

## Kajian Ekspresi Gen Pretrombin-2 Manusia Sintetik pada *Escherichia coli* Secara *In Silico* Untuk Produksi Trombin Sebagai Komponen Lem Fibrin

Saronom Silaban<sup>1\*</sup>; Iman Permana Maksum<sup>2</sup>; Sutarya Enus<sup>3</sup>; Khomaini Hasan<sup>4</sup>; Toto Subroto<sup>2</sup> dan Soetijoso Soemitro<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Universitas Padjadjaran, Bandung

<sup>3</sup>Pusat Mata Nasional, Rumah Sakit Mata Cicendo, Bandung

<sup>4</sup>Pusat Penelitian Pangan, Kesehatan dan Obat, Institut Teknologi Bandung, Bandung

\*Korespondensi: saronomsilaban@unimed.ac.id

**Abstrak.** Pretrombin-2 merupakan prekursor trombin dan dapat berperan sebagai komponen lem fibrin (LF). LF merupakan biomaterial perekat yang dapat diaplikasikan sebagai pengganti teknik jahitan pasca operasi. Biomaterial ini terdiri dari trombin, fibrinogen dan faktor XIII sebagai komponen utamanya. Dalam LF, trombin rekombinan berperan sebagai enzim yang mengubah fibrinogen menjadi fibrin untuk membentuk benang-benang fibrin sehingga luka tertutup. Kajian ini bertujuan untuk memprediksi ekspresi gen pretrombin-2 (PT2) manusia sintetik pada *Escherichia coli* secara *in silico*. Urutan asam amino pretrombin-2 manusia yang diperoleh dari data GeneBank dirubah ke dalam bentuk wild type urutan nukleotida menggunakan software OPTIMIZER sesuai dengan kodon preferensi *E. coli* K12, Selanjutnya dianalisis dengan Graphical Codon Usage Analyzer dan dioptimasi secara manual berdasarkan preferensi kodon *E. coli* dari data Codon Usage Database. Untuk memprediksi tingkat ekspresinya pada inang *E. coli*, dipelajari kajian ekspresi PT2 secara *in silico* menggunakan perangkat lunak dalam jaringan OptimumGene<sup>TM</sup>. Hasil analisis secara *in silico* urutan nukleotida PT2 hasil optimasi dan wild type terhadap kodon preferensi *E. coli* menunjukkan bahwa, persentase rata-rata kandungan GC hasil optimasi sebesar 54,71% sedangkan wild type 52,56%, PT2 hasil optimasi memiliki 100% kodon dengan frekuensi tinggi, sedangkan wild type hanya 67%, dan PT2 hasil optimasi memiliki nilai Codon Adaptasi Index satu, sedangkan wild type hanya 0,89. Dengan demikian dapat diprediksi bahwa gen pretrombin-2 manusia sintetik kemungkinan akan diekspresikan tinggi di inang *E. coli*.

**Kata kunci:** pretrombin-2, trombin, kodon preferensi, kajian ekspresi, *E. coli*

### PENDAHULUAN

Lem fibrin (LF) sebagai bahan bioadesif, tersusun atas fibrinogen, trombin, kalsium dan faktor XIII. LF memiliki kemampuan untuk merekatkan dan menutup luka, sehingga sangat berpotensi menggantikan teknik jahitan. 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, 2001).

Saat ini, trombin pada LF komersial umumnya terbuat dari plasma beku segar sapi, yang dapat beresiko terjadinya kontaminasi patogen. Permasalahan lain adalah belum ada izin khusus dari *Food and Drug Administration* khusus untuk operasi mata, terkait transmisi penyakit karena

terbuat dari plasma donor (Enus dkk., 2011). Untuk membuat LF diperlukan sumber bahan yang lebih berlimpah dan lebih aman.

Penggunaan yang luas dari *E. coli* sebagai inang dalam produksi protein rekombinan disebabkan oleh 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 bias penggunaan kodon (Sorensen & Mortensen, 2005), dan potensi menghasilkan protein agregat kompleks tidak aktif yang lazim dikenal sebagai badan inklusi (Freydell *et al.*, 2007).

