

## Pengaruh Suhu pada Ekspresi Pretrombin-2 Manusia Rekombinan di *Escherichia coli* ER2566

Saronom Silaban<sup>1</sup>, Murniaty Simorangkir<sup>1</sup>, Iman Permana Maksum<sup>2</sup>,  
Toto Subroto<sup>2</sup>, dan Khomaini Hasan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Medan, Medan, Indonesia, 20221

<sup>2</sup>Jurusan Kimia, Universitas Padjadjaran, Jatinangor, Indonesia, 45363

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi, Indonesia, 40531

e-mail: [saronomsilaban@unimed.ac.id](mailto:saronomsilaban@unimed.ac.id)

**Abstract** Human recombinant prethrombin-2 (rhPT-2) was expressed in *Escherichia coli*. Previous studies reported that the expression of rhPT-2 in *E. coli* tends to form inclusion body. This study aims to determine the effect of temperature on the expression of rhPT-2 in *E. coli* ER2566. This study begins with the isolation of recombinant plasmids, competent cell preparation and transformation of competent cells of *E. coli* ER2566 strain, and rhPT-2 gene expression with various induction temperatures 12, 18, 22 and 30°C. Characterization results showed that the induction temperature of 22°C was the optimum temperature of rhPT-2 gene expression as a soluble fraction in *E. coli* ER2566 with IPTG concentration 0.1 mM. These results prove that the temperature affects the expression of rhPT-2 in *E. coli* ER2566. [EFFECT OF TEMPERATURE ON RECOMBINANT HUMAN PRETROMBIN-2 EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* ER2566] (*J. Sains Indon.*, 42(2): 25-30, 2018)

**Kata kunci:**  
Induction  
Temperature,  
Soluble Fraction,  
Prethrombin-2,  
*E. coli* ER2566

### Pendahuluan

Pretrombin-2 (PT-2) merupakan prekursor rantai tunggal terkecil dari  $\alpha$ -trombin yang terhubung dalam protrombin pada residu Thr272 hingga Glu579 dan terbentuk melalui penghilangan domain Gla dan dua domain *Kringle* dari protrombin (Mann, 2011). PT-2 dapat dikonversi menjadi trombin oleh aktivator enzim FXa (Heldebrant et al., 1973; Owen et al., 1974) atau dengan ekarin, yaitu metaloprotease dalam racun ular spesies *Echis carinatus* (So et al., 1992; DiBella et al., 1995; Jonebring et al., 2012; Yonemura et al., 2004; Subroto et al., 2016). PT-2 yang telah dikonversi menjadi trombin dapat aplikasikan dalam lem fibrin sebagai pengganti teknik jahitan pasca bedah mata (Enus dkk., 2011).

*E. coli* telah digunakan secara ekstensif sebagai inang untuk ekspresi protein rekombinan. Penggunaan *E. coli* sebagai sistem ekspresi dipilih karena mempunyai tingkat ekspresi yang tinggi,

media pertumbuhannya murah, serta mudah dilakukan peningkatan skala produksi untuk industri karena mampu tumbuh mencapai densitas sel yang tinggi (Baneyx & Mujacic, 2004; Sorensen & Mortensen, 2005; Cabrita et al., 2006; Demain & Vaishnav, 2009; Tripathi et al., 2009). Namun bagaimanapun, penggunaan sistem ini untuk produksi protein yang berasal dari genom eukariot yang membutuhkan modifikasi pasca-translasi menimbulkan masalah, karena mikroorganisme yang sederhana ini tidak memiliki mesin intraselular untuk melakukan modifikasi pasca-translasi. Sehingga, ekspresi protein rekombinan dalam *E. coli* sangat tergantung pada struktur primer, sekunder, tersier dan fungsi karakteristik dari protein tersebut (Daly & Hearn, 2004).

