut dibandingkan dengan L-arabinosa ataupun keduanya (tetrasiklin dan L-arabinosa). Oleh karena itu, *inducer chaperone* yang digunakan dalam penelitian ini hanya tetrasiklin. Induksi GroEL/GroES menggunakan tetrasiklin dilakukan sebelum induksi CBD-intein-PT_{2pH}, hal ini dilakukan agar *chaperon* telah siap untuk membantu pelipatan, sebelum protein target diekspresikan.

Eksresi CBD-intein-pt_{2pH} dilakukan dengan induksi IPTG 75 µM. IPTG merupakan alolaktosa yang dapat menginduksi promotor T7 pada operon *lac* namun tidak berperan sebagai sumber nutrisi bagi pertumbuhan *E. coli*. Oleh karena itu, konsentrasi IPTG yang terdapat pada media, tidak berkurang selama masa pertumbuhan bakteri. Suhu induksi *E. coli* ER2566 tidak jauh dari suhu ruang, yaitu 22°C, kondisi ini merupakan suatu keunggulan dalam tujuan produksi skala industri dibandingkan dengan *E. coli* galur lain seperti galur (DE3)-ArticExpress yang memerlukan suhu induksi 12°C.

Pelet yang didapatkan dari hasil ekspresi diresuspendi menggunakan bufer A. Isolasi protein target dari sel *E. coli* dilakukan dengan sonikasi. Sonikasi mampu memecah membran sel *E. coli* melalui interaksi secara fisik dan mengeluarkan protein target, sedangkan tween-20 yang terkandung dalam bufer A merupakan deterjen non-ionik yang berfungsi untuk memecah membran sel secara kimia. Proses sonikasi dilakukan pada suhu 4°C, agar protein target tidak terdenaturasi akibat suhu panas yang ditimbulkan oleh sonikator.

Gambar 1 memperlihatkan bahwa, protein fusi CBD-intein-PT_{2pH} yang memiliki berat molekul 63 kDa berhasil diekspresikan. *E. coli* ER2566 setelah induksi (t_i) terlihat memiliki pita protein fusi CBD-intein-PT_{2pH} yang lebih tebal dibandingkan sebelum induksi (t₀), hal ini menunjukkan bahwa induksi menggunakan IPTG berhasil meningkatkan ekspresi gen *CBD-intein-pt_{2pH}*. IPTG terlibat dalam regulasi negatif operon *lac*, keberadaan IPTG akan mengubah konformasi dari represor *lac*, hal ini menyebabkan

represor *lac* tidak lagi mampu untuk terikat pada operator. Ketika represor tidak terikat pada operator, maka ekspresi gen target akan berlangsung dan menghasilkan protein yang diinginkan (Nelson & Cox, 2013).



Gambar 1. Karakterisasi SDS-PAGE 12% hasil ekspresi *CBD-intein-pt_{2pH}* menggunakan vektor pTWIN1 dalam *E. coli* ER2566 disertai dengan ko-ekspresi *chaperone* GroEL/GroES menggunakan plasmid pG-KJE8. M: marker; IF: badan inklusi; S: fraksi terlarut; t₀: *E. coli* ER2566 sebelum induksi; t_i: *E. coli* ER2566 setelah induksi.

Tidak adanya modifikasi pascatranslasi di dalam sistem ekspresi *E. coli*, menyebabkan protein target yang diekspresikan seringkali mengalami kesalahan pelipatan. Kesalahan pelipatan yang dialami protein target menyebabkan protein tidak diekspresikan sebagai fraksi terlarut, melainkan membentuk agregat protein tak larut yang disebut badan inklusi (Shing & Panda 2005). Gambar 1 menunjukkan bahwa CBD-intein-PT_{2pH} yang diekspresikan dalam bentuk fraksi terlarut (S) cukup tinggi, dilihat dari ketebalan pita di sekitar 63 kDa yang hampir sama dengan ketebalan pita pada badan inklusi (IF). Ko-ekspresi *chaperone* GroEL/GroES menggunakan plasmid pG-KJE8 dengan induksi tetrasiklin 10 ng/mL terbukti berhasil membantu proses pelipatan CBD-intein-PT_{2pH}, sehingga meningkatkan fraksi terlarut CBD-intein-PT_{2pH} yang diekspresikan.

