

Sintesis Cas9 dan dCas9 Termostabil Rekombinan pada Escherichia coli BL21 (DE3) dengan Metode Autoinduksi = Synthesis of Thermostable Recombinant Cas9 and dCas9 in Escherichia coli BL21 (DE3) Using the Autoinduction Method

Sabrina Nurfajriani Putri Hutomo, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920571521&lokasi=lokal>

Abstrak

Produksi enzim CRISPR-Cas9 dan dCas9 rekombinan di Indonesia saat ini masih bergantung pada metode induksi Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) konvensional yang memiliki keterbatasan biaya dan efisiensi. Metode autoinduksi belum pernah dieksplorasi untuk produksi kedua enzim ini, padahal berpotensi menjadi alternatif yang lebih ekonomis dan mendukung kemandirian teknologi bioteknologi lokal.

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efektivitas metode autoinduksi untuk produksi enzim Cas9 dan dCas9 rekombinan sebagai alternatif metode induksi IPTG konvensional. Produksi enzim dilakukan menggunakan Escherichia coli BL21 (DE3) dengan plasmid pET-15b pada medium autoinduksi IC (Imperial College) dan LB (Luria Bertani) autoinduksi. Ekspresi protein dianalisis menggunakan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) dan diukur dengan spektrofotometer pada berbagai waktu inkubasi. Pola pertumbuhan kultur menunjukkan ekspresi protein optimal terjadi saat transisi metabolisme dari glukosa ke laktosa pada akhir fase logaritmik, yaitu pada jam ke-6 menuju jam ke-9. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode autoinduksi berhasil mengekspresikan kedua enzim dengan kondisi optimal pada jam ke-9, dimana Cas9 mencapai konsentrasi 3,65 $\mu\text{g/mL}$ pada medium LB dan dCas9 mencapai 1,21 $\mu\text{g/mL}$ pada medium IC. Perbandingan dengan metode IPTG menunjukkan autoinduksi menghasilkan yield Cas9 yang lebih tinggi (3,65 vs 1,706 $\mu\text{g/mL}$) dengan hasil dCas9 yang cukup kompetitif (1,21 vs 1,558 $\mu\text{g/mL}$). Metode autoinduksi terbukti efektif sebagai alternatif ekonomis untuk produksi enzim CRISPR rekombinan tanpa memerlukan induktor eksternal.

.....The production of recombinant CRISPR-Cas9 and dCas9 enzymes in Indonesia currently relies on the conventional Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction method, which has limitations in terms of cost and efficiency. The autoinduction method has not been explored for the production of these two enzymes, even though it has the potential to be a more economical alternative and support the independence of local biotechnology. This study aims to evaluate the effectiveness of the autoinduction method for the production of recombinant Cas9 and dCas9 enzymes as an alternative to the conventional IPTG induction method. Enzyme production was carried out using Escherichia coli BL21 (DE3) with the pET-15b plasmid on autoinduction IC and LB media. Protein expression was analyzed using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and quantified with a spectrophotometer at various incubation times. The culture growth pattern showed that optimal protein expression occurred during the metabolic transition from glucose to lactose at the end of the logarithmic phase, from the 6th hour to the 9th hour. The results showed that the autoinduction method successfully expressed both enzymes with optimal conditions at the 9th hour, where Cas9 reached a concentration of 3.65 $\mu\text{g/mL}$ in LB medium and dCas9 reached 1.21 $\mu\text{g/mL}$ in IC medium. Comparison with the IPTG method showed that autoinduction resulted in a higher Cas9 yield (3.65 vs 1.706 $\mu\text{g/mL}$) with a fairly competitive dCas9 yield (1.21 vs 1.558 $\mu\text{g/mL}$). The autoinduction method proved to be effective as an economical alternative for the production of

recombinant CRISPR enzymes without the need for an external inductor.