PT-2 telah diekspresikan di *E. coli* (Choi et al., 1989; So et al., 1992; DiBella et al., 1995; Soejima et al., 2001; Silaban et al., 2015; Rizkia et al., 2015; Silaban dkk., 2016; Silaban et al., 2016), tetapi hanya

sedikit yang aktif (Choi et al., 1989; So et al., 1992; DiBella et al., 1995; Soejima et al., 2001; Silaban et al., 2015). Sering muncul kendala, dimana trombin sebagai protein yang mudah larut menjadi tidak larut, karena pembentukan badan inklusi, sehingga harus dilarutkan dan dilipat ulang. (Choi et al., 1989; So et al., 1992; DiBella et al., 1995; Soejima et al., 2001; Silaban et al., 2015; Rizkia et al., 2015). Pembentukan badan inklusi pada ekspresi protein rekombinan dalam *E. coli*, dapat diminimumkan dengan cara mengurangi suhu dan laju ekspresi selama proses produksi (Freydell et al., 2007; Hartinger et al., 2010).

## Bahan dan Metode

**Strain bakteri, plasmid dan media kultur.** *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, USA) digunakan untuk kloning dan pemeliharaan plasmid. *E. coli* ER2566 (New England Biolabs) digunakan sebagai inang ekspresi protein. Plasmid yang digunakan untuk ekspresi adalah pTWIN1 (New England Biolabs). Bakteri ini ditumbuhkan pada suhu 37°C dalam media Luria Bertani (LB), terdiri dari ekstrak ragi 0,5% (w/v), tripton 1% (w/v), dan NaCl 1% (w/v) yang mengandung ampisilin 100 µg ml<sup>-1</sup>, dengan kecepatan kocok 150 rpm. Media LB dengan penambahan 2% agar digunakan sebagai media padat. Ekspresi protein diinduksi oleh Isopropil β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pada konsentrasi akhir 0,1 mM dikultur pada suhu 12, 18, 22 and 30°C (Sambrook & Russell, 2001).

**Isolasi plasmid rekombinan dan karakterisasi.** Gen target PT-2 sebelumnya telah dikloning dalam vektor ekspresi pTWIN1 menggunakan sel *E. coli* TOP10F'. Beberapa koloni transforman dikultur dalam medium cair LB 5 mL yang mengandung ampisilin 5 µg/mL dan diinkubasi pada inkubator 37°C selama 18 jam dengan kecepatan kocok 150 rpm. Selanjutnya dipanen dan diisolasi menggunakan kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche). Plasmid rekombinan yang diperoleh dikarakterisasi dengan dua enzim restriksi untuk mengkonfirmasi bahwa plasmid rekombinan telah membawa DNA sisipan yang benar, dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%.

**Transformasi inang ekspresi menggunakan plasmid pTWIN1-PT-2.** Plasmid pTWIN1-PT-2 terlebih dahulu diisolasi dari *E. coli* TOP10F', selanjutnya digunakan untuk mentransformasi inang ekspresi yang telah kompeten. *E. coli* ER2566 disiapkan menjadi sel yang kompeten untuk transformasi. Sejumlah 5 µL pTWIN1-PT-2 masing-masing ditambahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi yang berisi 50 µL sel kompeten, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 4°C, kemudian dilakukan kejutan panas pada suhu 42°C selama 90 detik. Kemudian segera didinginkan di dalam es selama 2 menit. Campuran ini kemudian ditambahkan 900 µL media LB cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam dengan laju pengocokan 150 rpm. Kemudian disentrifugasi pada 12000 rpm selama 30 detik. Sebanyak 850 µL supernatan dibuang, sisanya sebanyak 150 µL dari campuran ini ditumbuhkan pada media LB padat yang telah mengandung ampisilin 100 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam (Sambrook & Russell, 2001).

