

**OPTIMASI EKSPRESI ENZIM REKOMBINAN PFU DNA POLIMERASE
PADA SISTEM EKSPRESI *Escherichia coli* BL21 DENGAN
AGEN PENGINDUKSI ISOPROPIL- β -D-TIOGALAKTOPIRANOSIDA
(IPTG)**

Skripsi

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat Sarjana Kimia**



Arfena Rizqi Amalia

20106030060

**STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA**

2025

HALAMAN JUDUL

**OPTIMASI EKSPRESI ENZIM REKOMBINAN PFU DNA POLIMERASE
PADA SISTEM EKSPRESI *Escherichia coli* BL21 DENGAN
AGEN PENGINDUKSI ISOPROPIL- β -D-TIOGALAKTOPIRANOSIDA
(IPTG)**

Skripsi

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat Sarjana Kimia**

Oleh:

Arfena Rizqi Amalia

20106030060

Dosen Pembimbing:

Dr. rer. Medic. Esti Wahyu Widowati

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA**

2025

HALAMAN PENGESAHAN



**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN KALIJAGA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**

Jl. Marsda Adisucipto Telp. (0274) 540971 Fax. (0274) 519739 Yogyakarta 55281

PENGESAHAN TUGAS AKHIR

Nomor : B-242/Un.02/DST/PP.00.9/02/2025

Tugas Akhir dengan judul : Optimasi Ekspresi Enzim Rekombinan Pfu DNA Polimerase pada Sistem Ekspresi Escherichia coli BL21 dengan Agen Penginduksi Isopropil- β -D-Tiogalaktopiranosida (IPTG)

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Nama : ARFENA RIZQI AMALIA
Nomor Induk Mahasiswa : 20106030060
Telah diujikan pada : Kamis, 23 Januari 2025
Nilai ujian Tugas Akhir : A

dinyatakan telah diterima oleh Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta

TIM UJIAN TUGAS AKHIR



Ketua Sidang
Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M. Biotech
SIGNED

Valid ID: 679c25a02f609



Penguji I
Fina Amreta Laksma
SIGNED

Valid ID: 679c2f1f4b7d41



Penguji II
Anni Damayanti, H.Si., M.Mol.Bio.
SIGNED

Valid ID: 679996d47993d



Yogyakarta, 23 Januari 2025
UIN Sunan Kalijaga
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Prof. Dr. Dra. Hj. Khurul Wardati, M.Si.
SIGNED

Valid ID: 67a0597e9d80c

HALAMAN PERNYATAAN

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 15 Januari 2025



Arfena Rizqi A.
20106030060

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI



Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga



FM-UINSK-BM-05-04/R0

SURAT PERSETUJUAN SKRIPSI/TUGAS AKHIR

Hal : Persetujuan Skripsi/Tugas Akhir
Lamp : -

Kepada
Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
Di Yogyakarta

Assalamu 'alaikum wr. Wb.

Setelah membaca, meneliti, memberikan petunjuk dan mengoreksi serta mengadakan perbaikan seperlunya, maka kami selaku pembimbing berpendapat bahwa skripsi Saudara:

Nama : Arfena Rizqi Amalia
NIM : 20106030060
Judul skripsi : Optimasi Ekspresi Enzim Rekombinan Pfu DNA Polimerase pada Sistem Ekspresi *Escherichia coli* BL21 dengan Agen Penginduksi Isopropil- β -D-Tiogalaktopiranosida (IPTG)

sudah dapat diajukan kembali kepada Fakultas Program Studi Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Srata Satu dalam memperoleh gelar Sarjana Srata Satu bidang Kimia.

Dengan ini kami berharap agar skripsi/tugas akhir Saudara tersebut di atas dapat segera dimunaqasyahkan. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Wassalamu 'alaikum wr. Wb.

