

DESAIN, OPTIMASI, DAN KLONING GEN *PRETROMBIN-2* SINTETIK UNTUK PRODUKSI TROMBIN SEBAGAI KOMPONEN LEM FIBRIN

*(Design, Optimization, and Cloning Of PRETOMBIN-2 for Production
Thrombin of Fibrin Glue Component)*

Saronom Silaban¹; Iman Permana Maksum²; Shabarni Gaffar²; Sutarya Enus³; Khomaini Hasan⁴; Toto Subroto² dan Soetijoso Soemitro²

¹Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Medan, Medan

²Departemen Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Padjadjaran, Sumedang

³Pusat Mata Nasional, Rumah Sakit Mata Cicendo, Bandung

⁴Pusat Penelitian Pangan, Kesehatan dan Obat, Institut Teknologi Bandung, Bandung
Email/telp: saronomsilaban@unimed.ac.id/085317692813

ABSTRAK

Lem fibrin adalah biomaterial perekat yang dapat diaplikasikan untuk mengganti teknik jahitan pasca operasi. Biomaterial ini terdiri atas trombin, fibrinogen dan faktor XIII sebagai komponen utamanya. Dalam kajian ini, didesain dan dilakukan kloning gen pretrombin-2 (PT2) manusia sintetik sebagai prekursor trombin. Gen PT2 pada posisi C-terminal difusikan dengan suatu pengkode intein diikuti oleh gen domain pengikat kitin, yang bermanfaat dalam proses pemurnian. Kodon PT2 dirancang sesuai dengan preferensi kodon *Escherichia coli*. Gen PT2 dirancang menggunakan perangkat lunak *OPTIMIZER* dengan penambahan sisi restriksi NdeI pada ujung 5' dan XhoI pada ujung 3' nya. Gen PT2 sintetik yang terdapat pada pMAT, dipotong menggunakan enzim restriksi NdeI dan XhoI. Selanjutnya, PT2 diligasi ke vektor ekspresi pTWIN1, yang telah dipotong dengan menggunakan enzim restriksi yang sama, dengan katalis T4 DNA ligase. Keberhasilan kloning PT2 ke pTWIN1 diverifikasi dengan sequencing DNA. Hasil sequencing menunjukkan bahwa gen PT2 hasil rancangan berhasil dikloning ke dalam pTWIN1. Selanjutnya, gen PT2 hasil kloning ini dapat digunakan sebagai bahan awal untuk ekspresi PT2 dalam inang *E. coli*.

Kata kunci: lem fibrin, trombin, intein, ekspresi, *E. coli*

ABSTRACT

*Fibrin glue is a biomaterial adhesive that can be applied as a substitute postoperative suture technique. These biomaterials consisting of thrombin, fibrinogen and factor XIII as main component. In this study, we designed and cloned genes prethrombin-2 (PT2) synthetic humans as a precursor of thrombin. PT2 gene at position C-terminal fused with a gene encoding the intein followed by a chitin-binding domain, which is useful in the purification process. Codon PT2 is designed according to the preference codons of *Escherichia coli*. PT2 gene was designed using the software *OPTIMIZER* with the addition of the NdeI restriction on the 5 'end and XhoI on the 3' end of her. PT2 synthetic gene contained in pMAT, cut using restriction enzymes NdeI and XhoI. Furthermore, PT2 pTWIN1 ligated into the expression vector, which has been cut using the same restriction*

E-mail: jurnal.itekima@stack.ac.id

enzymes, the catalysts T4 DNA ligase. The success of cloning PT2 to pTWIN1 verified by DNA sequencing. Sequencing results showed that the gene was successfully cloned PT2 design results in pTWIN1. Furthermore, PT2 cloned gene can be used as starting materials for PT2 expression in E. coli host.

Key words: *fibrin glue, thrombin, intein, expression, E. coli*

1. PENDAHULUAN

Teknik jahitan merupakan standar emas untuk menutup luka pasca operasi infeksi (Enus *et al.*, 2011). Walaupun merupakan standar emas, teknik ini menimbulkan beberapa permasalahan: waktu pembedahan yang lebih panjang, ketidaknyamanan, penyembuhan luka berlangsung lama, trauma tambahan (pemasangan dan pencabutan benang), meningkatnya inflamasi, serta kemungkinan timbulnya komplikasi yang berhubungan dengan jahitan berupa infeksi (Uy *et al.*, 2005).