Transforman *E. coli* yang tumbuh merupakan *E. coli* yang sudah membawa plasmid rekombinan karena sudah berubah menjadi resistan ampisilin. Untuk memastikan bahwa *E. coli* transforman telah membawa plasmid rekombinan yang benar, maka dilakukan analisis melalui isolasi plasmid rekombinan dari transforman *E. coli*, analisis restriksi dan penentuan urutan nukleotida *pretrombin-2* dalam plasmid rekombinan.

**Ekspresi gen PT-2.** Uji pendahuluan ekspresi fragmen PT-2 dalam *E. coli* ER2566 dilakukan dengan menumbuhkan *E. coli* ER2566 [pTWIN1-PT-2], sel dipanen setelah inkubasi 16 jam. Kultur bakteri diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam 10 mL media LB baru dengan antibiotik sesuai. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C kecepatan 150 rpm selama 4 jam. Setelah *Optical Density* (OD600) mencapai 0,4-0,6, kultur ditambahkan larutan IPTG dengan konsentrasi akhir 0,1 mM dan diinkubasi pada variasi suhu 12, 18, 22, dan 30°C selama semalam dengan kecepatan kocok 150 rpm. Selanjutnya sel dipanen pada kecepatan 15000g selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang. Debris sel ditambahkan dengan bufer glisin 20 mM sebanyak 500 µL, lalu dihomogenkan menggunakan *vortex*.

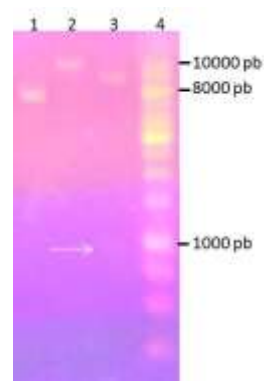
Debris sel dilisis dengan sonikator dengan waktu sonikasi 10 menit dengan 2 detik "on" 2 detik "off". Hasil lisis disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 15000g. Supernatan diambil sebagai fraksi larut (CE), debris sel ditambahkan urea 0,8 mM, direbus pada suhu 100°C selama 15 menit dan disentrifugasi kecepatan 15000g selama 10 menit, supernatan diambil sebagai fraksi tidak larut (IF). Masing-masing sampel dikarakterisasi menggunakan SDS-PAGE 12%.

## Hasil dan Pembahasan

### Hasil Penelitian

**Isolasi dan karakterisasi plasmid rekombinan.** Isolasi plasmid pTWIN1-PT-2 dari sel *E. coli* TOP10F' dilakukan menggunakan Kit isolasi plasmid (Geneaid). Untuk menyakinkan bahwa proses isolasi telah berhasil dilakukan, selanjutnya plasmid pTWIN1-PT-2 dikarakterisasi menggunakan satu enzim (NdeI) dan dua enzim (NdeI dan XhoI). Hasil karakterisasi menggunakan enzim tersebut, selanjutnya dikarakterisasi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (Gambar 1). Hasil karakterisasi menggunakan satu enzim diperoleh pita berbentuk linier berukuran 7633 pb sesuai dengan ukuran plasmid rekombinan (Gambar 1 lajur 1). Sedangkan kaeakterisasi menggunakan dua enzim diperoleh dua pita berukuran 6697 sebagai pTWIN1 (Gambar 1 lajur 2) pb dan 936 pb sebagai fragmen PT-2 (Gambar 1 lajur 3).

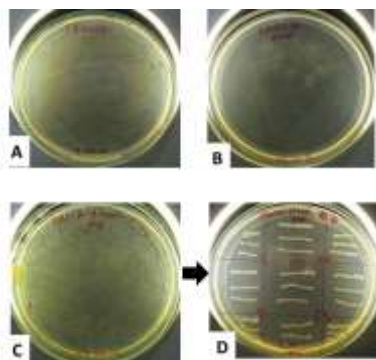
**Transformasi inang ekspresi menggunakan plasmid pTWIN1-PT-2.** Sel kompeten *E. coli* ER2566 ditransformasi dengan pTWIN1-PT-2 dengan menggunakan metode kejutan panas. Prinsip metode ini yaitu lonjakan suhu dari 4°C ke 42°C terhadap sel yang telah diberi perlakuan CaCl<sub>2</sub>. Garam CaCl<sub>2</sub> akan mempengaruhi struktur dan muatan dari membran sel sehingga pada saat terjadi lonjakan suhu, membran menjadi tidak selektif terhadap molekul asing dan produk ligasi dapat masuk ke dalam sel yang telah kompeten karena sel yang telah kompeten akan mudah dimasukkan ke dalam DNA rekombinan setelah diberi kejutan panas. Transforman ditumbuhkan ke media LB padat yang mengandung antibiotik sesuai.