Yogyakarta, 6 Januari 2025
Pembimbing

Dr. rer. Medic. Esti Wahyu Widowati
NIP. 19760830 200312 2 001

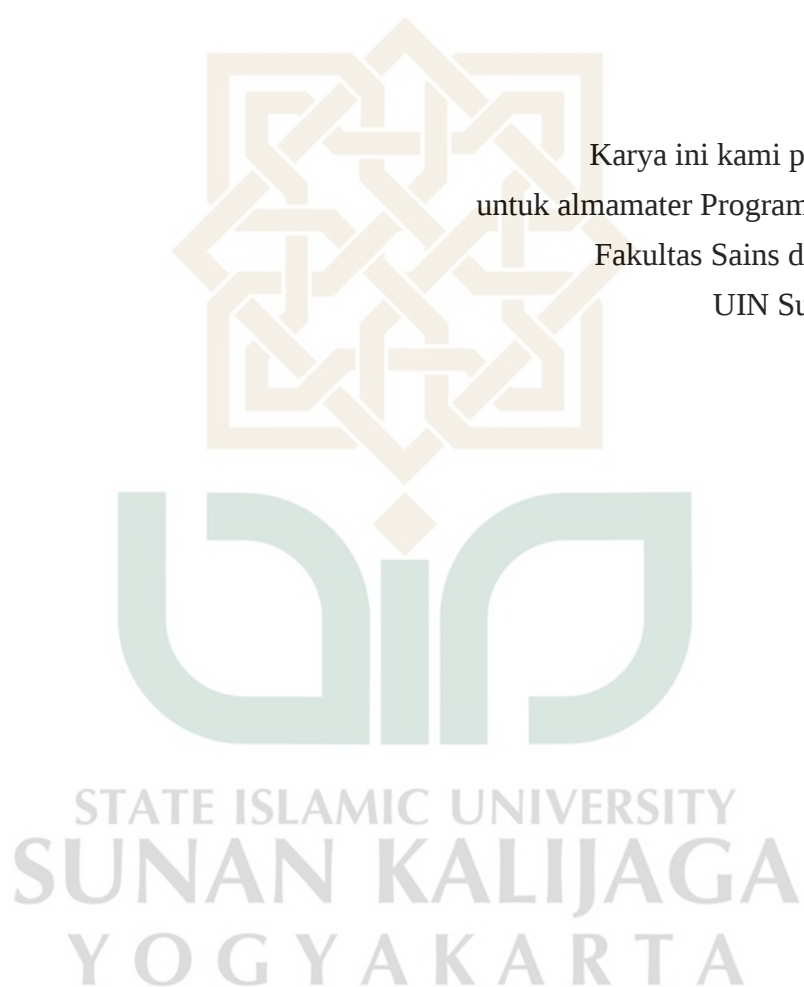
HALAMAN MOTTO

“Skripsi ini bukan akhir dari perjalanan, tetapi sebuah awal menuju ilmu yang lebih luas, tantangan yang lebih besar, dan mimpi yang lebih tinggi.”



HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini kami persembahkan
untuk almamater Program Studi Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Sunan Kalijaga



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT karena berkat rahmat, karunia, dan kehendak-Nya sehingga Laporan Tugas Akhir yang berjudul "*Optimasi Ekspresi Enzim Rekombinan Pfu DNA Polimerase pada Sistem Ekspresi Escherichia coli BL21 dengan Agen Penginduksi Isopropil-B-D-Tiogalaktopiranosida (IPTG)*" dapat diselesaikan dengan baik untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan studi pada Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Sunan Kalijaga.

Selanjutnya, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran dalam penyusunan tugas akhir ini, baik berupa dukungan moral maupun materi. Penulis meyakini bahwa tanpa bantuan dan dukungan tersebut, penyelesaian tugas akhir ini akan sulit dilakukan. Rasa terima kasih tersebut secara khusus ditujukan kepada :

1. Bapak Prof. Noorhaidi Hasan S.Ag., M.A., M.Phil. selaku Rektor UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
2. Ibu Prof. Dr. Dra. Hj. Khurul Wardati, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta
3. Ibu Prof. Dr. Maya Rahmayanti, S.Si. M.Si. selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
4. Ibu Atika Yahdiyani Ikhsani, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan motivasi dan pengarahan selama studi.
5. Ibu Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech. selaku Dosen Pembimbing Skripsi yang secara ikhlas dan sabar telah meluangkan waktunya untuk membimbing, mengarahkan, dan memotivasi penyusun dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
6. Ibu Fina Amreta Laksmi, Ph.D. selaku Pembimbing lapangan di Laboratorium Genomik BRIN yang telah meluangkan waktunya dan memberikan ilmunya untuk membimbing penelitian di laboratorium.
7. Seluruh Dosen dan Staf Karyawan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.

8. Keluarga tercinta Bapak Subhan, Ibu Nur Alimah, dan saudara-saudara saya (Kak Ros, Faza benjot, dan Serin) yang senantiasa memberikan dukungan dan doa.
9. Teman-teman Kimia Angkatan 2020 UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta.
10. Teman-teman di Laboratorium Genomik BRIN, Kak Khairunnisa, Kak Mutia, Nida, Jihan, Lala, dan teman-teman semua di Laboratorium Genomik yang telah membantu kegiatan di Laboratorium.
11. Teman dekat saya, Muhammad Agus Saputra, yang telah memberikan banyak dukungan, baik secara psikologis maupun finansial.
12. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu atas bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Laporan Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan di masa mendatang.

Akhir kata, semoga Laporan Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan menjadi kontribusi kecil bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang biokimia dan bioteknologi.