Lem fibrin (LF) memiliki kemampuan untuk merekatkan dan menutup luka, sehingga sangat berpotensi menggantikan teknik jahitan pasca operasi. LF sebagai bahan *bioadhesive*, tersusun atas fibrinogen, trombin, kalsium dan faktor XIII. Bahan ini dirancang untuk menyerupai tahap akhir koagulasi dengan membentuk bekuan fibrin. LF digunakan sebagai bahan hemostatis yang menghentikan pendarahan dari celah insisi, matriks untuk penyembuhan luka dan perekat jaringan (Spotnitz & Prabhu, 2005).

Meskipun luas penggunaannya, LF yang didapat secara komersial relatif mahal, sehingga tidak ekonomis. LF komersial ini mengandung protein plasma yang dimurnikan dari sumber darah lain. Namun, resiko kontaminasi patogen dari LF dapat terjadi secara bersamaan dengan perawatan. Untuk membuat LF diperlukan sumber bahan yang lebih berlimpah dan lebih aman. Saat ini, trombin pada LF komersial biasanya terbuat dari plasma beku segar sapi. Hanya saja, ketidaktersediaan produk ini di Indonesia, menyebabkan harus diimpor dengan harga yang sangat mahal. Permasalahan lain yang muncul adalah belum adanya izin khusus dari *Food and Drug Administration*, terkait transmisi penyakit karena terbuat dari plasma donor khusus untuk operasi mata (Enus *et al.*, 2010).

E-mail: *jurnal.itekima@stack.ac.id*

Penggunaan yang luas dari *E. coli* sebagai inang dalam produksi protein rekombinan disebabkan oleh karena sifatnya yang dapat tumbuh cepat dengan siklus hidup pendek, informasi dan karakter genom yang sudah lengkap sehingga mudah dimanipulasi, biaya produksi relatif murah, tingkat ekspresi protein target tinggi, cepat, dan teknologinya sudah mapan (Cabrita *et al.*, 2006). Namun, dibalik keuntungan yang disebutkan di atas, inang ini juga memiliki kelemahan, seperti fenomena bias kodon (Sorensen & Mortensen, 2005), dan potensi menghasilkan protein agregat kompleks tidak aktif yang lazim dikenal sebagai badan inklusi (Freydell *et al.*, 2007).

Strategi pertama yang perlu dilakukan untuk mengatasi kelemahan yang disebutkan di atas adalah dengan melakukan optimasi kodon gen target terhadap preferensi kodon inang. Strategi ini bertujuan untuk mengatasi rendahnya ekspresi protein dari gen target. Proses optimasi ini dilakukan dengan cara merubah kodon pengkode asam amino tertentu yang berasal dari sumber lain menjadi kodon dengan frekuensi tinggi di inang ekspresi (Gustafsson *et al.*, 2004). Strategi kedua adalah memanfaatkan teknologi gen sintetik berdasarkan kemampuan mengubah bias kodon dari gen target menjadi cocok dengan kodon preferensi inang rekombinan. Keuntungan lain dari teknologi ini adalah efektifitas dan efisiensi yang tinggi dibandingkan dengan proses isolasi sendiri, serta terhindar dari transmisi penyakit dan reaksi alergi (Hughes *et al.*, 2011).

2. BAHAN DAN METODE

Galur, vektor, bahan kimia, media

E. coli TOP10F' adalah galur inang untuk kloning dan peremajaan plasmid. pMAT merupakan vektor kloning komersial. Galur ditumbuhkan dalam media Luria Bertani (LB) dengan komposisi (tripton 1%, yeast extract 0,5%, dan natrium klorida 1%) yang disuplemen dengan antibiotik tetrasiklin (100 µg/mL), dan ampisilin (100 µg/mL). Untuk media padat, komponen media LB ditambahkan dengan 2% agar. Semua enzim restriksi dan T4-DNA ligase diperoleh secara komersial dari Fermentas (Canada). Vektor ekspresi pTWIN1 diperoleh secara

E-mail: jurnal.itekima@stack.ac.id

komersial dari New England Biolabs, NEB. Gen *PT2* sintetik (*PT2-intein MxeGyrA*) disintesis oleh GeneArt AG (Jerman).

Desain dan optimasi kodon gen *PT2*

Gen *PT2* sintetik dirancang berdasarkan urutan asam amino yang termuat dalam *GenBank* (*Accession number: NM_000506.3*). Kodon preferensi *E. coli* yang digunakan termuat dalam *Codon Usage Database* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Optimasi kodon dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Optimizer* (<http://gnomes.urv.es/OPTIMIZER>) dan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) (<http://gcu.schoedl.de/>).

