

INTISARI

Carbonic anhydrase (CA) merupakan metaloenzim yang mengkatalisis reaksi reversibel hidrasi CO₂ menjadi HCO₃⁻ dan H⁺. Enzim ini berperan penting pada semua domain kehidupan untuk menyediakan substrat CO₂ maupun HCO₃⁻ bagi reaksi enzimatik di dalam sel. Penelitian pendahuluan mengenai ekspresi β-CA rekombinan dari *Chromohalobacter salexigens* BKL5 yang menggunakan vektor pET-28a pada sistem ekspresi *Escherichia coli* BL21(DE3) menunjukkan ekspresi β-CA rekombinan yang tinggi namun solubilitas yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan solubilitas β-CA rekombinan dengan menggunakan sistem ekspresi suhu rendah yang dilengkapi dengan ko-ekspresi molekul *chaperone* untuk membantu proses pelipatan protein rekombinan. Upaya tersebut dilakukan dengan mengganti vektor ekspresi dari pET ke pCold TF. pCold TF merupakan vektor ekspresi yang dilengkapi dengan *trigger factor* (TF) dan diaktivasi pada suhu rendah. *Open reading frame* (ORF) β-CA dari pET-βCA dipindahkan ke pCold TF dengan menggunakan enzim restriksi *NdeI* dan *HindIII*, kemudian disisipkan pada sisi yang sama di vektor pCold TF. Ekspresi dan uji solubilitas β-CA rekombinan menggunakan gel SDS-PAGE 12%. Aktivitas β-CA rekombinan diuji secara kualitatif menggunakan protonografi. Pada penelitian ini, penggunaan vektor ekspresi pCold TF mampu menghasilkan 83% dari β-CA rekombinan dalam bentuk larut. Uji aktivitas enzim menunjukkan aktivitas hidrasi CO₂ dari β-CA rekombinan. Hasil ini menjelaskan bahwa β-CA rekombinan dengan bantuan TF dapat menyebabkan pelipatan protein yang sempurna.

Kata kunci: β-carbonic anhydrase, *Chromohalobacter salexigens* BKL5, CO₂, HCO₃⁻, solubilitas protein rekombinan.

ABSTRACT

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme that catalyzes the reversible hydration of CO_2 to HCO_3^- and H^+ . This enzyme plays an important role in all life kingdoms to provide CO_2 and HCO_3^- substrates for enzymatic reactions in cells. Previous research on recombinant β -CA expression from *Chromohalobacter salexigens* BKL5 that used pET-28a vector in *Escherichia coli* BL21(DE3) expression system showed high recombinant β -CA expression but low solubility. This study aims to increase the solubility of recombinant β -CA by using a low-temperature expression system, complete with co-expression of molecular chaperone to assist the folding process of recombinant proteins. This effort was performed by replacing the expression vector from pET to pCold TF. The pCold TF is an expression vector that is complete with trigger factor (TF) and activated at low temperatures. Open reading frame (ORF) of β -CA from pET- β CA was transferred to pCold TF using *Nde*I and *Hind*III restriction enzymes, then inserted into the same site of pCold TF vector. The expression and solubility test of recombinant β -CA used 12% SDS-PAGE gel. Recombinant β -CA activity was analyzed qualitatively using protonography. In this study, the use of pCold TF expression vector was able to produce 83% of recombinant β -CA in soluble form. The enzymatic activity assay showed the CO_2 hydration activity of recombinant β -CA. These results indicate that the recombinant β -CA with the assistance of TF leads to complete protein folding.

Keywords: β -carbonic anhydrase, *Chromohalobacter salexigens* BKL5, CO_2 , HCO_3^- , solubility of recombinant protein.