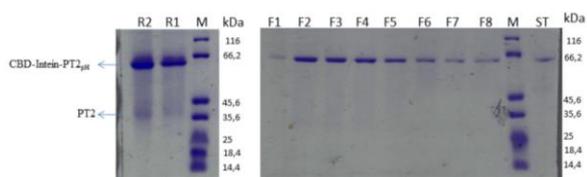
Pemurnian Pretrombin-2_{pH} Menggunakan Kolom Kitin

Upaya untuk memperoleh pretrombin-2 murni dilakukan dengan sistem pemurnian IMPACT. Untuk melakukan pemurnian dengan sistem tersebut, pretrombin-2 diekspresikan dalam bentuk protein fusi CBD-intein-PT_{2pH}. CBD merupakan penanda afinitas yang memiliki kemampuan untuk terikat secara spesifik terhadap matriks kitin, sedangkan intein merupakan protein yang memfasilitasi pemotongan pretrombin-2 dari penanda afinitasnya. Penggunaan sistem pemurnian ini tidak memerlukan tambahan protease dalam pemotongan protein target dari CBD-Intein.

Fraksi terlarut hasil lisis dimasukkan ke dalam kolom kitin yang sebelumnya telah ditimbang dengan bufer B sebanyak 10× volume kitin. Proses penyetimbangan bertujuan untuk mengondisikan

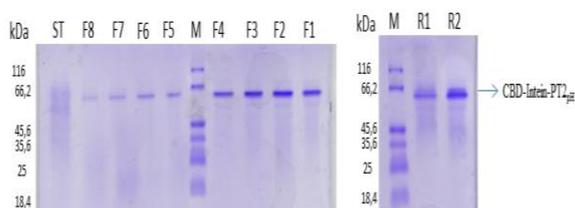
lingkungan kolom kitin agar berada pada pH 8,5 dan suhu 4°C. Kondisi ini merupakan kondisi yang sesuai untuk pengikatan CBD terhadap kolom kitin. Fraksi terlarut dimasukkan ke dalam kolom dengan laju alir 1 tetes/10 detik sesuai dengan petunjuk dari Coolbaugh & Wood (2014). Dengan laju alir yang lambat, protein fusi diharapkan memiliki kesempatan untuk terikat pada matriks kitin.

Kondisi pH pemotongan merupakan faktor penting dalam pemurnian protein yang memanfaatkan pemotongan *C-terminal* intein. Untuk mengetahui pH yang sesuai dalam mendapatkan pretrombin-2 murni, maka pemurnian dilakukan dalam tiga variasi pH induksi pemotongan yaitu 7,0, 6,5 dan 6,0 selama 16 jam pada suhu 25°C.



Gambar 2. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian pretrombin-2 dengan inkubasi pemotongan selama 16 jam; 25°C; pH 7. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-8): fraksi hasil elusi, ST: *Stripping*.

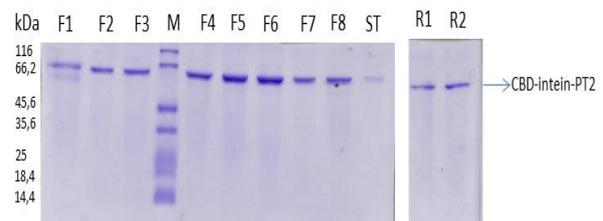
Gambar 2 menunjukkan hasil karakterisasi menggunakan SDS PAGE 10% dari hasil pemurnian dengan inkubasi pemotongan menggunakan bufer C pH 7,0, pada suhu 25°C selama 16 jam. Resin kitin setelah pemotongan (R2) menunjukkan dua pita, yaitu pita protein fusi CBD-intein-PT2_{pH} dan (±63 kDa) dan pretrombin-2 (±35 kDa). Hal ini menunjukkan bahwa, pada kondisi ini, pretrombin-2 berhasil dipotong dari *C-terminal* intein namun dengan efisiensi yang sangat kecil, sehingga pada fraksi hasil elusi tidak menunjukkan keberadaan pretrombin-2.