Konstruksi fusi *PT2* dan vektor pTWIN1

Eksresi *PT2* dalam *E. coli* dan pemurniannya menggunakan sistem IMPACT-TWIN. Perancangan gen *PT2* sintetik ini dilengkapi dengan sisi restriksi *XhoI* dan *NdeI* pada intein terinduksi senyawa tiol. Untuk menggabungkan *PT2* sintetik dengan vektor ekspresi pTWIN1, maka pMAT-*PT2* terlebih dahulu dipotong menggunakan enzim restriksi *XhoI* dan *NdeI*. Secara paralel, dilakukan juga pemotongan pTWIN1 dengan enzim restriksi yang sama. Selanjutnya fragmen *PT2* disambungkan ke pTWIN1 menggunakan T4 DNA ligase hingga menghasilkan plasmid pTWIN1-*PT2*.

Transformasi pTWIN1-*PT2* ke dalam sel kompeten *E. coli* TOP10F'

Transformasi pTWIN1-*PT2* ke sel kompeten *E. coli* TOP10F' dengan menggunakan metode kejutan panas (*heat shock*) (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni transforman *E. coli* diseleksi melalui media agar yang mengandung antibiotik tetrasiklin dan ampisilin untuk transforman yang mengandung pTWIN1-*PT2*. Plasmid rekombinan, pTWIN1-*PT2* diisolasi dari koloni transforman *E. coli* TOP10F' menggunakan *QIAGEN Spin Plasmid Miniprep Test Kit* sesuai dengan protokol dari Qiagen. Plasmid rekombinan hasil pemurnian, dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Selanjutnya plasmid tersebut digunakan untuk analisis restriksi dan ditentukan urutan nukleotidanya menggunakan metode

sekuensing DNA. Hasil sekuensing disejajarkan menggunakan *Seqman* pada program *Bioedit*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Desain dan optimasi kodon gen PT2 manusia

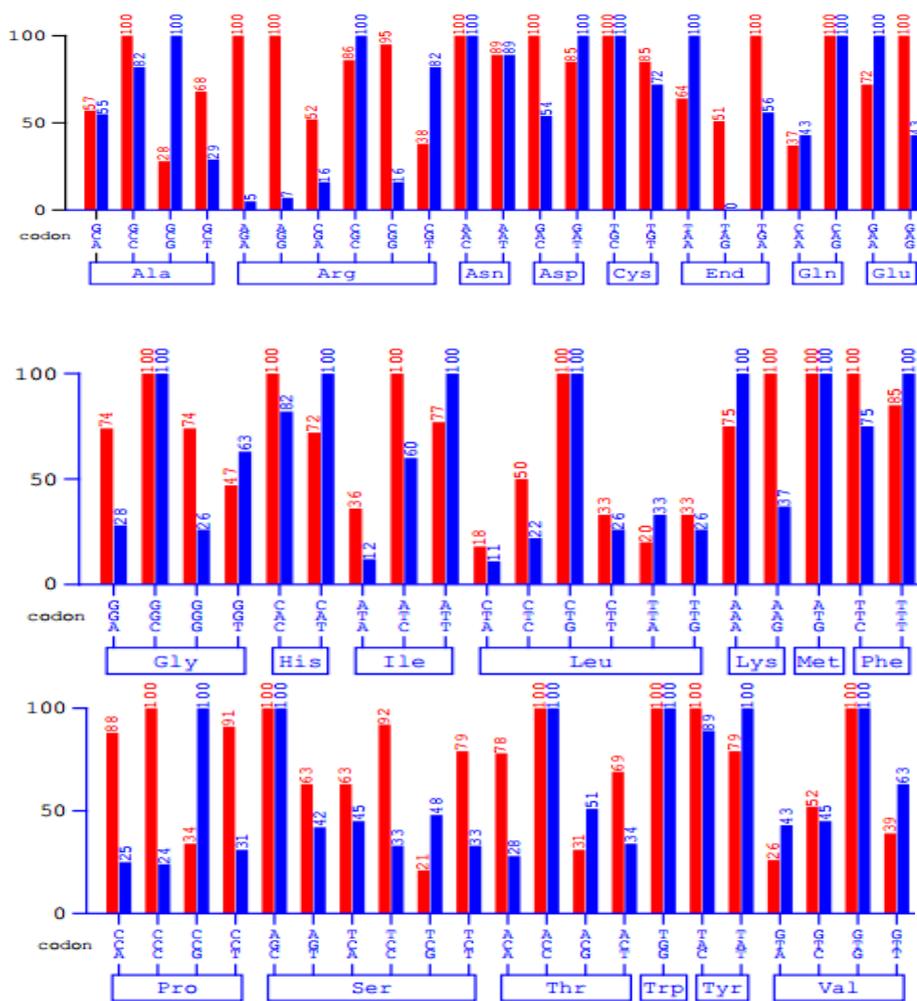
Perancangan gen PT2 manusia sintetik telah dilakukan melalui perangkat lunak. PT2 sintetik dirancang berdasarkan urutan asam amino yang termuat dalam GenBank dan penggunaan kodon preferensi *E. coli* yang termuat dalam Codon Usage Database. Urutan asam amino PT2 manusia terdapat dalam GenBank, dengan Accession number:NM_000506.3. Berdasarkan data GenBank, bahwa gen PT2 manusia terdiri dari 307 asam amino. Untuk memungkinkan proses ekspresi protein pada ujung 5' PT2 tersebut ditambahkan start codon ATG yang mengkode asam amino metionin.