Untuk memprediksi tingkat keberhasilan ekspresi protein pada inang *Escherichia coli*,

dapat dipelajari kajian ekspresi protein pada *E. coli* secara *in silico* menggunakan perangkat lunak dalam jaringan (*OptimumGene*<sup>TM</sup>). Kajian ekspresi secara *in silico* bertujuan sebagai prediksi awal ekspresi protein pada *E. coli*.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan alat

Penelitian ini menggunakan bahan utama berupa urutan asam amino pengkode pretrombin-2 (PT2) manusia yang diperoleh dari data *GeneBank* dengan nomor seri: NM\_000506.3 (<http://ncbi.nih.gov/>). Untuk merubah urutan asam amino PT2 ke dalam bentuk urutan nukleotida, digunakan Pangkalan data OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>) (Puigbo *et al.*, 2007). Urutan nukleotida PT2 dianalisis menggunakan perangkat lunak dalam jaringan (*Graphical Codon Usage Analyzer*) (<http://gcua.schoedl.de/>) (McInerney, 1998). Sedangkan untuk memprediksi tingkat ekspresi gen PT2 sintetik pada *E. coli* digunakan secara *in silico* digunakan pangkalan data *OptimumGene*<sup>TM</sup> ([https://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon\\_analysis](https://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis)).

### Desain dan optimasi gen pengode pretrombin-2 manusia

Urutan asam amino PT2 manusia terdiri dari 308 residu asam amino (*GeneBank*: NM\_000506.3). Urutan asam amino tersebut dirubah ke dalam urutan nukleotida dengan perangkat lunak OPTIMIZER yang disesuaikan dengan kodon preferensi *E. coli* K12. Selanjutnya dianalisis dengan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) dan dioptimasi secara manual berdasarkan

preferensi kodon *E. coli* yang diperoleh dari data *Codon Usage Database*.

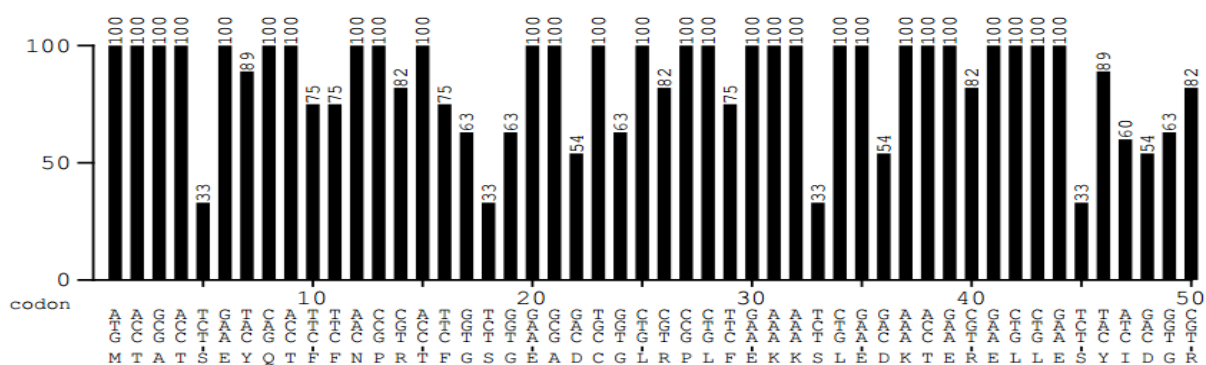
### Kajian ekspresi PT2 pada *E. coli* secara *in silico*

Untuk mengetahui kisaran persentase kandungan nukleotida GC, persentase distribusi kodon, dan distribusi frekuensi penggunaan kodon, *wild type* urutan nukleotida PT2 dan hasil optimasi dianalisis menggunakan pangkalan data *OptimumGene*<sup>TM</sup> ([https://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon\\_analysis](https://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis)).

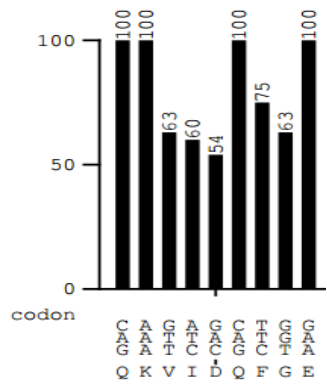
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Desain dan optimasi gen pengode pretrombin-2 manusia

