

Produksi Ekstraseluler dCas9 dari *Geobacillus kaustophilus* Strain TBU101 pada *Escherichia coli* BL21 dengan Memvariasikan Konsentrasi Isopropyl-B-d-thiogalactopyranoside (IPTG) dan Suhu Pemanasan = Extracellular Production of dCas9 from *Geobacillus caustophilus* Strain TBU101 in *Escherichia coli* BL21 by Varying Isopropyl-B-d-thiogalactopyranoside (IPTG) Concentration and Heating Temperature

Vien Alvioiretha Laurencia, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=9999920545447&lokasi=lokal>

Abstrak

Kemajuan dalam teknologi penyuntingan genom menggunakan Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) memberi kemampuan kepada para ilmuwan untuk mengubah sekuens genom pada sebagian besar sel eukariot. Saat ini, penelitian terkait sistem CRISPR-Cas9 juga berkembang menuju pengembangan sistem represor transkripsional CRISPR interference (CRISPRi) dengan menggunakan sistem dCas9 yang bertujuan untuk mengarahkan rekayasa metabolisme melalui penyuntingan jalur metabolisme. Saat ini belum banyak penelitian yang memproduksi enzim dCas9 menggunakan metode ekstraseluler yang lebih efisien dan ekonomis. Pada penelitian ini, produksi enzim dCas9 dilakukan secara ekstraseluler dengan menggunakan bakteri *Geobacillus kaustophilus* dan *Escherichia coli* BL21 sebagai host dan dipurifikasi dengan menggunakan Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) dengan penggunaan variasi konsentrasi IPTG, yakni 0,05 mM dan 0,5 mM, dan suhu pemanasan, yakni pada suhu 50°C dan 70°C. Pada suhu pemanasan 50°C dan konsentrasi IPTG 0,5 mM, konsentrasi protein yang didapatkan adalah 1.971 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sedangkan ketika suhu pemanasan dinaikkan menjadi 70°C konsentrasinya menjadi sebesar 487 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pada suhu 50°C, konsentrasi IPTG yang diturunkan menjadi 0,05 mM menghasilkan protein dengan konsentrasi sebesar 281 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Identifikasi protein dengan uji SDS-PAGE menunjukkan ukuran protein hasil purifikasi sebesar 64,76 kDa.

.....Advancements in genome editing technology using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) provide scientists with the ability to modify genome sequences in most eukaryotic cells. Currently, research related to the CRISPR-Cas9 system is also evolving towards the development of the CRISPR interference (CRISPRi) transcriptional repressor system using the dCas9 system, aimed at directing metabolic engineering through pathway editing. At present, there is limited research on producing dCas9 enzymes using a more efficient and economical extracellular method. In this study, dCas9 enzyme production was carried out extracellularly using *Geobacillus kaustophilus* and *Escherichia coli* BL21 as hosts and purified using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) with variations in IPTG concentrations, namely 0,05 mM and 0,5 mM, and heating temperatures, namely at 50°C and 70°C. At a heating temperature of 50°C and an IPTG concentration of 0,5 mM, the protein concentration obtained was 1,971 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When the heating temperature was increased to 70°C, the concentration became 487 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At 50°C, lowering the IPTG concentration to 0,05 mM resulted in a protein concentration of 281 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Protein identification using SDS-PAGE showed the size of the purified protein to be 64,76 kDa.