**Gambar 1.** Elektroforesis plasmid rekombinan hasil isolasi. Lajur 1. pTWIN1-PT-2; lajur 2. pTWIN1-PT-2 dipotong dengan satu enzim (NdeI); lajur 3. pTWIN1-PT-2 dipotong dengan dua enzim (NdeI & XhoI); lajur 4. marker DNA.

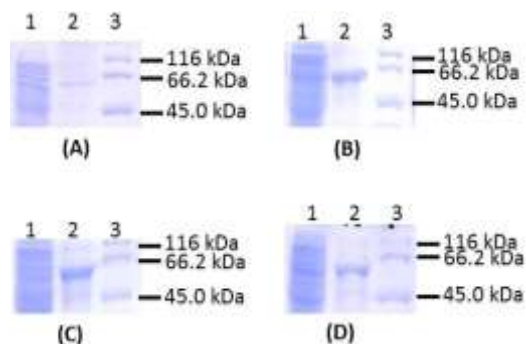
Seleksi transforman dilakukan untuk mendapatkan koloni positif yang mengandung plasmid rekombinan. Hasil transformasi dinamakan koloni transforman, yang ditunjukkan pada Gambar 2. Pada Gambar 2A kontrol positif menunjukkan bahwa *E. coli* ER2566 sudah kompeten dan memungkinkan proses transformasi berhasil (*E. coli* ER2566 tidak resisten terhadap antibiotik), sedangkan Gambar 2B kontrol negatif merupakan kontrol untuk memastikan *E. coli* resisten terhadap antibiotik atau tidak. Dari transforman yang didapat diperoleh bahwa *E. coli* ER2566 menghasilkan koloni yang cukup rapat, namun beberapa koloni tunggal dapat dicuplik untuk dapat diremajakan kembali (Gambar 2C).

**Ekspresi gen PT-2.** Setelah proses transformasi, *E. coli* ER2566 pembawa plasmid rekombinan diekspresikan. Koloni transforman hasil replikasi dicuplik dan ditumbuhkan dalam 5 mL LB cair baru yang mengandung antibiotik sesuai, diinkubasi selama 16 jam dengan kecepatan kocok 150 rpm. Dalam media LB baru yang mengandung antibiotik sesuai, kultur semalam dipipet sebanyak 10 µL, kemudian diinkubasi selama ~4 jam pada suhu 37°C hingga OD600 mencapai 0,4-0,6 (Tabel 1). Kultur selanjutnya diinduksi menggunakan IPTG dengan konsentrasi akhir 0,1 mM, dan diinkubasi selama 16 jam pada variasi suhu 12, 18, 22 dan 30°C.



**Gambar 2.** Transforman *E. coli* ER2566 yang mengandung pTWIN1-PT-2 dan replikasinya. A. kontrol positif; B. kontrol negatif; C. *E. coli* ER2566 kompeten pembawa plasmid pTWIN1-PT-2; dan D. Hasil replikasi koloni transforman.

Sel dipanen dan dikarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE 12%. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa suhu mempengaruhi ekspresi rhPT-2 di *E. coli* ER2566 (Gambar 3).



