

Produksi Enzim Cas9 Rekombinan Termotabil dari *Geobacillus kaustophilus* TBUI01 pada *Escherichia coli* BL21 dengan Metode Purifikasi Presipitasi Amonium Sulfat = Production of Thermostable Recombinant Cas9 Enzyme from *Geobacillus kaustophilus* TBUI01 in *Escherichia coli* BL21 with Ammonium Sulfate Precipitation Purification Method

Sinaga, Michella Anastacia, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920524515&lokasi=lokal>

Abstrak

Enzim Cas9 merupakan bagian dari CRISPR-Cas9 yang berperan sebagai endonuklease untuk memotong DNA/RNA pada sekuens yang spesifik. Enzim Cas9 berguna dalam bidang kesehatan, pangan, dan industri. Namun, banyak industri yang beroperasi pada suhu tinggi sehingga enzim Cas9 pada umumnya tidak dapat digunakan dan diperlukan enzim Cas9 yang termotabil. Akan tetapi, belum banyak penelitian mengenai jenis enzim Cas9 termotabil. Oleh sebab itu, mengetahui adanya Cas9 pada isolat lokal *Geobacillus kaustophilus* TBUI01, dilakukan produksi enzim Cas9 dengan teknik rekombinan pada *Escherichia coli* BL21. Enzim Cas9 kemudian dipanaskan untuk menghilangkan semua protein mesofilik dari *Escherichia coli* BL21 pada suhu 50oC, 60oC, dan 70oC. Lalu dipurifikasi dengan teknik presipitasi amonium sulfat dengan variasi fraksinasi 20%, 50%, dan 80%. Sampai saat ini, belum ada penelitian enzim Cas9 tahan panas yang menggunakan presipitasi amonium sulfat sebagai satu-satunya teknik purifikasi. Teknik ini dilakukan karena ekonomis, cepat, dan juga mudah dilakukan. Hasil menunjukkan bahwa suhu pemanasan 60 oC adalah suhu yang optimal untuk mendegradasi protein mesofilik tanpa mendegradasi enzim Cas9. Presipitasi amonium sulfat optimal dilakukan pada fraksinasi 50% karena mampu mempresipitasi enzim Cas9. Akan tetapi, masih ada protein lain yang berhasil dipresipitasi sehingga presipitasi amonium sulfat dapat dijadikan sebagai langkah purifikasi awal untuk mengonsentrasikan protein.

.....The Cas9 enzyme is part of CRISPR-Cas9 which acts as an endonuclease to cut DNA/RNA in specific sequences. Cas9 is useful in the fields of health, food, and industry. However, many industries operate at high temperatures so that Cas9 enzymes generally cannot be used and a thermostable Cas9 enzyme is needed. Nevertheless, there has not been much research on the type of thermostable Cas9 enzyme.

Therefore, knowing the presence of Cas9 in the local isolate *Geobacillus kaustophilus* TBUI01, Cas9 enzyme production was carried out using recombinant techniques on *Escherichia coli* BL21. The Cas9 enzyme was then heated to remove all mesophilic protein from *Escherichia coli* BL21 at 50oC, 60oC and 70oC. Then it was purified by ammonium sulfate precipitation technique with 20%, 50% and 80% saturation. Until now, there has been no research on thermostable Cas9 using ammonium sulfate precipitation as the only purification technique. This technique is done because it is economical, fast, and easy to do. The result showed that a heating temperature of 60oC is the optimal temperature for degrading mesophilic proteins without degrading Cas9 enzymes. Optimal ammonium sulfate precipitation is carried out at 50% fractionation because it can precipitate the Cas9 enzyme. However, there are still other proteins that have been successfully precipitated so that the precipitation of ammonium sulfate can be used as an initial purification step to concentrate protein.