Urutan nukleotida PT2 manusia yang diperoleh, berukuran 924 pasang basa dan selanjutnya dianalisis menggunakan perangkat lunak GCUA (www.gcuu.org). Hasil analisis GCUA, terdapat sembilan jenis residu asam amino PT2 (149 asam amino keseluruhan) dikode oleh kodon yang tidak preferens bagi *E. coli* (kesesuaian relatif kurang dari 100%) (Tabel 1). Kodon-kodon PT2 manusia yang belum preferens, diubah dengan kodon *E. coli* K12 pengode asam amino yang sama dari data GCUA (Gambar 1). Tujuan pengubahan ini adalah agar diperoleh asam amino PT2 dengan kodon pengode yang preferens dengan *E. coli* (kesesuaian relatif 100%).

Tabel 1. Asam amino PT2 dan kodon pengodenya. (*): kodon pengode asam amino PT2 kesesuaian relatif <100%; (): kodon *E. coli* pengganti**

Asam amino PT2	Simbol	Jumlah	Pengode*	Pengganti**
Arginin	R	22	CGT	CGC
Asam aspartat	D	19	GAC	GAT
Valin	V	17	GTT	GTG
Histidin	H	5	CAC	CAT
Isoleusin	I	17	ATC	ATT
Serin	S	18	TCT	AGC
Fenilalanian	F	13	TTC	TTT
Glisin	G	26	GGT	GGC
Tirosin	Y	12	TAC	TAT
	9 aa	149		

E-mail: jurnal.itekima@stack.ac.id



Gambar 1. Kodon *E. coli* K12 dari data GCUA. Pasangan kodon warna merah adalah kodon manusia. Pasangan kodon warna biru adalah kodon *E. coli*

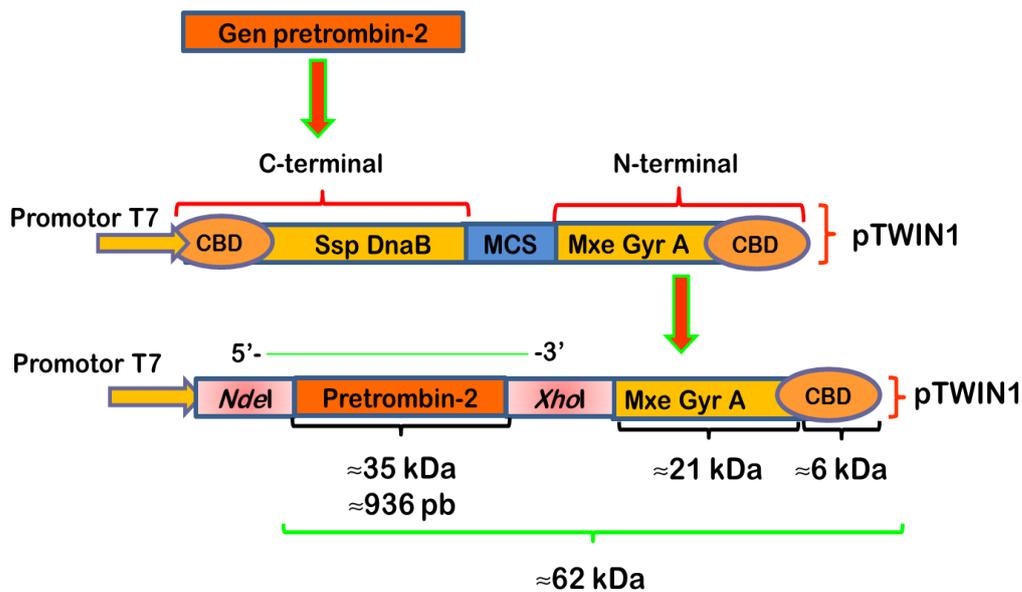
Penelitian ini menggunakan pretrombin-2 (PT2) manusia yang didapatkan dari *GeneBank* dengan nomor seri NM_000506.3 berupa urutan asam amino, sehingga perlu diubah ke dalam bentuk nukleotida. PT2 manusia tersebut terdiri dari 308 residu asam amino dan telah diubah ke dalam bentuk urutan nukleotida menggunakan perangkat lunak dalam jaringan *OPTIMIZER*. Mengingat inang yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroorganisme *E. coli*, artinya protein tertentu akan diekspresikan ke organisme lain (heterolog), sehingga memungkinkan terjadinya berbagai masalah pada ekspresi protein. Penelitian

