

INTISARI

DNA polimerase famili B3 pada Archaea dikenal memiliki aktivitas eksonuklease 3'–5', stabilitas termal tinggi, serta toleransi terhadap kadar garam yang cukup tinggi. *Sulfurisphaera javensis* KD-1, arkea termoasidofilik yang diisolasi dari sumber air panas di Indonesia, memiliki gen penyandi DNA polimerase B3 berdasarkan hasil *Whole Genome Sequencing* (WGS). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan mengarakterisasi DNA polimerase B3 dari *S. javensis* melalui pendekatan terpadu secara komputasional dan eksperimental. Analisis sifat fisikokimia menunjukkan bahwa DNA polimerase B3 memiliki berat molekul sekitar 90,5 kDa dan indeks alifatik tinggi (95,66), yang mengindikasikan kestabilan termal yang baik. Prediksi struktur tiga dimensi menggunakan AlphaFold2 menunjukkan arsitektur khas PolB3 arkea yang konservatif dengan domain polimerase dan eksonuklease yang utuh. Pemodelan interaksi protein–ligan menggunakan AlphaFold3 menunjukkan terbentuknya kompleks enzim–substrat yang stabil dengan DNA, ATP, dan ion Mg^{2+} (pTM = 0,94), dengan interaksi kunci yang terlokalisasi pada domain palm. Gen penyandi DNA PolB3 berhasil dikloning ke dalam vektor pMAL-c6T dan pGEX-6P-1 pada sel inang *Escherichia coli* DH5 α , kemudian diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. Kondisi ekspresi optimal pada plasmid rekombinan pMAL-c6T diperoleh pada suhu 16 °C dengan induksi 0,05 mM IPTG selama 18 jam dan menghasilkan protein terlarut sebesar 0,01493 g/L. Sementara itu, plasmid rekombinan pGEX-6P-1 menunjukkan kondisi ekspresi optimal pada suhu 14 °C dengan induksi 0,1 mM IPTG selama 24 jam dan menghasilkan protein terlarut sebesar 0,0046 g/L. Aktivitas polimerase divalidasi melalui uji perpanjangan primer dan analisis berbasis qPCR pada suhu 65 °C. Secara keseluruhan, penelitian ini memberikan bukti eksperimental yang didukung pendekatan komputasional bahwa DNA PolB3 dari *S. javensis* merupakan enzim PolB3 fungsional yang berpotensi dimanfaatkan dalam aplikasi bioteknologi yang memerlukan enzim dengan fidelitas tinggi dan stabilitas termal.

Kata kunci : *Sulfurisphaera javensis* KD-1, DNA Polimerase B3, ekspresi heterolog, bioinformatika, dan *high fidelity*

ABSTRACT

DNA polymerase family B3 in Archaea is known to possess 3'–5' exonuclease activity, high thermal stability, and tolerance to relatively high salt concentrations. *Sulfurisphaera javensis* KD-1, a thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Indonesia, contains a gene encoding DNA polymerase B3 based on Whole Genome Sequencing (WGS) analysis. This study aimed to develop and characterize DNA polymerase B3 from *S. javensis* through an integrated computational and experimental approach. Physicochemical property analysis revealed that DNA polymerase B3 has a molecular weight of approximately 90.5 kDa and a high aliphatic index (95.66), indicating good thermal stability. Three-dimensional structure prediction using AlphaFold2 revealed a conserved archaeal PolB3 architecture with intact polymerase and exonuclease domains. Protein–ligand interaction modeling using AlphaFold3 demonstrated the formation of a stable enzyme–substrate complex with DNA, ATP, and Mg²⁺ ions (pTM = 0.94), with key interactions localized in the palm domain. The gene encoding DNA PolB3 was successfully cloned into the pMAL-c6T and pGEX-6P-1 vectors in *Escherichia coli* DH5α and subsequently expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. Optimal expression conditions for the recombinant pMAL-c6T plasmid were obtained at 16 °C with induction by 0.05 mM IPTG for 18 h, producing 0.01493 g/L of soluble protein. Meanwhile, the recombinant pGEX-6P-1 plasmid showed optimal expression at 14 °C with induction by 0.1 mM IPTG for 24 h, yielding 0.0046 g/L of soluble protein. Polymerase activity was validated through primer extension assays and qPCR-based analysis at 65 °C. Overall, this study provides experimental evidence supported by computational approaches that DNA PolB3 from *S. javensis* is a functional enzyme with potential applications in biotechnology requiring enzymes with high fidelity and thermal stability.

Keywords: *Sulfurisphaera javensis* KD-1; DNA polymerase B3; heterologous expression; bioinformatics; high fidelity.