Yogyakarta, 15 Januari 2025

STATE ISLAMIC UNIVERSITY
SUNAN KALIJAGA
YOGYAKARTA



Arfena Rizqi Amalia
20106030060

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	II
HALAMAN PENGESAHAN	III
HALAMAN PERNYATAAN	IV
HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI.....	V
HALAMAN MOTTO	VI
HALAMAN PERSEMBAHAN	VII
KATA PENGANTAR	VIII
DAFTAR ISI.....	X
DAFTAR GAMBAR.....	XII
ABSTRAK.....	XIII
ABSTRACT	XIV
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Batasan Masalah.....	3
C. Rumusan Masalah	4
D. Tujuan Penelitian	4
E. Manfaat Penelitian	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI	 6
A. Tinjauan Pustaka	6
B. Landasan Teori.....	9
1. Enzim Pfu DNA polimerase	9
2. Sistem ekspresi gen pada mikroorganisme prokariotik	10
3. Bakteri <i>Escherchia coli</i> Strain	12
4. Isopropil- β -D-Tiogalaktopiranosida (IPTG).....	13
5. Vektor ekspresi plasmid pD-451SR.....	17
6. Analisis Berat Molekul Protein Enzim Pfu DNA Polimerase dengan metode <i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis</i> (SDS-PAGE) ...	19
C. Kerangka Berfikir dan Hipotesis Penelitian.....	21
 BAB III METODE PENELITIAN	 23
A. Waktu dan Tempat Penelitian	23
B. Alat-alat Penelitian.....	23
C. Bahan-bahan Penelitian.....	23
D. Prosedur Kerja Penelitian.....	24
1. Proses pembuatan media	24
2. Proses pertumbuhan bakteri	24
3. Optimalisasi induksi IPTG	25
4. Analisis hasil ekspresi enzim rekombinan Pfu polimeras.....	27
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 30
A. Pertumbuhan Bakteri <i>E. coli</i> BL21 star (DE3) pD451-SR yang membawa Gen dari <i>Pyrococcus furiosus</i>	30

B. Ekspresi Protein Rekombinan Pfu Polimerase.....	32
C. Optimasi Ekspresi Protein Rekombinan Pfu Polimerase.....	34
1. Optimasi ekspresi protein dengan memperhatikan konsentrasi IPTG	35
2. Optimasi ekspresi protein dengan memperhatikan waktu inkubasi induksi IPTG	39
3. Optimasi ekspresi protein dengan memperhatikan kepadatan sel sebelum induksi IPTG	42
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
A. Kesimpulan	47
B. Saran.....	47
 DAFTAR PUSTAKA	48

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sistem operon pada mikroorganisme prokariot (Nuryana, <i>et al.</i> , 2023)	11
Gambar 2.2 DNA Kromosom dan DNA Plasmid pada <i>E. Coli</i> (<i>Nasional Human Genome Research Institute</i> , 2025)	17
Gambar 2.3 Peta vektor plasmid PD451-SR	19
Gambar 2.4 Alat SDS-PAGE	21
Gambar 4.1 Hasil inokulasi bakteri <i>E. coli</i> BL21 star (DE3) PD451-SR yang mengandung gen Pfu polimerase	31
Gambar 4.2 Hasil pre-kultur <i>E. coli</i> BL21 star (DE3) PD451-SR yang mengandung gen Pfu polimerase. Media kultur sebelum diinkubasi (kiri), media kultur setelah diinkubasi (kanan)....	32
Gambar 4.3 SDS-PAGE hasil ekspresi protein rekombinan pfu polimerase. keterangan: (M) <i>Unstained Protein</i> MW Marker; (1) Induksi IPTG; (2) Tanpa induksi IPTG	33
Gambar 4.4 Mekanisme sistem lac operon dengan induksi IPTG (Kataoka dan Takasu, 2021)	34
Gambar 4.5 Mekanisme sistem operon lac tanpa induksi IPTG (Kataoka dan Takasu, 2021)	34
Gambar 4.6 Data histogram rata-rata konsentrasi Pfu polimerase (g/L) dan OD600 setelah induksi dari hasil optimalisasi konsentrasi IPTG	36
Gambar 4.7 Data histogram rata-rata konsentrasi Pfu polimerase (g/L) dan OD600 setelah induksi dari hasil optimalisasi kepadatan sel sebelum induksi.....	40
Gambar 4.8 Data histogram rata-rata konsentrasi Pfu polimerase (g/L) dan OD600 setelah induksi dari hasil optimalisasi kepadatan sel sebelum induksi.....	44

ABSTRAK

**OPTIMASI EKSPRESI ENZIM REKOMBINAN PFU DNA POLIMERASE
PADA SISTEM EKSPRESI *ESCHERICHIA COLI* BL21
DENGAN AGEN PENGINDUKSI ISOPROPIL- β -D-
TIOGALAKTOPIRANOSIDA (IPTG)**

Oleh:

Arfena Rizqi Amalia
20106030060

Dosen Pembimbing:

Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech.