Urutan asam amino PT2 manusia yang diperoleh dari data *GeneBank* telah dirubah ke dalam urutan nukleotida menggunakan *software* OPTIMIZER. Urutan nukleotida PT2 manusia yang diperoleh berukuran 924 pasang basa dan selanjutnya dianalisis menggunakan perangkat lunak GCUA. Hasil analisis GCUA penggunaan urutan kodon PT2 manusia pada *E. coli* menunjukkan beberapa asam amino dikode oleh kodon-kodon yang tidak menjadi preferensi bagi *E. coli* (Gambar 1). Terdapat sembilan jenis residu asam amino PT2 (149 asam amino keseluruhan) dikode oleh kodon yang tidak preferens (kesesuaian relatif kurang dari 100%). Asam amino PT2 yang dikode oleh kodon yang tidak preferens bagi *E. coli* berdasarkan hasil analisis GCUA adalah arginin/R (cgt) 22, asam aspartat/D (gac) 19, valin/V (gtt) 17, histidin/H (cac) 5, isoleusin/I (atc) 17, serin/S (tct) 18, fenilalanin/F (ttc) 13, glisin/G (ggt) 26, dan tirosin/Y (tac) 12.



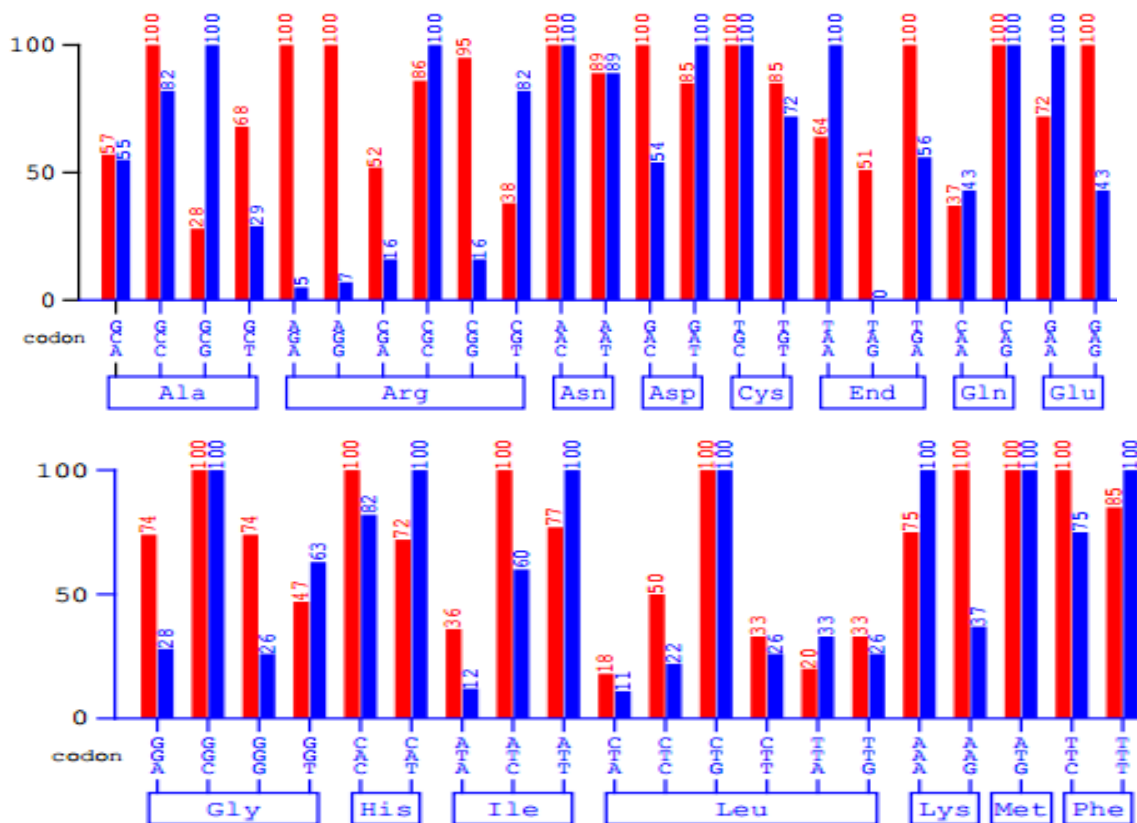


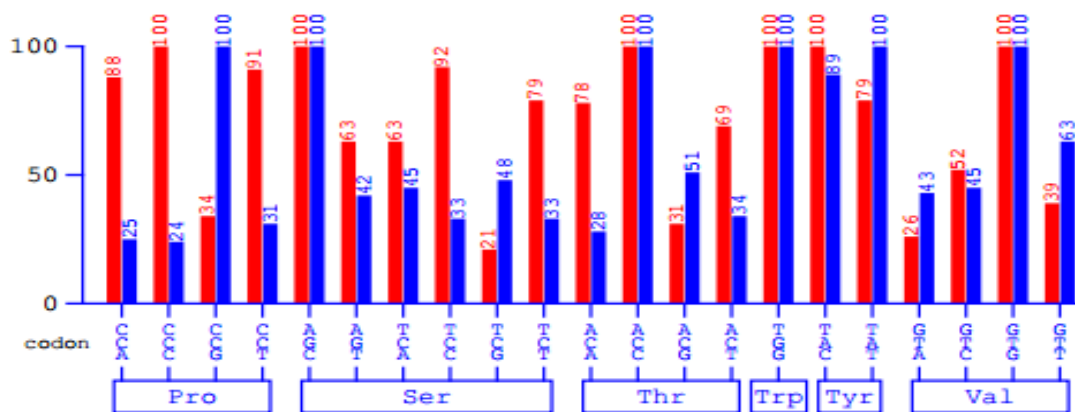