sebelumnya melaporkan bahwa, gen-gen manusia yang banyak mengandung kodon jarang, tidak akan diekspresikan secara efisien, dan dapat menghambat laju translasi (Kane, 1995; Merkl, 2003; Gustafsson *et al.*, 2004; Welch *et al.*, 2004).

Hasil analisis *wild type* urutan nukleotida PT2 dengan GCUA (www.gcu.org) menunjukkan bahwa sembilan residu asam amino PT2 dikode oleh kodon-kodon yang tidak preferens dengan kodon inang (frekuensi rendah), sehingga kemungkinan tidak akan diekspresikan secara efisien. Optimasi kodon perlu dilakukan karena pada *wild type* nukleotida PT2 terdapat kodon yang tidak preferens dengan genom inang. Xiong *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa kodon yang jarang diekspresikan, dioptimasi sehingga kodon diekspresikan dengan frekuensi tinggi. Hal yang sama juga dikemukakan oleh Wang *et al.*, (2010), dimana tingkat ekspresi protein yang mengandung kodon hasil optimasi, lebih tinggi daripada protein yang mengandung kodon tidak teroptimasi. Penelitian Zhou *et al.* (2004) membuktikan bahwa, hasil ekspresi protein malaria meningkat setidaknya tiga kali lipat dengan optimasi kodon.

Konstruksi plasmid rekombinan

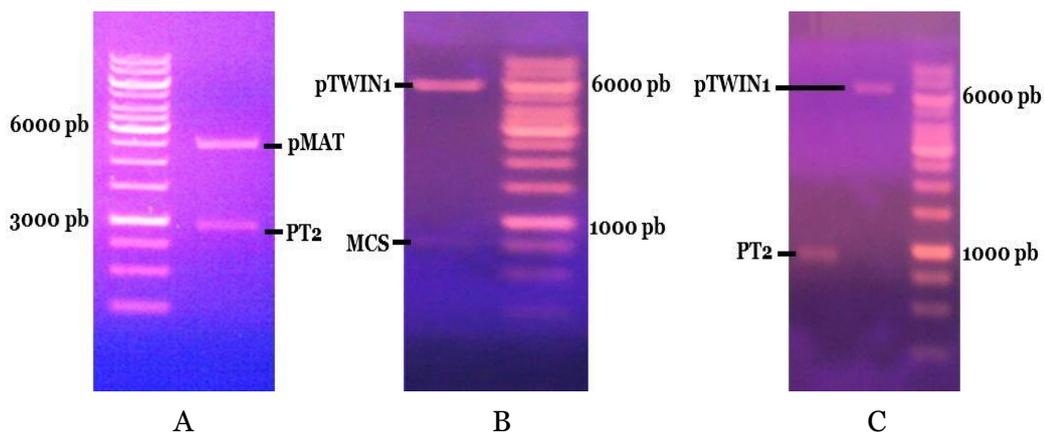
Konstruksi pTWIN1-PT2 terdapat pada Gambar 1. pTWIN1 memiliki gen pengode domain pengikat kitin yang dapat berikatan dengan kitin pada matriks pemurnian (Chong *et al.*, 1998). Dalam penelitian ini PT2 manusia dikonstruksi dalam bentuk fusi pada bagian N-terminal Sce intein-CBD (ujung-C PT2). Pada ujung keduanya disisipkan sisi pemotongan *NdeI* (CATATG) pada ujung 5' dan *XhoI* (CTCGAG) pada ujung 3' agar gen PT2 dapat digabung dengan pTWIN1. Penyisipan gen PT2 manusia sintetik pada pTWIN1 dilakukan pada bagian intein *Ssp DnaB*.