Pfu polimerase merupakan enzim DNA Polimerase yang berasal dari *Pyrococcus furiosus*. Enzim ini memiliki tingkat fidelitas yang tinggi, sehingga sangat ideal untuk digunakan dalam proses PCR yang membutuhkan hasil dengan ketelitian tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimal IPTG yang dapat menghasilkan ekspresi protein rekombinan Pfu polimerase secara maksimal pada sistem ekspresi *Escherichia coli* BL21 star (DE3) dengan menggunakan plasmid pD451-SR.

Optimasi ekspresi Pfu polimerase diawali dengan optimasi konsentrasi IPTG dilanjutkan dengan optimasi waktu induksi dan kepadatan sel sebelum induksi. Variasi konsentrasi IPTG yang digunakan adalah 0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM; dan 1,6 mM. Variasi waktu induksi yang digunakan adalah 0 jam; 6 jam; 12 jam; dan 24 jam. Sedangkan, variasi kepadatan sel sebelum induksi yang digunakan adalah OD 0,4; OD 0,6; OD 0,8; dan OD 1,0.

Pengujian optimasi ekspresi enzim Pfu polimerase didasarkan pada hasil analisis menggunakan SDS-PAGE. Tebal pita yang terlihat pada gel SDS-PAGE menggambarkan konsentrasi protein rekombinan, di mana pita yang lebih tebal menunjukkan konsentrasi protein yang lebih tinggi. Hasil visualisasi pita kemudian dianalisis menggunakan *Gel Analyzer* untuk menentukan konsentrasi IPTG yang memberikan ekspresi protein paling tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Pfu polimerase berhasil diekspresikan secara optimal dengan menggunakan konsentrasi IPTG 0,4 mM, waktu induksi selama 12 jam dan kepadatan sel sebelum induksi pada OD 0,4 dengan nilai rata-rata konsentrasi protein *yield* yang diperoleh sebesar 0,1323 g/L.

Kata Kunci: Ekspresi gen, *E. coli*, Pfu DNA polimerase, IPTG

ABSTRACT**OPTIMIZATION OF RECOMBINANT ENZYME EXPRESSION PFU
DNA POLYMERASE IN *ESCHERICHIA COLI* EXPRESSION SYSTEM
USING ISOPROPYL- β -D-THIOGALACTOPYRANOSIDE (IPTG)
INDUCER AGENT****By:****Arfena Rizqi Amalia****20106030060****Advisor:****Dr. rer. medic. Esti Wahyu Widowati, M.Si., M.Biotech.**

Pfu polymerase is a DNA polymerase enzyme derived from *Pyrococcus furiosus*. This enzyme has a high fidelity rate, making it ideal for use in PCR processes that require high accuracy. This study aimed to determine the optimal IPTG conditions for maximizing recombinant Pfu polymerase protein expression in the *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) expression system using the pD451-SR plasmid.

Optimization of Pfu polymerase expression began with optimizing IPTG concentration, followed by optimizing induction time and cell density prior to induction. The IPTG concentrations used were 0,1 mM; 0,2 mM; 0,4 mM; 0,8 mM; and 1,6 mM. The induction times tested were 0 hours; 6 hours; 12 hours; and 24 hours. Meanwhile, the cell density variations before induction were OD 0,4; OD 0,6; OD 0,8; and OD 1,0.

The optimization of Pfu polymerase enzyme expression was evaluated based on SDS-PAGE analysis. The thickness of the bands observed on the SDS-PAGE gel reflected the concentration of recombinant protein, with thicker bands indicating higher protein concentrations. The visualized bands were then analyzed using Gel Analyzer software to determine the IPTG concentration that resulted in the highest protein expression. The results showed that Pfu polymerase was successfully expressed optimally using 0.4 mM IPTG, an induction time of 12 hours, and a cell density before induction of OD 0.4, with an average protein yield concentration of 0.1323 g/L.

Keywords: Gene expression, *E. coli*, Pfu DNA polymerase, IPTG

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) merupakan salah satu inovasi bioteknologi yang banyak digunakan dalam riset biologi molekuler untuk menggandakan fragmen DNA secara eksponensial menjadi ribuan hingga jutaan salinan (Kusnadi, *et al.*, 2022). Metode ini sangat efektif untuk analisis genetik dan memiliki beragam aplikasi, termasuk di bidang medis, forensik, serta pertanian. Misalnya, Purwanita dan Natsir (2021) memanfaatkan PCR untuk mendeteksi virus hepatitis C, sementara Kusumah, *et al.* (2022) menggunakannya untuk mengidentifikasi *Nucleopolyhedrovirus* pada larva *Helicoverpa armigera* di tanaman jagung yang dapat mendukung petani dalam pengendalian patogen yang lebih efisien.