**Gambar 1.** Analisis GCUA *wild type* urutan nukleotida PT2. Asam amino PT2 dikode oleh beberapa kodon dengan kesesuaian relatif kurang dari 100%.

Kodon-kodon PT2 manusia yang belum preferens, dirubah dengan kodon *E. coli* K12 pengode asam amino yang sama dari data GCUA (Gambar 2). Tujuan pengubahan ini adalah agar diperoleh asam amino PT2 dengan kodon pengode yang preferens dengan *E. coli* (kesesuaian relatif 100%). Urutan asam

amino PT2 yang telah dioptimasi, selanjutnya dianalisis kembali menggunakan perangkat lunak GCUA, hasil analisis menunjukkan bahwa semua asam amino PT2 manusia telah dikode oleh kodon-kodon yang preferens bagi *E. coli* dengan kesesuaian relatif 100% (gambar tidak ditampilkan).





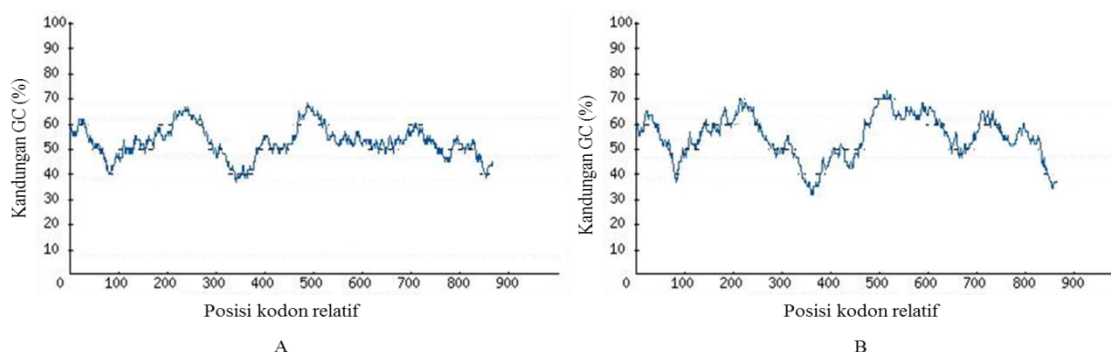
**Gambar 2.** Kodon *E. coli* K12 dari data GCUA. Pasangan kodon warna merah adalah kodon manusia dan pasangan kodon warna biru adalah kodon *E. coli*.

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 (Gustafsson *et al.*, 2004). Optimasi kodon perlu dilakukan karena pada *wild type* nukleotida PT2 banyak 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.