Gambar 3. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian pretrombin-2 dengan inkubasi pemotongan selama 16 jam; 25°C; pH 6,5. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-8): fraksi hasil elusi, ST: *Stripping*.

Sementara itu, pada dua kondisi pH pemotongan lainnya (6,5 dan 6,0) sama sekali tidak menunjukkan adanya pemotongan pretrombin-2 dari *C-terminal*

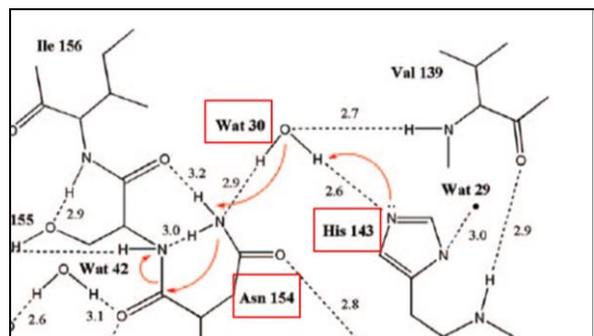
intein, baik pada resin maupun pada fraksi hasil elusi. Hasil karakterisasi dari kedua kondisi pemurnian tersebut secara berturut-turut ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 4. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian pretrombin-2 dengan inkubasi pemotongan selama 16 jam; 25°C; pH 6,0. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-8): fraksi hasil elusi, ST: *Stripping*.

Dari ketiga hasil di atas maka dapat disimpulkan bahwa, kondisi pH induksi yang sesuai untuk proses pemotongan pretrombin-2 dari *C-terminal* intein adalah pH 7,0. Kondisi pH hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Humphries *et al.* (2002) yang berhasil melakukan pemurnian protein PorA (42 kDa) dengan memanfaatkan aktivitas pemotongan dari *C-terminal* intein.

Berdasarkan mekanisme pemotongan *C-terminal* *Ssp* DnaB *mini-intein* yang dijelaskan oleh Ding *et al.* (2003), pemotongan terjadi melalui siklisasi Asn143 akibat adanya transfer proton dari ion hidronium. Untuk mendapatkan ion hidronium, maka kondisi pH lingkungan harus diubah ke arah yang lebih asam, oleh sebab itu variasi pH induksi pemotongan dilakukan pada pH 7,0, 6,5 dan 6,0, lebih asam dari kondisi pH pada saat pengikatan CBD-intein-PT2_{pH} pada matriks kitin (pH 8,5).

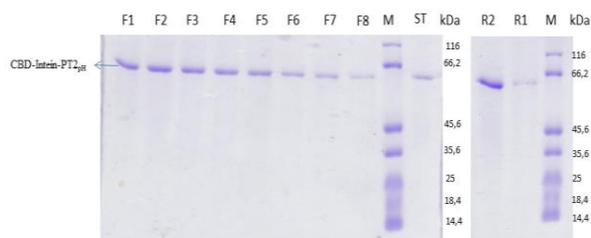


Gambar 5. Mekanisme siklisasi residu Asn154 pada *C-terminal* *Ssp* DnaB *mini-intein* melalui transfer proton yang melibatkan molekul air dan residu His 143 (Ding *et al.*, 2003).

Selain itu, Ding *et al.* (2003) juga menjelaskan bahwa, pemotongan *C-terminal* *Ssp* DnaB *mini-intein* dipengaruhi oleh residu His143. Gambar 5 menunjukkan bahwa residu His143 terlibat dalam

transfer proton yang melibatkan ion hidronium dan residu Asn154. His143 berfungsi dalam melakukan deprotonasi terhadap ion hidronium, selanjutnya ion hidronium akan mengambil proton dari atom N pada residu Asn154, atom N Asn154 kemudian melakukan serangan nukleofil terhadap atom C dari gugus karbonil, sehingga mengakibatkan terjadinya siklisasi Asn154, siklisasi Asn154 menyebabkan *C-terminal Ssp DnaB mini-intein* terlepas dari protein target yang diinginkan. Deprotonasi yang terjadi pada ion hidronium, dilakukan oleh atom N dari rantai samping His143, oleh sebab itu pH lingkungan harus dikondisikan untuk mendekati nilai pK_R dari asam amino histidin yang menentukan atom N pada rantai samping histidin tersebut terprotonasi atau terdeprotonasi. Kondisi induksi pemotongan pada pH 7 mendekati nilai pK_R histidin, yaitu 6,0 (Nelson & Cox 2013). Ada pula peneliti yang mendapatkan pH 6,0 dan 6,5 sebagai pH optimum dalam melakukan pemurnian protein rekombinan yang memanfaatkan aktivitas pemotongan *C-terminal intein* (Guo *et al.* 2004; Singleton *et al.* 2002). Perbedaan ini dapat terjadi akibat pengaruh residu asam amino protein target yang berada dekat dengan daerah katalitik *C-terminal intein*.

