

## INTISARI

Asetoasetil-CoA reduktase (PhaB) merupakan enzim yang dapat mereduksi acetoacetyl-CoA menjadi 3-hydroxybutyryl CoA dalam jalur biosintesis polihidroksi butirat (PHB). Pada penelitian sebelumnya ORF dari *phaB* dari genom *Priestia megaterium* PSA14 telah berhasil dikloning pada vektor pCold dan diekspresikan dalam *Escherichia coli* BL21 (DE3), namun kelarutan dari PhaB masih belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelarutan dan mempurifikasi PhaB rekombinan. *E. coli* BL21(DE3) yang membawa pCold-*phaB* dikultivaskan dalam media Luria Bertani (LB) cair dengan 100 µg/mL *ampicillin* pada temperatur 37°C. Pada hari berikutnya, kultur sel diinokulasikan ke dalam media LB baru dan dikultivasi hingga OD<sub>600</sub> mencapai 0,5. Sel kemudian diinduksi dengan 0,5 mM IPTG dan dikultivasi selama 3 jam hingga OD<sub>600</sub> mencapai 1,5. Sel dipanen dengan sentrifugasi dan diresuspensi dengan 10 mM Tris HCl pH 6,8 yang mengandung 50 mM NaCl. Sel kemudian dipecah dengan sonikasi dan disentrifugasi untuk memisahkan pelet dan supernatan. Pelet dan supernatan dianalisis untuk mengetahui kelarutan dari PhaB rekombinan. PhaB rekombinan kemudian dipurifikasi dengan kromatografi penukar anion. Uji kelarutan menunjukkan sebagian besar PhaB rekombinan terakumulasi pada supernatan (60.7%). Hal tersebut menunjukkan bahwa PhaB rekombinan diproduksi dalam bentuk larut. Purifikasi PhaB berhasil dilakukan menggunakan kromatografi penukar anion.

Kata kunci: Asetoasetil-CoA reduktase (PhaB), ekspresi, kelarutan, dan purifikasi.

## ABSTRACT

Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) is an enzyme that catalyze the reducing acetoacetyl-CoA to 3-hydroxybutyryl CoA in polyhydroxy butyric (PHB) synthesis. In a previous study, the amplified orf of *phaB* from the genome of *Priestia megaterium* PSA14 was successfully cloned in pCold vector and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The solubility of recombinant PhaB, however, has not been known yet. The purposes of this study were to examine the solubility and purify the recombinant PhaB. The *E. coli* BL21(DE3) harbouring pCold-*phaB* was cultivated on LB media supplemented with 100 µg/ml ampicillin at 37°C. In the following day the cell culture was transferred to new LB media until reaching the OD<sub>600</sub> of 0,5. The culture was then induced by 0.5 mM IPTG and then cultivation was continued for 3 hours until reaching the OD<sub>600</sub> of 1,5. Cells was harvested by centrifugation followed by resuspension of cell pellets in 10 mM Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 50 mM NaCl. The cells were disrupted by sonication and clarified by centrifugation to separate the pellet and supernatant. The separated pellet and supernatant were analysed to determine the recombinant PhaB solubility. The recombinant protein was then purified by anion exchange chromatography. The solubility test indicated that recombinant PhaB was mostly accumulated in the supernatant (60.7%), indicating that the recombinant PhaB was produced in soluble form. In addition, the recombinant PhaB was successfully purified by anion exchange chromatography.

**Keywords:** Polyhydroxy alkanoate (PHA), PhaB, solubility, and purification.