



## Intisari

*Luciferase-like monooxygenase* (LLM) merupakan enzim anggota kelompok C dari keluarga *flavin-dependent monooxygenase* yang memiliki mekanisme katalitik berupa penggabungan molekul oksigen ke substrat dan pereduksian molekul oksigen yang lain menjadi air. Pada penelitian sebelumnya, gen penyandi LLM2 dari genom *Priestia megaterium* PSA14 berhasil dikloning dan diekspresikan secara intraseluler dalam *Escherichia coli* BL21(DE3) namun, belum diketahui pelipatannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi pelipatan LLM2 yang diproduksi di *E. coli* BL21(DE3). *E. coli* BL21(DE3) yang membawa gen penyandi LLM2 dalam vektor pET28a ditumbuhkan di medium Luria-Bertani yang mengandung 50 µg/ml kanamisin. Saat pertumbuhan mencapai 0,5-0,6 pada OD<sub>600</sub>, 1 mM IPTG ditambahkan ke dalam medium. Pertumbuhan dilanjutkan selama 3 jam pada suhu 37°C kemudian sel dipanen, disonikasi, dan dianalisis dengan SDS-PAGE. Optimisasi kelarutan dilakukan dengan cara yang sama namun, kultur diinduksikan dengan berbagai konsentrasi IPTG. Pertumbuhan dilanjutkan selama 16-18 jam pada suhu 15°C kemudian sel dipanen dan disonikasi. Pelet dan supernatan dianalisis dengan SDS-PAGE untuk mengetahui kelarutan LLM2 rekombinan. Pelet dilarutkan dalam 6 M GdnHCl dan didialisis dalam 10 mM TrisHCl pH 8,8. Endapan dan supernatan yang terbentuk dianalisis dengan SDS-PAGE untuk mengetahui keberhasilan pelipatan protein. Analisis menunjukkan LLM2 dapat terekspresi dalam bentuk tidak larut. Pelipatan ulang LLM2 berhasil dilakukan dengan metode dialisis namun, sebagian masih membentuk agregat. Analisis spektrum dari 200-250 nm diketahui bahwa LLM2 hasil pelipatan dan agregat menunjukkan spektrum kuat masing-masing pada panjang gelombang 205 dan 230 nm.

**Kata kunci:** LLM2, protein rekombinan, kelarutan, dan pelipatan ulang.



### ***Abstract***

*Luciferase-like monooxygenase* (LLM) is a member of group C of the *flavin-dependent monooxygenase* (FMO). Previously, the LLM2 encoding gene from *Priestia megaterium* PSA14 has been successfully cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The study aims to determine the solubility and obtain the folded recombinant LLM2. *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying pET-*llm2* was cultivated in LB media containing 50 µg/ml kanamycin and the various IPTG induction was carried out at 15°C overnight. The cells were harvested, sonicated, and clarified the supernatant by centrifugation. The pellet and supernatant were then analyzed by SDS-PAGE to check the solubility of recombinant LLM2. The result showed that the expressed recombinant LLM2 was present in the supernatant indicating that it was not insoluble. The pellet was then dissolved by 6M GdnHCl and then dialyzed in 10 mM Tris-HCl pH 8.8 overnight at 4°C. The dialyzed protein was centrifugated to separate the soluble and insoluble fractions. SDS-PAGE analysis indicated that the recombinant LLM2 was present in both fractions. Spectrum scanning analysis of both fractions from 200-250 nm, showed that the soluble fractions exhibited strong absorbance at 205 nm, while the insoluble fraction at 230 nm.

**Keywords:** LLM2, recombinant protein, solubility, and refolding.