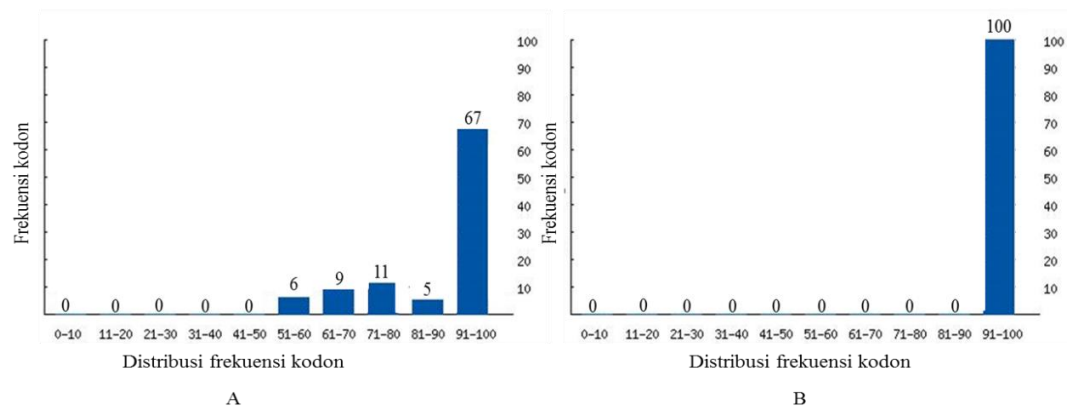
### Kajian ekspresi PT2 pada *E. coli* secara *in silico*

Untuk memprediksi ekspresi PT2 pada inang *E. coli*, dipelajari kajian ekspresi PT2 pada inang *E. coli* secara *in silico* menggunakan perangkat lunak dalam

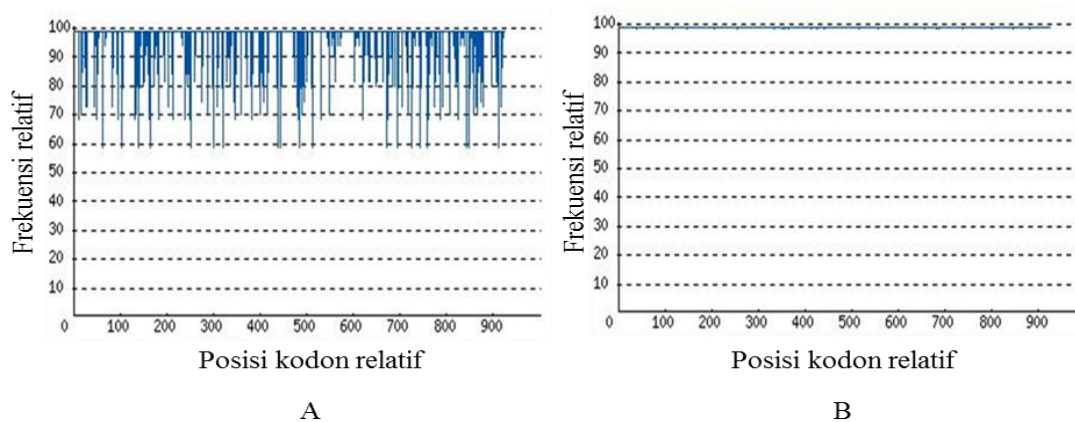
jaringan (*OptimumGene™*). Hasil analisis secara *in silico wild type* urutan nukleotida PT2 dan hasil optimasi terhadap kodon preferensi *E. coli* menunjukkan bahwa, persentase rata-rata kandungan GC pada urutan nukleotida PT2 hasil optimasi adalah sebesar 54,71%, sedangkan persentase rata-rata kandungan GC *wild type* PT2 sebesar 52,56% (Gambar 3). PT2 hasil optimasi memiliki 100% kodon yang digunakan dengan frekuensi tinggi (Gambar 4 dan Gambar 5), sedangkan *wild type* PT2 hanya 67% kodon yang frekuensi penggunaannya tinggi. Hasil ini membuktikan bahwa optimasi kodon yang dilakukan oleh Silaban dkk. (2014) dapat meningkatkan penggunaan kodon sebesar 33% yang sering digunakan pada inang *E. coli*. PT2 hasil optimasi tidak memiliki kodon yang digunakan dengan frekuensi rendah, sedangkan *wild type* PT2 memiliki 5% kodon dengan frekuensi rendah. PT2 hasil optimasi memiliki nilai *Codon Adaptasi Index* (CAI) satu, sedangkan nilai CAI *wild type* PT2 hanya 0,89 (Gambar 5).



**Gambar 3.** Perbandingan kisaran persentase kandungan nukleotida GC. (A) Kisaran persentase kandungan nukleotida GC pada *wild type* PT2 dengan kandungan GC rata-rata 52,56%; (B) Kisaran persentase kandungan nukleotida GC pada PT2 hasil optimasi dengan kandungan GC rata-rata 54,7.