**Gambar 3.** Analisis SDS-PAGE 12%. (A). inkubasi pada suhu 12°C; (B). inkubasi pada suhu 18°C; (C). inkubasi pada suhu 22°C; (D). inkubasi pada suhu 30°C. Lajur 1. fraksi larut protein fusi PT-2; lajur 2. fraksi tidak larut; lajur 3. marker protein.

Suhu tinggi menyebabkan protein fusi rhPT-2 diekspresikan dalam fraksi tidak larut, sedangkan suhu rendah (12°C) dapat mengurangi pembentukan fraksi tidak larut, namun tidak dapat meningkatkan perolehan protein fusi larut.

## Pembahasan

Untuk meningkatkan kelarutan protein rekombinan pada *E. coli*, dapat dilakukan melalui perubahan kondisi umum ekspresi. Pertumbuhan bakteri dan ekspresi protein rekombinan

dipengaruhi oleh beberapa parameter, seperti komposisi medium, kadar oksigen, pH, suhu fermentasi dan induksi (Freydell et al., 2007; Hartinger et al., 2010). Menurut Tegel (2013), suhu pertumbuhan optimal pada *E. coli* adalah 37°C. Meskipun protein rekombinan yang dihasilkan dalam jumlah tinggi dapat dicapai pada suhu 37°C, namun dianjurkan untuk menurunkan suhu setelah induksi. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan protein target dalam bentuk larut, karena proses produksi protein pada suhu tinggi akan menghasilkan protein yang terendapkan.

Dari penelitian ini diperoleh bahwa protein fusi PT-2 berhasil diekspresikan di *E. coli* ER2566. Namun, dari semua fraksi pada variasi suhu yang dilakukan terbentuk protein tidak larut. Penurunan suhu induksi hanya dapat menurunkan laju ekspresi suatu protein, dimana memberi kesempatan pada protein tersebut melakukan pelipatan protein dengan benar. Dari berbagai variasi suhu yang dilakukan, hanya pada suhu 12°C protein tidak larut lebih sedikit dihasilkan dibanding dengan suhu induksi yang lain, namun perolehan protein larut tidak signifikan. Perlu dikaji parameter lain yang dapat meningkatkan ekspresi protein larut di *E. coli*, seperti peran chaperon, penginduksi IPTG, komposisi medium pertumbuhan, dan lain sebagainya.

## Penutup

Dari penelitian ini diperoleh bahwa: (1) suhu berpengaruh dalam ekspresi protein fusi PT-2 di *E. coli* ER2566; (2) suhu rendah selama ekspresi protein di *E. coli* ER2566 dapat mengurangi pembentukan protein fusi tidak larut, namun tidak signifikan meningkatkan perolehan protein fusi larut; dan (3) peningkatan suhu justru menyebabkan protein fusi PT-2 diekspresikan sebagai protein tidak larut di *E. coli* ER2566.

## Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada DRPM Kemristekdikti atas bantuan dana penelitian melalui skim PTUP tahun 2018.