Chong *et al.* (1996) mengungkapkan bahwa efisiensi pemotongan protein target dari *C-terminal intein* dapat ditingkatkan dengan meningkatkan suhu induksi pemotongan. Oleh sebab itu, pada penelitian ini dilakukan kondisi pemurnian pada suhu 37°C, selama 16 jam dengan pH pemotongan 7,0. Suhu 37°C telah berhasil digunakan oleh Singleton *et al.* (2002) dalam mendapatkan protein RecA murni dengan memanfaatkan aktivitas pemotongan *C-terminal intein*.

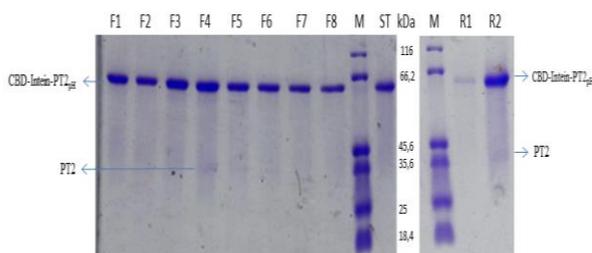


Gambar 6. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian pretrombin-2 dengan induksi pemotongan selama 16 jam; 37°C; pH 7. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-8): fraksi hasil elusi, ST: *Stripping*.

Gambar 6 menunjukkan bahwa hasil pemurnian dengan kondisi induksi pemotongan pada suhu 37°C, 16 jam dengan pH pemotongan 7,0 tidak berhasil memotong pretrombin-2 dari *C-terminal intein*, baik pada resin maupun fraksi hasil elusi. Hal ini mungkin terjadi karena pada suhu tinggi terjadi perubahan konformasi protein fusi CBD-intein-PT_{2pH}, akibatnya, intein tidak berada pada konformasi yang

benar, sehingga tidak menjalankan aktivitas pemotongan.

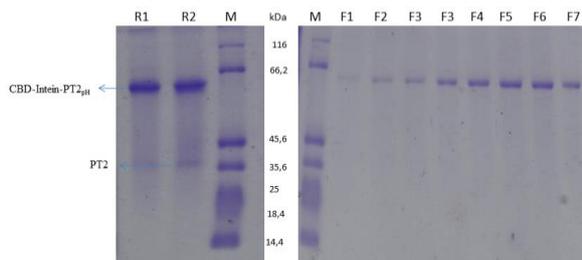
Dari hasil yang telah ditampilkan, dapat disimpulkan bahwa kondisi inkubasi pemotongan yang sesuai untuk mendapatkan pretrombin-2 murni adalah dengan pH pemotongan 7,0 dan suhu inkubasi 25°C. Waktu inkubasi pada tahap induksi pemotongan juga berpengaruh terhadap efisiensi pemotongan protein target dari *C-terminal intein* (Humphries *et al.*, 2002). Untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap proses pemotongan *C-terminal intein*, pada penelitian ini dilakukan pemurnian selama 48 jam pada suhu 25°C dengan pH pemotongan 7,0.



Gambar 7. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian Pretrombin-2 dengan induksi pemotongan selama 48 jam; 25°C; pH 7,0. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-8): fraksi hasil elusi, ST: *Stripping*.