**Gambar 4.** Persentase distribusi kodon yang dikelompokkan berdasarkan kualitas kodon. Nilai 100 adalah kodon dengan frekuensi penggunaan tinggi pada inang *E. coli*. (A) *wild type*; (B) PT2 dengan kodon hasil optimasi.



**Gambar 5.** Distribusi frekuensi penggunaan kodon. (A) *wild type* dan nilai CAI 0,89; (B) PT2 dengan kodon hasil optimasi dan nilai CAI 1,00.

Berdasarkan kajian *in silico* persentase GC rata-rata PT2 hasil optimasi berada pada kisaran persentase GC *E. coli* K12. Persentase kandungan GC PT2 hasil optimasi adalah 54,71%, sedangkan *E. coli* K12 adalah 52,35%. Perbedaan persentase GC rata-rata antara gen target dengan inang ekspresi dapat menyebabkan bias kodon. Kandungan GC yang tinggi pada suatu urutan nukleotida dapat menurunkan tingkat ekspresi, karena diperkirakan dapat menterminasi transkripsi (Gustafsson *et al.*, 2004). Kodon bias merupakan fenomena yang merujuk pada perbedaan frekuensi kodon sinonim diantara gen yang berbeda. Model seleksi translasi, seleksi alam dianggap menjadi penyebab bias kodon, karena penggunaan kodon yang diekspresikan tinggi cenderung ke penggunaan kodon optimal, yaitu kodon yang sesuai dengan tRNA dan paling melimpah pada organisme (Roymondal *et al.*, 2009). Gen yang diekspresikan dengan tinggi dalam spesies tertentu, akan menjadi bias terhadap

penggunaan kodon yang dikenali oleh molekul tRNA yang paling melimpah (Buchberger, 2009).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil kajian ini, dapat disimpulkan bahwa: (1) optimasi kodon gen pengode PT2 sesuai dengan preferensi kodon inang, diprediksi akan berpengaruh terhadap ekspresinya; (2) hasil analisis kodon PT2 secara *in silico* menunjukkan bahwa gen PT2 sintetik akan diekspresikan tinggi di inang *E. coli*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dirjen Penguatan Riset dan Pengembangan Kemristekdikti atas bantuan dana melalui penelitian unggulan strategis nasional (PUSNAS) T.A 2013-2015 dan penelitian disertasi doktor (PDD) T.A 2015.

## DAFTAR PUSTAKA

- Buchberger, J. 2009. *What is codon bias, and why is it species specific?* [http://www.hhmi.org/askascientist/answers/what\\_is\\_codon\\_bias\\_and\\_why\\_is\\_it\\_species\\_specific.html](http://www.hhmi.org/askascientist/answers/what_is_codon_bias_and_why_is_it_species_specific.html).
- Cabrita, L. D., Weiwen, D., & Stephen, P. B. 2006. A family of *E.coli* expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechno*, **6**:12.
- Enus, S., Natadisastra, G., Shahib, M. N., & Sulaiman, R. 2011. Peran lem fibrin otologus pada penempelan tandur konjungtiva bulbi mata kelinci terhadap ekspresi gen fibronektin dan integrin. *MKB*, **43**:183-188.
- Freydell, E. J., 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.
- McInerney, J. O. 1998. GCUA: General Codon Usage Analysis. Bioinformatics Applications Note. *Oxford University Press*, **14**:372-373.
- Puigbo, P., Guzman, E., Romeu, A., & Vallve, S. G. 2007. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic. Acids. Research*, W126-W131.
- Roymondal, U., Das, S., & Sahoo, S. 2009. Predicting gene expression level from relative codon usage bias: an application to *Escherichia coli* genome. *DNA Research*, **16**:13-30.
- Silaban, S., Maksum, I. P., Gaffar, S., Hasan, K., Enus, S., Subroto, S., & Soetijoso, S. 2014. Codon optimization and chaperonee assisted solubilization of recombinant human prethrombin-2 expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiolgy Indonesia*, **8**:177-182.
- Sorensen, S. P., & Mortensen, K. K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, **115**:113-128.
- Spotnitz, W. D. 2001. Commercial fibrin sealants in surgical care. *Am J Surg*, **182**:8S-14.
- Xiong, A. S., Peng, R. H., Zhuang, J., Gao, F., Li, Y., Cheng, Z. M., & Yao, Q. H. 2008. Chemical gene synthesis: strategies, softwares, error corrections, and applications. *FEMS.Microbiol*, **32**:522-540.