Gambar 2. Konstruksi pTWIN1-PT2 rekombin

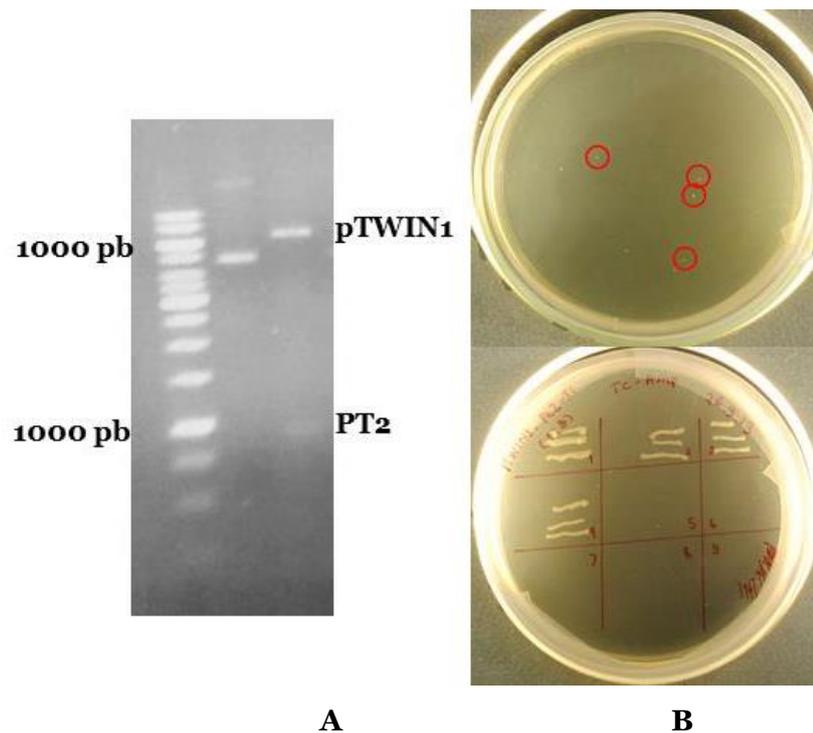
Konstruksi plasmid rekombinan dan transformasi inang *E. coli* TOP10F'

Untuk mengekspresikan PT2 pada inang ekspresi, PT2 sebagai DNA target terlebih dahulu dipotong dari plasmid pMAT dan kemudian diligasi dengan vektor ekspresi pTWIN1. Plasmid pMAT yang membawa PT2 berhasil dipotong dan diperoleh fragmen DNA PT2 yang siap diligasi dengan vektor ekspresi pTWIN1. Pemotongan pMAT_PT2 dengan enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI* menghasilkan dua pita berukuran ~936 pb (PT2) dan ~2374 pb sebagai pMAT (Gambar 3A). Vektor ekspresi pTWIN1 juga dilinierkan, dan diperoleh dua pita berukuran ~6697 pb yang diduga pTWIN1 linier dan ~678 pb (*multiple cloning site*) (Gambar 3B). Pita DNA PT2 dan pTWIN1 yang telah linier berhasil dimurnikan dari gel agarosa (Gambar 3C).



Gambar 3. Karakterisasi restriksi dan pemurnian. A: Plasmid pMAT_PT2/*XhoI/BamHI*; B: Vektor pTWIN1/*XhoI/BamHI*; C. Karakterisasi pemurnian DNA PT2 dan pTWIN1 dari gel agarosa