Gambar 7 menunjukkan hasil pemurnian dengan induksi pemotongan yang dilakukan selama 48 jam, 25°C, dengan pH pemotongan 7,0. Hasil pemurnian pada kondisi ini menunjukkan bahwa pretrombin-2 berhasil dipotong dari *C-terminal intein*, ditunjukkan pada resin setelah pemotongan (R2) yang memperlihatkan pita pretrombin-2 (± 35 kDa). Selain itu pada fraksi ke-4 hasil elusi (F4) nampak pula pita pretrombin-2. Hanya saja pita pretrombin-2 yang muncul sangat tipis, menunjukkan bahwa efisiensi pemotongan yang terjadi masih rendah. Namun, hal ini membuktikan bahwa waktu inkubasi yang dilakukan selama 48 jam menunjukkan hasil yang lebih baik dari pada waktu inkubasi selama 16 jam, dengan adanya pita pretrombin-2 pada fraksi hasil elusi yang sebelumnya tidak nampak pada saat inkubasi dilakukan selama 16 jam.

Berdasarkan hasil yang ditunjukkan pada Gambar 7 yang memperlihatkan pengaruh positif dari peningkatan waktu inkubasi, maka pada penelitian ini dilakukan pula pemurnian dengan induksi pemotongan yang dilakukan selama 72 jam, pada suhu 25°C dengan pH pemotongan 7,0. Karakterisasi dari hasil pemurnian dengan kondisi ini ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Karakterisasi SDS-PAGE 10% hasil pemurnian pretrombin-2 dengan inkubasi pemotongan selama 72 jam; 25°C; pH 7,0. M: Marker protein, R1: resin sebelum pemotongan, R2: resin setelah pemotongan, F (1-7): fraksi hasil elusi, (ST) *Stripping*.

Gambar 8 menunjukkan bahwa pita pretrombin-2 hanya terdapat pada resin setelah pemotongan, namun tidak terdapat pada fraksi-fraksi hasil elusi. Hal ini menunjukkan bahwa, tidak selamanya peningkatan waktu inkubasi dapat meningkatkan perolehan protein target yang murni. Hal ini dapat terjadi akibat reaksi proteolisis yang terjadi pada pretrombin-2 oleh protease yang dihasilkan oleh *E. coli* ER2566. Hasil penelitian Humphries *et al.* (2002) juga menyatakan bahwa reaksi proteolisis terjadi saat inkubasi pemotongan dilakukan selama 72 jam (3 hari). Menurut NEB (2013), *E. coli* ER2566 memiliki sifat defisien protease *lon* dan *ompT*, namun hal ini tidak mutlak mencegah terjadinya reaksi proteolisis. Dalam penelitian ini juga telah digunakan inhibitor protease PMSF untuk menghambat aktivitas protease serin, hanya saja konsentrasi PMSF yang digunakan (20 µM) terlalu rendah. Konsentrasi PMSF yang seharusnya digunakan untuk menghambat aktivitas protease serin adalah 0,1 sampai 1 mM (*Life technologies*).

Aspek lain yang berpengaruh dalam pemurnian yang memanfaatkan pemotongan terinduksi dari *C-terminal* intein adalah jenis residu asam amino pada *N-terminal* protein target. Dari hasil konstruksi gen yang dilakukan oleh Maksum dkk. (2013), gen yang mengode pretrombin-2 diligasikan ke dalam vektor pTWIN1 melalui sisi pemotongan enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI* (Gambar 6). *N-terminal* pretrombin-2 tidak langsung terhubung terhadap *C-terminal* intein. Terdapat 11 residu asam amino tambahan yang berasal dari *Multiple Cloning Site* (MCS) vektor pTWIN1 pada *N-terminal* pretrombin-2. Residu asam amino yang berhubungan langsung dengan *C-terminal* intein adalah glisin (Gly).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chong *et al.* (1996), residu asam amino Gly merupakan residu yang disukai sebagai *N-terminal* protein target dalam efisiensi pemotongan *C-terminal* intein. Menurut Chong *et al.* (1996), efisiensi pemotongan *C-terminal* intein dari protein target dengan residu Gly pada *N-terminal* yang diinkubasi pada suhu 23°C selama 40 jam adalah lebih dari 90%. Humphries *et al.* (2002) juga telah membuktikan

bahwa penggunaan asam amino Gly sebagai residu asam amino pada *N-terminal* protein PorA dapat meningkatkan efisiensi pemotongan protein target dari *C-terminal* intein. Namun dalam penelitian ini, efisiensi pemotongan yang didapatkan masih sangat kecil, pita pretrombin-2 (±35 kDa) yang nampak pada fraksi ke-4 hasil pemurnian pada kondisi induksi pemotongan selama 48 jam, pada suhu 25°C dengan pH pemotongan 7,0 terlihat sangat tipis. Hal ini dapat diakibatkan karena kondisi dari suhu dan waktu induksi pemotongan yang belum optimal, karena pada penelitian ini variasi kondisi suhu dan waktu inkubasi pemotongan yang dilakukan hanya sedikit.

