

Produksi Cas9 Rekombinan dari *Geobacillus kaustophilus* Strain TBUI01 pada *Escherichia coli* BL21 dengan Purifikasi Immobilized Metal Affinity Chromatography = Production of Recombinant Cas9 from *Geobacillus kaustophilus* Strain TBUI01 with *Escherichia coli* BL21 as Host Bacteria through Immobilized Metal Affinity Chromatography Purification

Felix Ferdinand, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920524750&lokasi=lokal>

Abstrak

Sistem CRISPR-Cas9 merupakan mekanisme perlindungan bakteri terhadap materi genetik asing yang diaplikasikan secara luas dalam rekayasa genetika. Kombinasi enzim Cas9 dengan gRNA pada CRISPR-Cas9 memungkinkan terjadinya pengeditan genom terhadap target yang spesifik. Meskipun demikian, Cas9 yang dikembangkan saat ini berasal dari bakteri mesofilik sehingga rentan terdegradasi dan tidak cocok untuk aplikasi pada temperatur tinggi. Di sisi lain, bakteri termofilik *Geobacillus kaustophilus* telah diisolasi dari mata air panas di Cisolong, Banten, dan diidentifikasi mengandung enzim Cas9. Untuk memperoleh enzim Cas9 yang tidak terdenaturasi pada temperatur tinggi (termostabil), dilakukan uji coba produksi Cas9 rekombinan dari *Geobacillus kaustophilus*. Gen Cas9 yang telah dikloning pada plasmid pET43.1a ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* BL21 dan dikultur dengan konsentrasi penambahan IPTG yang bervariasi—0,05 mM, 0,20 mM, dan 0,50 mM. Hasil kultur bakteri dipanaskan pada temperatur yang bervariasi (50 °C, 60 °C, dan 70 °C) untuk mendenaturasi enzim non-termofilik. Setelah itu, sampel dipurifikasi dengan immobilized Metal Affinity Chromatography untuk memperoleh enzim Cas9. Hasil uji Lowry menunjukkan sampel heated supernatant dengan konsentrasi IPTG 0,05 mM dan temperatur pemanasan 50 °C memiliki konsentrasi protein tertinggi dan hasil purifikasinya memiliki konsentrasi Cas9 sebesar 42,6 g/mL. Identifikasi protein dengan uji SDS-PAGE menunjukkan ukuran protein hasil purifikasi sebesar 52,61 kDa.

.....The CRISPR-Cas9 system is a bacterial defense mechanism against foreign genetic material that is broadly applied in genetic engineering. The combination of Cas9 enzyme and gRNA in CRISPR-Cas9 allows genome editing of specific targets. However, the currently developed Cas9 originated from mesophilic bacteria, making it susceptible to degradation and unsuitable for applications requiring elevated temperatures. On the other hand, the thermophilic bacterium, *Geobacillus kaustophilus*, was isolated from a hot spring in Cisolong, Banten, and identified as containing the Cas9 enzyme. To obtain undenatured Cas9 enzymes at high temperatures (thermostable), a production test of recombinant Cas9 from *Geobacillus kaustophilus* was carried out. The Cas9 gene cloned on the pET43.1a plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 and cultured under various IPTG addition concentrations—0.05 mM, 0.20 mM, and 0.50 mM. The bacterial cultures were heated at various temperatures (50 °C, 60 °C, and 70 °C) to denature unwanted non-thermophilic enzymes. Thereafter, the samples were purified using Immobilized Metal Affinity Chromatography to obtain Cas9 enzyme. Lowry protein assay results showed that the heated supernatant sample with 0.05 mM IPTG addition and 50 °C heating temperature has the highest protein concentration, and the purified sample yielded a Cas9 concentration of 42.6 g/mL. Protein identification with SDS-PAGE revealed a purified protein size of 52.61 kDa