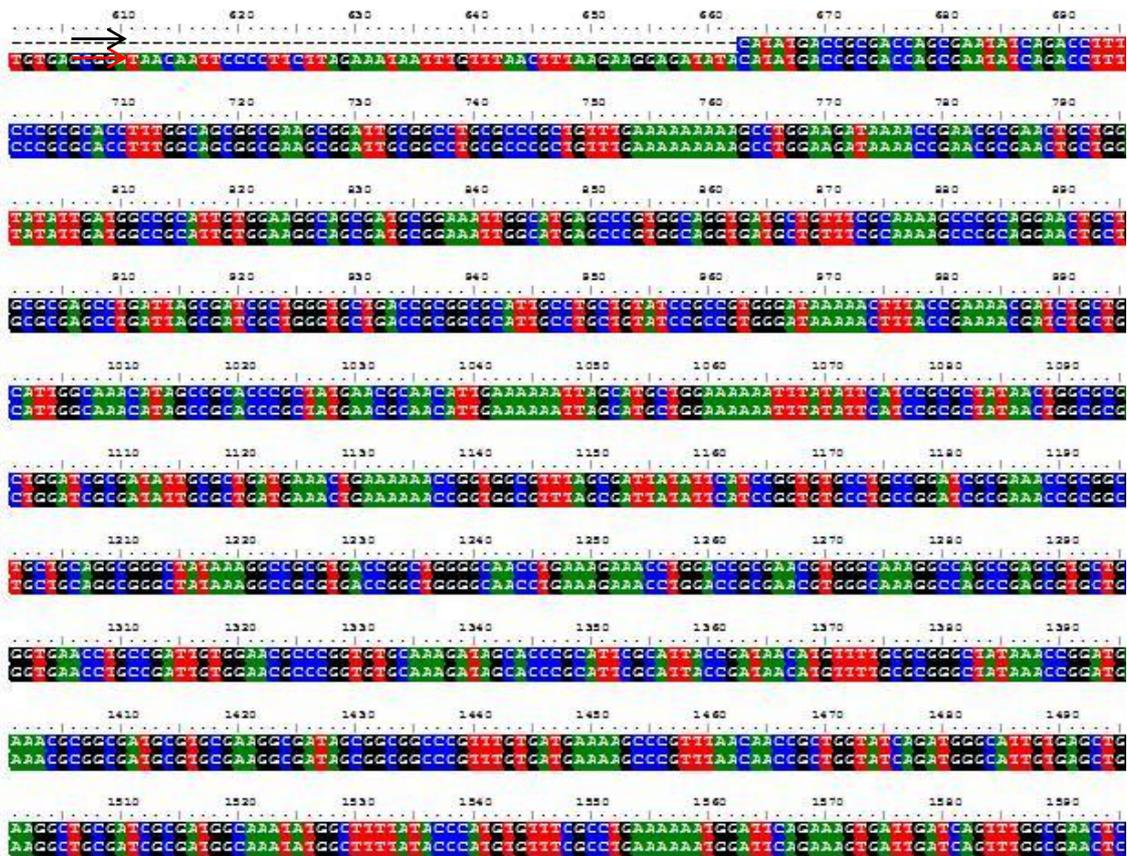
DNA PT2 berhasil terligasi dengan vektor pTWIN1. PT2 disisipkan dalam pTWIN1 di situs kloning (MCS) di antara situs pemotongan *XhoI* dan *BamHI*, sehingga dihasilkan plasmid pTWIN1 yang membawa sisipan DNA PT2 (pTWIN1-PT2). Sel kompeten *E. coli* TOP10F' berhasil ditransformasikan menggunakan plasmid pTWIN1-PT2. Sifat resisten tetrasiklin pada *E. coli* TOP10F' dan sifat resisten ampisilin yang dibawa vektor pTWIN1 digunakan untuk seleksi transforman. Transformasi *E. coli* TOP10F' menggunakan plasmid pTWIN1-PT2 menghasilkan 4 koloni tunggal (Gambar 4B). Dua koloni tunggal transforman *E. coli* TOP10F' dipilih untuk dikarakterisasi dengan enzim *XhoI* dan *NdeI*. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa, satu koloni transforman mengandung plasmid rekombinan yang benar (Gambar 4A, lajur 1 dan 2), selanjutnya diberi nama P1 dan plasmid rekombinan hasil isolasi dari P1 dinamakan pP1. Plasmid adalah molekul DNA yang membawa gen asing (PT2) yang apabila ditransformasikan ke dalam sel inang dapat bereplikasi (Campbell *et al.*, 2002).