Prinsip kerja dari teknik PCR membutuhkan beberapa komponen utama, di antaranya, yakni primer, dNTP (nukleotida), dH₂O, buffer PCR, DNA template, dan enzim DNA Polimerase (Puspitaningrum, *et al.*, 2018). Enzim DNA Polimerase pada teknik PCR berfungsi untuk mensintesis DNA dari arah 5' (ujung 5'-fosfat) ke arah 3' (ujung 3'-OH). Ketika enzim DNA Polimerase membaca untai templat DNA, enzim tersebut akan menambahkan dNTP yang sesuai untuk ditambahkan ke ujung 3'-OH dari rantai DNA yang sedang tumbuh (Elnifro, *et al.*, 2000).

Taq polimerase adalah enzim yang sering digunakan dalam PCR karena kemampuannya memperpanjang rantai DNA secara cepat pada suhu tinggi (sekitar

72°C). Namun, enzim ini memiliki fidelitas rendah karena tidak memiliki aktivitas *proof-reading*, sehingga tidak dapat memperbaiki kesalahan selama sintesis DNA. Dalam penelitian yang memerlukan hasil PCR dengan akurasi tinggi, seperti kloning DNA, sekuensing, atau ekspresi gen, penggunaan enzim dengan fidelitas tinggi sangat penting. Salah satu alternatif enzim DNA polimerase yang sering digunakan adalah Pfu polimerase, yang memiliki aktivitas *proof-reading* yang jauh lebih baik daripada Taq polimerase (Sunarno, 2015).

Pfu polimerase merupakan enzim yang memiliki aktivitas *proof-reading* tinggi yang disebabkan oleh adanya aktivitas 3'→5' eksonuklease, memungkinkan enzim untuk menghilangkan nukleotida yang salah dimasukkan dan menggantinya dengan yang benar (Cline, *et al.*, 1996). Selain itu, Pfu juga memiliki tingkat kesalahan yang lebih rendah dibandingkan dengan enzim DNA polimerase lainnya yang juga memiliki kemampuan *proof-reading*, seperti Vent, Deep Vent, Pwo, dan UITma. Tingkat kesalahan Pfu bahkan dapat 2 hingga 30 kali lebih rendah dibandingkan dengan enzim-enzim *proof-reading* lainnya (Lu dan Erickson, 1997).

Kelompok Riset Enzim Ekstremofil dari Pusat Riset Mikrobiologi Terapan Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) telah berhasil mengembangkan enzim rekombinan Pfu polimerase dengan cara optimalisasi ekspresi kodon menggunakan inducer IPTG diperoleh protein murni Pfu polimerase dengan konsentrasi sebesar 26,8 mg/L (Nuryana, *et al.*, 2023). Meskipun demikian, masih terdapat aspek lain yang memerlukan optimasi lebih lanjut, seperti penggunaan IPTG sebagai inducer. Optimasi lebih lanjut diperlukan karena penggunaan IPTG sebagai inducer

memiliki beberapa kekurangan, seperti biaya yang relatif tinggi dan potensi toksisitas terhadap sel inang yang dapat memengaruhi efisiensi produksi enzim.

Optimalisasi penggunaan IPTG sebagai induser ekspresi gen memiliki peran penting dalam produksi protein skala besar. Penggunaan IPTG yang tidak tepat dapat menurunkan produksi protein. Konsentrasi yang terlalu tinggi menyebabkan toksisitas dan stres, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah menghambat induksi sel. Waktu induksi juga berpengaruh, dimana waktu induksi yang terlalu singkat atau lama dapat mengurangi hasil ekspresi gen. Induksi optimal biasanya dilakukan pada OD₆₀₀ 0,4-0,6, yakni saat *E. coli* berada di fase eksponensial, sehingga memungkinkan ekspresi tanpa stres berlebih (Tamerler, *et al.*, 1998; Briand, *et al.*, 2016). Optimalisasi penggunaan IPTG sebagai agen penginduksi atau induser untuk ekspresi protein rekombinan Pfu polimerase akan sangat membantu dalam meningkatkan efisiensi waktu dan biaya produksi protein dalam skala besar.

Penelitian ini akan mengeksplorasi pengaruh konsentrasi IPTG, waktu induksi, dan kepadatan sel (OD₆₀₀) terhadap produksi protein rekombinan Pfu polimerase. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi landasan penting dalam pengembangan produksi protein rekombinan Pfu polimerase yang efisien, ekonomis, dan berkualitas tinggi, yang sangat diperlukan untuk aplikasi penelitian dan industri.