## Daftar Pustaka

- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotech*, 22(11), 1399-408.
- Cabrita, L. D., Dai, W., & Bottomley, S. P. (2006). A family of *E. coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotech*, 6(1), 12.
- Daly, R., & Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol Recog*, 18(2), 119-138.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotech Adv*, 27(3), 297-306.
- DiBella, E. E., Maurer, M. C., & Scheraga, H. A. (1995). Expression and folding of recombinant bovine prothrombin-2 and its activation to thrombin. *J. Biol Chem*, 270(1), 163-169.
- Enus, S., Natadisastra, G., Shahib, M. N., & Sulaeman, R. (2011). Peran lem fibrin otologus pada penempelan tandur konjungtiva bulbi mata kelinci terhadap ekspresi gen fibronektin dan integrin. *MKB*, 43(4), 183-188.
- Freydell, E. J., Ottens, M., Eppink, M., van Dedem, G., & van der Wielen, L. (2007). Efficient solubilization of inclusion bodies. *Biotechnol. J*, 2(6), 678-684.
- Hartinger, D., Heinel, S., Schwartz, H. E., Grabherr, R., Schatzmayr, G., Haltrich, D., & Moll, W. D. (2010). Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisins B 1. *Microb Cell Fac*, 9(1), 62.
- Heldebrant, C. M., Butkowsky, R. J., Bajaj, S. P., & Mann, K. G. (1973). The Activation of Prothrombin II. Partial reactions, physical and chemical characterization of the intermediates of activation. *J. Biol Chem*, 248(20), 7149-7163.
- Jonebring, A., Lange, U., Bucha, E., Deinum, J., Elg, M., & Lövgren, A. (2012). Expression and characterization of recombinant ecarin. *Protein J*, 31(5), 353-358.
- Mann, K. G. (2011). Thrombin generation in hemorrhage control and vascular occlusion. *Circulation*, 124(2), 225-235.
- Owen, W. G., Esmon, C. T., & Jackson, C. M. (1974). The conversion of prothrombin to thrombin I. Characterization of the reaction products formed during the activation of bovine prothrombin. *J. Biol Chem*, 249(2), 594-605.
- Rizkia, P. R., Silaban, S., Hasan, K., Kamara, D. S., Subroto, T., Soemitro, S., & Maksum, I. P. (2015). Effect of Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside concentration on prethrombin-2 recombinant gene expression in *Escherichia coli* ER2566. *Procedia Chem*, 17, 118-124.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Silaban, S., Maksum, I. P., Ghaffar, S., Hasan, K., Enus, S., Subroto, T., & Soemitro, S. (2015). Codon optimization and chaperone assisted solubilization of recombinant human prethrombin-2 expressed in *Escherichia coli*. *Microbiol Indones*, 8(4), 177-182.
- Silaban, S., Maksum, I. P., Enus, S., Hasan, K., Subroto, T., & Soemitro, S. (2016). Kajian ekspresi gen prethrombin-2 manusia sintetik pada *Escherichia coli* secara in silico untuk produksi trombin sebagai komponen lem fibrin. *J. Pendidikan Kimia*, 8(1), 58-64.
- Silaban, S., Maksum, I. P., Hasan, K., Enus, S., Subroto, T., & Soemitro, S. (2017). Purification of recombinant human prethrombin-2 in *Escherichia coli* for thrombin production as fibrin glue components. *J. Pendidikan Kimia*, 9(1), 265-272.
- Soejima, K., Mimura, N., Yonemura, H., Nakatake, H., Imamura, T., & Nozaki, C. (2001). An efficient refolding method for the preparation of recombinant human prethrombin-2 and characterization of the recombinant-derived  $\alpha$ -thrombin. *J. Biochem*, 130(2), 269-277.
- So, I. S., Lee, S., Kim, S. W., Hahm, K. S., & Kim, J. (1992). Purification and activation of recombinant human prethrombin 2 produced in *E. coli*. *Korean Biochem J*, 25(1), 60-65.

- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotech*, 115(2), 113-128.
- Subroto, T., Pertiwi, W., Fadhillah, M., Hasan, K., Budiantoro, O., Enus, S., & Soemitro, S. (2016). Cloning, expression, and functional characterization of autoactivated human prethrombin-2 synthetic gene by using *Pichia pastoris* SMD1168 as a host. *Microbiol Indones*, 10(2), 39-47.
- Tegel, H. (2013). *Proteome wide protein production* (Doctoral dissertation, KTH Royal Institute of Technology).
- Tripathi, N. K. (2009). High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Def Sci J*, 59(2), 137-146.
- Yonemura H, Imamura T, Soejima K, Nakahara Y, Morikawa W, Ushio Y, Kamachi Y, Nakatake H, Sugawara K, Nakagaki T, Nozaki C. (2004). Preparation of recombinant  $\alpha$ -thrombin: high-level expression of recombinant human prethrombin-2 and its activation by recombinant ecarin. *J. Biochem*, 135(5), 577-582.