Gambar 4. Karakterisasi transforman. A: Plasmid pTWIN1-PT2 rekombinan isolasi dari *E. coli* TOP10F'. B: Koloni transforman dan replika

Karakterisasi hasil kloning dengan DNA sequencing

Untuk mengkonfirmasi keberhasilan ligasi, dan memastikan kesesuaian urutan nukleotida gen PT2 hasil ligasi dengan hasil rancangan optimasi, sebanyak 10 μ L plasmid pTWIN1-PT2 dengan konsentrasi 100 ng/ μ L ditentukan urutan nukleotidanya dengan DNA sequencer oleh MacroGene (Korea). Perbandingan urutan nukleotida PT2 hasil optimasi dengan PT2 hasil kloning disajikan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Perbandingan urutan DNA gen PT2 hasil rancangan (panah hitam) dengan gen PT2 hasil kloning

Hasil analisis penjajaran urutan nukleotida menggunakan *seqman* pada program *Bioedit* menunjukkan bahwa gen PT2 telah berhasil terligasi ke dalam vektor pTWIN1. Hasil analisis ini juga menunjukkan bahwa urutan gen PT2 hasil kloning sesuai dengan urutan PT2 hasil rancangan optimasi.

4. KESIMPULAN

Optimasi kodon gen target sesuai kodon preferensi inang dapat meminimalkan efek bias kodon yang selanjutnya berpengaruh pada ekspresi protein. Penggunaan gen sintetik lebih efisien dan efektif dibanding proses isolasi dari sumber alami. Prospek: Hasil kloning PT2 manusia sintetik ini, akan diproduksi dalam sistem ekspresi *E. coli* sebagai salah satu komponen lem fibrin pengganti teknik jahitan pasca operasi.

E-mail: jurnal.itekima@stack.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

- Cabrita LD, Weiwen D, & Stephen PB. 2006. A Family of *E. Coli* Expression Vectors for Laboratory Scale and High Throughput Soluble Protein Production. *BMC Biotechnol*, 6:12.
- Campbell NA, Reece JB, & Mitchell LG. 2002. Biologi. Diterjemahkan oleh Lestari, R. dkk. Erlangga. Jakarta.
- Chong S, Montello GE, Zhang A, Cantor EJ, Liao W, Xu MQ, & Benner J. 1998. Utilizing The C-Terminal Cleavage Activity of a Protein Splicing Element to Purify Recombinant Proteins in a Single Chromatographic Step. *Nucleic Acids Research*, 26: 5109-5115.
- Enus S, Dalimonthe NZ, Kartiwa A, & Putri NLHE. 2010. Perbandingan Efektivitas Cangkok Konjungtiva Bulbi antara Teknik Lem Fibrin Otologus dan Teknik Jahitan pada Bedah Eksisi Penderita Pterigium. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Enus S, Natadisastra G, Shahib MN, & Sulaeman R. 2011. Peran Lem Fibrin Otologus pada Penempelan Tandur Konjungtiva Bulbi Mata Kelinci Terhadap Ekspresi Gen Fibronektin dan Integrin. *MKB*, 43:183-188.
- Freydell EJ, Ottens M, Eppink M, Van Dedam G, & Van Der Wielen L. 2007. Efficient Solubilization of Inclusion Bodies. *Biotechnol J*, 2:678-684.
- Gustafsson C, Govindrajan S, & Minshull J. 2004. Codon Bias and Heterologous Protein Expression. *Trends in Biotechnol*, 22:346-353.
- Hughes RA, Miklos AE, & Ellington AD. 2011. Gene Synthesis: Methods and Applications. *Methods in Enzimology*, 498: 277-309.
- Kane JF. 1995. Effects of Rare Codon Clusters on High-Level Expression of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin Biotechnol*, 6:494-500.
- Merkel R. 2003. A Survey of Codon and Amino Acid Frequency Bias in Microbial Genomes Focusing on Translational Efficiency. *J. Mol. Evol*, 57:453-466.

- Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- Sorensen SP, & Mortensen KK. 2005. Advanced Genetic Strategies for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 115:113-128.
- Spotnitz WD, & Prabhu R. 2005. Fibrin Sealant Tissue Adhesive-Review and Update. *J Long Term Eff Med* 15: 245.
- Uy HS, Reyes JM, Flores JD, & Siong RLB. 2005. Comparison of Fibrin Glue and Sutures for Attaching Conjunctival Autografts After Pterygium Excision. *Ophthalmology*, 112:667-671.
- Wang X, Li X, Zhang Z, Shen X, & Zhong F. 2010. Codon Optimization Enhances Secretory Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 72:101-106.
- Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, & Minshull J. 2004. You're One in a Googol: Optimizing Genes for Protein Expression. *J.R.Soc.Interface*, 6:S467-S476.