KESIMPULAN

Kondisi inkubasi pemotongan yang diperlukan dalam pemurnian pretrombin-2 menggunakan sistem IMPACT adalah pada suhu 25°C, selama 48 jam dengan perubahan pH dari 8,5 ke 7, ditunjukkan dengan adanya pita pretrombin-2 (±35 kDa) pada resin setelah pemotongan dan pada fraksi ke-4 hasil elusi.

DAFTAR PUSTAKA

- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinian in Biotechnology*. 10: 411-421.
- Chong, S., Montello, G.E., Zhang, A., Cantor, A.J., Liao, W., Xu, M.Q. & Benner, J. (1996). Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. *Nucleic Acids Research*. 26: 5109-5115.
- Coolbaugh, M.J. & Wood, D.W. (2014) Purification of *E. coli* proteins using a self-cleaving chitin-binding affinity tag. In: Giannone R. & Dykstra A. (eds). *Protein Affinity Tags. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press. New York.. 1177: 47-58.
- Ding, Y., Xu, M., Ghosh, I., Chen, X., Ferrandon, S., Lesage, G. & Rao, Z. (2003). Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 39133-39142.
- Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy S.R. & Osburne, M.S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209: 95-103.
- Guo, C., Li, Z., Shi, Y., Xu, M., Wise, J.G., Trommer, W.E. & Yuan, J. (2004). Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin. *Protein Expression and Purification*. 37: 361-367.
- Hartinger, D., Heinl, S., Schwartz, H.E., Grabherr, R., Schatmayr, G., Haltrich, D. & Moll, W.D. (2010). Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of

- aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B₁. *Microbial Cell Factories*. 9: 62.
- Humphries, H. E., Christodoulides, M. & Heckels, J. E. (2002). Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag. *Protein Expression & Purification*. 26: 243-248.
- Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J. & Tan, S. (2005). Reprint of: Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*. 41: 98-105.
- Maksum, I. P., Subroto, T., Gaffar, S., Enus, S. & Soemitro, S. (2013). Pengembangan produksi trombin rekombinan sebagai komponen lem fibrin pengganti jahitan pada bedah mata. *Laporan Kemajuan Tahun Pertama Penelitian Unggulan Strategi Nasional*. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Mogk, A., Mayer, M.P. & Deurling, E. (2002). Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *ChemBioChem*. 3: 807-814.
- Nelson, D. L. & Cox, M.M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Sixth Edition. W. H. Freeman and Company. New York.
- NEB. 2013. Protein Expression and Analysis. IMPACT™ kit instruction manual. New England BioLabs, Inc.
- Singleton, S.F., Simonette, R.A., Sharma, N.C. & Roca, A.I. (2002). Intein-mediated affinity-fusion purification of the *Escherichia coli* RecA protein. *Protein Expression & Purification*. 26: 476-488.
- Singh, S.M. & Panda A.K. (2005). Solubilization and Refolding of Bacteria Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99: 303-310.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60: 523-533.
- Valejo, L.F. & Rinas U. (2005). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*. 3: 11.
- Wildan, D.Y.A. (2014). *Pengaruh ko-ekspresi chaperon terhadap ekspresi intein-pretrombin-2-Ti,pH pada Escherichia coli galur ER2566*. Skripsi. FMIPA. Universitas Padjadjaran. Sumedang.
- Wilson, K. (2009). *Optimization of protein expression of four transcription factors using chaperone proteins*. Theses. University of Connecticut. Connecticut.
- Wu, W., Wood, D.W., Belfort, G., Derbyshire, V. & Belfort, M. (2002). Intein-mediated purification of cytotoxic endonuclease I-TevI by insertional inactivation and pH-controllable splicing. *Nucleic Acids Research*. 30: 4864-4871.