

Studi Aktivitas Enzim Fusi YebF-dCas9 Rekombinan dari *Geobacillus kaustophilus* secara In Silico dan In Vitro = In Silico and In Vitro Activity Study of YebF-dCas9 Fusion Recombinant Enzyme from *Geobacillus kaustophilus*

Gio Nathaniel, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920545291&lokasi=lokal>

Abstrak

Sistem CRISPR yang semula merupakan mekanisme pertahanan bakteri dapat digunakan sebagai alat rekayasa genetika yang spesifik dan relatif modular, salah satunya adalah CRISPR-dCas9 yang memanfaatkan protein Cas9 dari *Streptococcus pyogenes* dengan mutasi D10A dan H840A untuk secara spesifik menempel pada sekuens DNA tertentu sehingga menginterferensi ekspresi gen tersebut. Untuk meningkatkan jangkauan aplikasi, diteliti suatu protein dCas9 yang tahan suhu tinggi atau termostabil dari bakteri termofilik *Geobacillus kaustophilus*, dengan rentang suhu operasi hingga 70 °C, serta ditambahkan protein YebF untuk meningkatkan sekresi ekstraseluler dCas9. Penelitian secara in silico dilakukan dengan Molecular Docking untuk melihat interaksi antara YebF-dCas9 dengan beberapa variasi panjang spacer, repeat, dan tracr sgRNA. Melalui analisis afinitas pengikatan, didapatkan konfigurasi sgRNA optimal adalah dengan panjang spacer 10 nukleotida, repeat 36 nukleotida, dan tracr 63 nukleotida. Uji in vitro dilakukan dengan menganalisis kemampuan YebF-dCas9 menempel pada sekuens gen -lactamase yang memberikan resistensi ampisilin pada bakteri. Gen penyusun YebF-dCas9 *Geobacillus kaustophilus* ditransformasikan ke dalam bakteri *E. coli* BL21 melalui plasmid rekombinan pET-15b termodifikasi. Hasil protein YebF-dCas9 didapatkan setelah bakteri dikultur dan purifikasi menggunakan Fast Protein Liquid Chromatography. Uji Lowry dilakukan untuk menentukan konsentrasi YebF-dCas9 dalam larutan, sedangkan uji SDS PAGE dilakukan untuk validasi hasil YebF-dCas9 yang diproduksi. Setelah ditransformasikan ke dalam bakteri, struktur YebF-dCas9-gRNA mampu menginhibisi resistensi ampisilin bakteri, menyebabkan menurunnya koloni bakteri yang hidup hingga 98,5%. Digunakan berbagai variasi medium untuk menganalisis pengaruh berbagai ion logam terhadap aktivitas, dengan variasi medium SOC, medium Buffer Taq Polymerase, dan medium air panas Cisolong. Medium transformasi optimal untuk aktivitas YebF-dCas9 adalah medium SOC dengan kadar ion magnesium 486,1 mg/L, kalium 97,74 mg/L, dan natrium 229,89 mg/L.

.....CRISPR system that originated from bacterial defense mechanism can be used as a specific and modular genetic engineering tool, one of which is the CRISPR-dCas9 that utilizes Cas9 protein from *Streptococcus pyogenes* with D10A and H840A mutation which specifically adheres to certain DNA sequence to interfere the gene expression. To broaden the application scope, a thermostable dCas9 in temperature as high as 70 °C from thermophilic bacteria *Geobacillus kaustophilus* is isolated, appended with YebF to improve extracellular secretion, and tested. The in silico experiment is done using Molecular Docking to analyze the interaction between YebF-dCas9 and sgRNA with varying spacer, repeat, and tracr length. Using binding affinity analysis, it is found that the optimal configuration for sgRNA to interact with YebF-dCas9 is with 10 nucleotides spacer, 36 nucleotides repeat, and 63 nucleotides tracr. For the in vitro experiment, the ability of YebF-dCas9 is tested, especially the ability to bind with the -lactamase gene sequence that allows bacteria to have ampicillin resistance. The YebF-dCas9 gene from *Geobacillus kaustophilus* is transformed into *E. coli* BL21 bacteria using modified recombinant plasmid pET-15b. Concentrated YebF-dCas9 enzyme is

produced after bacterial replication in a liquid culture and protein purification using Fast Protein Liquid Chromatography. Lowry test is performed to determine the YebF0dCas9 concentration, while the SDS PAGE test is performed to validate the produced YebF-dCas9. After transformation to the bacteria, the YebF-dCas9-gRNA structure has the ability to inhibit the ampicillin resistance in bacteria, exhibited by the decrease in living bacteria colony by up to 98,5%. Various medium are used to study the effect of various metal ions on the activity of YebF-dCas9, using three medium variations of SOC medium, Taq Polymerase Buffer medium, and Cisolong medium. The optimal transformation medium for YebF-dCas9 activity is the SOC medium with magnesium ion concentration of 486.1 mg/L, potassium ion concentration of 97.74 mg/L, and sodium ion concentration of 229.89 mg/L.