B. Batasan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah maka batasan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Mikroorganisme yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil kloning dari bakteri *Pyrococcus furiosus* yang diekspresikan pada sistem ekspresi bakteri *E. coli* BL21 star (DE3) dan diproduksi oleh Pusat Riset Mikrobiologi Terapa BRIN.
2. Optimasi dilakukan untuk penggunaan Isopropil- β -D-tiogalaktopiranosida (IPTG) sebagai induser dalam ekspresi protein rekombinan Pfu polimerase pada skala laboratorium, meliputi tiga parameter: konsentrasi IPTG, waktu induksi, dan kepadatan sel sebelum induksi.
3. Analisis hasil penelitian ini hanya akan menilai keberhasilan optimasi berdasarkan *yield* protein rekombinan yang dihasilkan.

C. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang dan batasan masalah yang telah diuraikan maka rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut: Bagaimana konsentrasi IPTG, waktu induksi dan kepadatan sel sebelum induksi yang optimum dalam produksi enzim rekombinan Pfu polimerase?

D. Tujuan Penelitian

Tujuan dari rumusan masalah tersebut adalah untuk mengetahui konsentrasi IPTG, waktu induksi dan kepadatan sel sebelum induksi yang optimum dalam produksi enzim rekombinan Pfu polimerase.

E. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimal produksi protein rekombinan Pfu polimerase yang menggunakan IPTG sebagai inducer, dengan memvariasikan parameter konsentrasi IPTG, waktu induksi, dan

OD600 sebelum induksi. Hasil dari penelitian ini penting sebagai landasan untuk produksi protein Pfu dalam skala yang lebih besar, serta bagi industri dalam mengembangkan produksi protein rekombinan Pfu polimerase secara lebih efisien dan optimal.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa konsentrasi IPTG sebesar 0,4 mM, waktu induksi selama 12 jam, dan kepadatan sel sebelum induksi pada OD 0,4 adalah kondisi optimal untuk produksi enzim rekombinan Pfu polimerase menggunakan sel inang *E. coli* BL21 star (DE3) dan plasmid pD451-SR sebagai vektor ekspresi.

B. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti menyarankan agar eksplorasi waktu induksi dilakukan dengan durasi lebih singkat, seperti 1 atau 2 jam. Penelitian lanjutan hingga tahap pemurnian enzim juga diperlukan untuk mengetahui konsentrasi murni enzim Pfu polimerase yang dihasilkan. Selain mengevaluasi kuantitas ekspresi, penting juga menilai kualitas enzim, misalnya dengan mengukur aktivitasnya menggunakan RT-PCR. Langkah ini dapat membantu menentukan apakah optimasi memengaruhi tidak hanya jumlah protein, tetapi juga kemurnian dan fungsionalitas enzim.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustriana, E., Nuryana, I., Laksmi, F. A., Dewi, K. S., Wijaya, H., Rahmani, N., Yudiargo, D. R., Ismadara, A., Helbert, Hadi, M. I., Purnawan, A., dan Djohan, A. C. 2022. Optimized expression of large fragment DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* in *E. coli* expression system. *Preparative Biochemistry dan Biotechnology*, 53(4), 384–393. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2095573>
- Amersham Bioscience. 2002. *GST gene fusion system handbook*. 110 hlm. <http://www.amershambioscience.com>. 22 Maret 2011, pk. 20.15 WIB.
- Bren, A., Park, J. O., Towbin, B. D., Dekel, E., Rabinowitz, J. D., dan Alon, U. 2016. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific reports*, 6, 24834. <https://doi.org/10.1038/srep24834>
- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J., Artur, Y., Garrido, C., Seigneure, R., dan Neiers, F. 2016. *A self-inducible heterologous protein expression system in E. coli*. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep33037>
- Brock, T. D., M. T. Madigan, J. M. Martinko dan J. Parker. 1994. *Biology of microorganisms. 7th ed*. Prentice-hall, Inc., New Jersey: xvii + 909 hlm.
- Brown, T.A. 1991. *Genome*. BIOS Scientific Publisher Ltd., Oxford: xxviii + 472 hlm.
- Ceylan, H.K. 2023. Enhanced Biomass Production of Recombinant Pfu DNA Polymerase Producer *E. coli* BL21(DE3) by Optimization of Induction Variables Using Response Surface Methodology. *Protein J* 42, 451–462. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10122-8>
- Daber, R., Stayrook, S., Rosenberg, A., dan Lewis, M. 2007. *Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors*. *Journal of Molecular Biology*. 370(4), 609-619
- Dabrowski S, Kur J. 1998. Cloning and expression in *E. coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein Expr Purif* 14:131–138
- Davis, L. G., W. M. Kuehl, dan J. F. Battey. 1994. *Basic methods in molecular biology. 2nd ed*. Appleton n Lange, Connecticut: xii + 777 hlm.
- Fairbanks, D. J. dan W. R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. Brooks/Cole Publishing Company, Toronto: xix + 820 hlm.

