

ABSTRAK

Protease netral adalah biokatalisator yang sangat penting dan banyak digunakan dalam industri makanan karena aktivitasnya yang optimal pada pH netral. Namun, aplikasi industri dari protease ini sering terbatas oleh stabilitas termalnya yang rendah. Dalam penelitian ini, genom *Geobacillus* sp. DS3, bakteri termofilik yang diisolasi dari Dataran Tinggi Dieng, dianalisis melalui *Whole Genome Sequencing* (WGS) untuk mengidentifikasi keberadaan gen *npr* yang mengkode protease netral yang stabil terhadap suhu. Gen *npr* kemudian dikloning ke dalam vektor *pET-SUMO* dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* BL21 (DE3) untuk ekspresi heterolog. Transformasi dikonfirmasi melalui PCR koloni, dan ekspresi protein diverifikasi menggunakan *SDS-PAGE*. Optimasi ekspresi dilakukan dengan memvariasikan suhu induksi, waktu, dan konsentrasi IPTG. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi tertinggi terjadi pada suhu 18°C dengan konsentrasi IPTG 0,1–0,9 mM. Namun, protein yang diekspresikan sebagian besar tidak larut dan terakumulasi dalam badan inklusi. Meskipun ekspresi berhasil, uji aktivitas enzimatis mengungkapkan bahwa protease rekombinan tidak menunjukkan aktivitas yang signifikan, kemungkinan disebabkan oleh kesalahan pelipatan atau pemotongan diri selama ekspresi. Temuan ini menyoroti potensi genomik *Geobacillus* sp. DS3 sebagai sumber protease yang stabil terhadap suhu dan menekankan perlunya optimasi lebih lanjut untuk mendapatkan enzim yang aktif secara fungsional.

Kata Kunci: *Geobacillus* sp. DS3, Protease Netral Termostabil, gen *npr*, Ekspresi Rekombinan, *E. coli* BL21 (DE3), Badan Inklusi, *Whole genome sequencing*.

ABSTRACT

Neutral proteases are essential biocatalysts widely used in the food industry due to their optimal activity at neutral pH. However, their industrial application is often limited by low thermal stability. In this study, the genome of *Geobacillus* sp. DS3, a thermophilic bacterium isolated from the Dieng Plateau, was analyzed through whole genome sequencing (WGS) to identify the presence of the *npr* gene encoding a thermostable neutral protease. The *npr* gene was then cloned into the pET-SUMO vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for heterologous expression. The transformation was confirmed by colony PCR, and protein expression was verified by SDS-PAGE. Expression optimization was performed by varying induction temperature, time, and IPTG concentration. The results showed that the highest expression occurred at 18°C with 0.1–0.9 mM IPTG. However, the expressed protein was mostly insoluble and accumulated in inclusion bodies. Despite successful expression, enzymatic activity assays revealed that the recombinant protease lacked significant activity, likely due to improper folding or self-cleavage during expression. These findings highlight the genomic potential of *Geobacillus* sp. DS3 as a source of thermostable protease and emphasize the need for further optimization to obtain a functionally active enzyme.

Keywords: *Geobacillus* sp. DS3, thermostable neutral protease, *npr* gene, recombinant expression, *E. coli* BL21 (DE3), inclusion body, whole genome sequencing.