- Farooqui, A. K., Ahmad, H., Rehmani, M. U., dan Husain, A. 2023. *Quick and easy method for extraction and purification of Pfu-Sso7d, a high processivity DNA polymerase*. Protein Expression and Purification Journal , 208–209, 106276. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106276>
- Gallagher, S. R. 1995. *One-dimensional SDS gel electrophoresis protein*. Dalam: Coligan, J.E., B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher dan P. T. Wingfield (eds). 2003. *Current protocols in protein science*. John Willey dan Sons, Inc., Washington: 10.1.1-10.1.34.
- Gomes, L. C., Monteiro, G. A., dan Mergulhão, F. 2020. *The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by E. coli Biofilms*. International Journal of Molecular Sciences, 21(2), 576. <https://doi.org/10.3390/ijms21020576>
- Hiraga, S. 2000. Dynamic Localization Of Bacterial And Plasmid Chromosomes. www.annualreviews.org
- Hu, JH., Wang, F. dan Liu, CZ. 2014. Development of an efficient process intensification strategy for enhancing Pfu DNA polymerase production in recombinant E. coli . Bioprocess Biosyst Eng 38, 651–659. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1304-4>
- Indradewai, Riski., Saksono, Budi., Damayanti, Sri. 2022. *Teknik Desain Primer Untuk Amplifikasi Gen Tujuan Kloning Dari Dna Agrobacterium Tumefaciens*. Perbal: Jurnal Pertanian Berkelanjutan. 10(3), 305-309.
- Kar S, Ellington AD. Construction of synthetic T7 RNA polymerase expression systems. Methods. 2018 Jul 1;143:110-120. doi:10.1016/j.ymeth.2018.02.022. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29518499.
- Kataoka, K., dan Takasu, A. 2021. IPTG-independent autoinduction of extracellular matrix proteins using recombinant E. coli as the expression host. *Polymer Journal*, 53(2), 385–391. <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00411-9>
- Kim, S. W., Kim, D. U., Kim, J. K., Kang, L. W., dan Cho, H. S. 2008. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *International journal of biological macromolecules*, 42(4), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2008.01.010>
- Koma, Daisuke, Takahiro Kishida, Hayato Yamanaka, Kunihiro Moriyosi, Eiji Nagamori, Takashi Ohmoto. 2018. *E. coli* chromosome-based T7- dependent constitutive overexpression system and its application to generating a phenylalanine producing strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 126, Issue 5, November 2018, Pages 586-595. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.05.014>.

- Kusnadi, J., dan Arumingtyas, E. L. (2020). Polymerase chain Reaction (PCR): Teknik dan Fungsi. Universitas Brawijaya Press.
- LaVallie, E. R. 1995. Production of recombinant proteins in *E. coli*. Dalam: Coligan, J.E., B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher dan P. T. Wingfield (eds). 2003. Current protocols in protein science. John Wiley dan Sons, Inc., Washington: 5.1.1 - 5.1.8.
- Lee, S.K. dan Keasling, J.D. 2008. Heterologous protein production in *E. coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. Protein Expression and Purification. 61(2), 197-203.
- Lu, Chunlin., Erickson, H.P. 1997. Expression in *E. coli* of the Thermostable DNA Polymerase from *Pyrococcus furiosus*. Protein Expression And Purification Journal. 11, 179-184.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap dan D.P. Clark. 2009. Brock: Biology of microorganisms. Pearson Benjamin Cummings publishing Inc., San Francisco: xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + I-36 hlm.
- Mahboob, A., Fatma, N., dan Husain, A. 2024. In-house extraction and purification of PFU-SSO7D, a high-processivity DNA polymerase. Bio-protocol, 14(1342). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.4967>
- Maksum, Iman., Sriwidodo., Yosua. 2019. Strategi peningkatan ekspresi protein rekombinan secara intraselular pada inang *E. coli*. Alqaprint Jatinangor.
- Margawati, E. T., Fuad, A. M., Indriawati, Ridwan, M., dan Volkandari, S. D. 2017. Optimization of expression JTAT protein with emphasis on transformation efficiency and IPTG concentration. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 515–519. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.009>
- Matsukawa, H., Yamagami, T., Kawarabayasi, Y., Miyashita, Y., Takahashi, M., dan Ishino, Y. 2009. A useful strategy to construct DNA polymerases with different properties by using genetic resources from environmental DNA. *Genes dan Genetic Systems*, 84(1), 3–13. <https://doi.org/10.1266/ggs.84.3>
- Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. 2022. Estimating microbial population data from optical density. PLoS ONE, 17(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>
- Muharsini, S. 2005. Strategi pengembangan vaksin Myiasis yang disebabkan oleh larva lalat *Chrysomya bezziana* (The old world screwworm fly). *Wartazoa* 15 (2): 102-110.

- Nasional Human Genome Research Institute (2025). Genetics Glossary : Plasmid. Retrieved January 28, 2025, from <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid>
- Nick. 2007. Choosing a competent *E. coli strain*. 24 September 2007: 14 hlm. <http://bitesizebio.com/2007/09/24/choosing-a-competent-ecoli-strain>. 10 Februari 2011, pk. 10.09 WIB.
- Noviendri, D. (2007). Teknologi DNA Rekombinan dan Aplikasinya dalam Eksplorasi Mikroba Laut. Squalen. 2(2).
- Nugroho, Kristianto., Terryana, Resenstradika T., Reflinur., Lestari, Puji (2019) *Metode Ekstraksi DNA Tanaman Tanpa Presipitasi Etanol Untuk Kegiatan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia. 6(1), 29-39.
- Nuryana, I., Laksmi, F. A., Dewi, K. S., Akbar, F., Nurhayati, N., dan Harmoko, R. (2023). Codon optimization of a gene encoding DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus* and its expression in *E. coli*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology /Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 21(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00605-7>
- Oktapan, L. P., Maulani, A. A., Ermawati, N., dan Sugiharto, B. (2023). Construction and expression of Wee1 recombinant protein in *E. coli strain* BL21 (DE3). Jurnal Ilmu Dasar, 24(2), 151. <https://doi.org/10.19184/jid.v24i2.28232>
- Permana, Iman., et. al. (2017) Teknik Biologi Molekuler. Alqaprint Jatinangor.
- Potapov, V., dan Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by Single-Molecule sequencing. PloS One, 12(1), e0169774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169774>
- Prazeres, D. M. F., & Monteiro, G. A. 2014. Plasmid Biopharmaceuticals. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0022-2014>
- Puspitaningrum, Rini., Adhiyanto, Crhis., Solihin (2018) Genetika Molekuler dan Aplikasinya. Deepublish.
- Rohmatike, A.N., Taufik, Intan., Pratama, Fenryco (2023) Pengembangan Kita Molekuler Pfu DNA Polimerase dan Protein Aksesori P45 Untuk Proses PCR. Undergraduate Thesis, ITB, Bandung.
- Seidman, L.A. dan C.J. Moore. 2000. Basic laboratory for biotechnology: textbook and laboratory reference. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: 751 hlm.

- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., dan D'Ari, R. (2007). *E. coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Shuler, M. L., dan Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall. <https://books.google.co.id/books?id=0VHtngEACAAJ>
- Studier, F. W., dan Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130
- Sunarno, M., MKes, D. N. E. P. D. dan. E., MBIomed, K. S. S., dan MSi, D. H. P. (2015). Pengembangan Metode Diagnostik Cepat Laboratorium untuk Identifikasi Penyebab Difteri: Aplikasi PCR Multipleks untuk Identifikasi Cepat Penyebab Difteri. Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
- Tabor, Stanley, Charles C. Richardson. 1985. A Bacteriophage T7 RNA Polymerase/Promotor System for Controlled Exclusive Expression of Specific Genes. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 82, pp. 1074-1078, February 1985. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1074>.
- Tamerler, C. Y., Önsan, Z. İ., dan Kırdar, B. (1998). Optimization of Starting Time and Period of Induction and *Inducer* Concentration in the Production of the Restriction Enzyme EcoRI from Recombinant *E. coli* 294. *Turkish Journal of Chemistry*, 22(3), 221–226. <https://journals.tubitak.gov.tr/chem/issues/kim-98-22-3/kim-22-3-5-96084.pdf>
- Terol, G. L., Gallego-Jara, J., Martínez, R. a. S., Vivancos, A. M., Díaz, M. C., dan De Diego, T. (2021). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *E. coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Wolfe, S. L. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth Publishing Company, California: xviii + 1145 hlm.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi molekuler*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Zhao, M., Tao, X. Y., Wang, F. Q., Ren, Y. H., dan Wei, D. Z. (2018). Establishment of a low-dosage-IPTG inducible expression system construction method in *E. coli*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(9), 806–810. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800160>
- Zheng, W., Wang, Q., dan Bi, Q. (2016). Construction, Expression, and Characterization of Recombinant Pfu DNA Polymerase in *E. coli*. *the Protein Journal*, 35(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9651-4>