

Ekspresi Enzim Rekombinan Reverse Transcriptase (RT Δ RNase H) *Simian Betaretrovirus* Serotipe-2 Asal *Macaca fascicularis* Indonesia dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli*

(Expression of Reverse Transcriptase (RT Δ RNase H) Recombinant Enzyme of Serotype-2 *Simian Betaretrovirus* Isolated from Indonesian *Macaca fascicularis* Using *Escherichia coli* Expression System)

Uus Saepuloh^{1*}, Diah Iskandriati¹, Joko Pamungkas^{1,2}, Dondin Sajuthi^{1,2}

ABSTRAK

Enzim *reverse transcriptase* (RT) merupakan salah satu reagen yang sangat penting dalam bidang biologi molekuler, yaitu untuk mensintesis DNA komplementer (cDNA) dari messenger RNA (mRNA). Kombinasi antara aktivitas RT dan amplifikasi PCR telah menjadi suatu *gold standard* dalam proses pengklonan daerah pengkode gen dari berbagai target yang diinginkan. Dengan demikian, enzim RT telah menjadi bagian penting dalam perkembangan biologi molekuler, genetik, dan biomedis. Tujuan dari penelitian ini ialah menghasilkan enzim rekombinan RT Δ RNase H *simian betaretrovirus* serotype-2 (SRV-2) yang diisolasi dari monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) asal Indonesia. Tahapan penelitian yang telah dilakukan ialah ekspresi gen penyandi RT SRV-2 menggunakan sistem ekspresi *Escherichia coli*, pemurnian, analisis hasil ekspresi, dan aplikasi pada teknik RT PCR. Hasil analisis ekspresi protein dengan teknik SDS PAGE menunjukkan ada pita protein spesifik berukuran sekitar 32,7 kDa yang kemungkinan merupakan pita RT SRV-2. Aplikasi enzim RT SRV-2 dalam teknik RT PCR berhasil mentranskripsi balik mRNA pada beberapa target gen, yaitu β -globin, virus CDV, dan *env* virus SRV-2. Hal ini menunjukkan bahwa enzim rekombinan RT SRV-2 berhasil dikembangkan dan menunjukkan aktivitas walaupun masih rendah dibandingkan enzim komersial.

Kata kunci: enzim rekombinan, *reverse transcriptase*, sistem ekspresi *escherichia coli*, SRV-2

ABSTRACT

Reverse transcriptase (RT) enzyme is a key tool in molecular biology for the synthesis of complementary DNA (cDNA) from messenger RNA (mRNA). Combining RT activity with PCR amplification has been a gold standard as the first step in cloning the coding region of any gene of interest. Evidently, RTs have been critical in advancing molecular biology, genetics and medicine to their current stage. In this study, we were developing the RT Δ RNase H recombinant enzyme isolated from serotype-2 *simian betaretrovirus*-2 (SRV-2) infected Indonesian *Macaca fascicularis* using *Escherichia coli* expression system. The study was conducted using RT SRV-2 gene expression using *E. coli* expression system, proteins purification, and application to RT PCR technique. The SDS PAGE expression analysis showed a specific band size of 32.7 kDa assumed as RT protein enzyme. Application of RT SRV-2 enzyme generated to the RT PCR technique of β -globin CDV and SRV-2 *env* gene target showed that the RT SRV-2 enzyme was capable to reverse transcribed mRNA into cDNA as indicated by the presence of specific DNA band compared with commercial RT enzymes. This RT SRV-2 enzyme showed its activity similar to that of commercial one, although the activity was lower.

Keywords: *escherichia coli* expression system, recombinant enzyme, *reverse transcriptase*, SRV-2

PENDAHULUAN

Selama beberapa dasawarsa terakhir, enzim *reverse transcriptase* (RT) menjadi salah satu reagen yang penting dalam bidang biologi molekuler, yaitu untuk sintesis DNA komplementer (cDNA) dari mRNA. Aplikasi enzim RT ini telah memberikan pemahaman yang luas mengenai sejumlah mekanisme regulator seluler. Selain itu, kombinasi antara aktivitas RT

dengan amplifikasi PCR telah menjadi suatu *gold standard* dalam proses pengklonan gen *coding region* dari berbagai sasaran gen yang diinginkan. Dengan demikian, enzim RT telah menjadi bagian penting dalam perkembangan biologi molekuler, genetik, dan biomedis (Hizi & Herschhorn 2007).

Gencarnya penelitian mengenai enzim RT dipicu oleh penemuan retrovirus manusia, yaitu *human immunodeficiency virus* (HIV) pada tahun 1980-an yang merupakan agen patogen penyebab terjadinya *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) pada manusia. Telah tersedianya informasi mengenai retrovirus dan RT sangat membantu dalam identifikasi dan penelitian mengenai agen patogen ini. Tingginya morbiditas dan mortalitas pada penderita HIV/AIDS mengharuskan ditemukannya agen antiretrovirus dan

¹ Pusat Studi Satwa Primata, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor, Jalan Lodaya II/5 Bogor 16151.

² Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

* Penulis korespondensi: E-mail: uussaepuloh@yahoo.com

enzim RT ini menjadi target utama untuk dihambat melalui penemuan senyawa anti-RT (Hizi & Herschhorn 2007). *Azidothymidine* (AZT atau *zidovudine*), merupakan salah satu senyawa yang efektif dalam menghambat aktivitas DNA polimerase dari enzim HIV-1 RT dan direkomendasikan sebagai antiretrovirus pertama dalam pengobatan HIV-1 sejak tahun 1987. Sejak saat itu, inhibitor RT menjadi komponen utama dalam kombinasi obat yang digunakan untuk memerangi HIV-1 (Kohlstaedt *et al.* 1992). Selain itu, penelitian mengenai sejumlah resistensi akibat mutasi pada obat HIV-1 RT telah banyak dicirikan dan dipelajari. Hal ini membuktikan bahwa sampai saat ini enzim RT menjadi salah satu enzim yang paling banyak dipelajari (Herschhorn & Hizi 2010).

Penelitian enzim RT terus berkembang tidak hanya terhadap virus HIV tetapi juga dari berbagai jenis virus lainnya dari famili *Retroviridae*. Tujuan penelitian tersebut selain untuk pencarian model virus dalam pengembangan anti RT HIV, juga untuk pemenuhan enzim rekombinan RT yang mempunyai aktivitas enzim tinggi. Berbagai jenis RT yang telah dipelajari antara lain berasal dari *molony murine leukemia virus* (MuLV), *mouse mammary tumour virus* (MMTV), *avian sarcoma and leukosis virus* (ASLV), *Mason-Pfizer monkey virus* (MPMV), *baboon endogenous virus* (BaEV), *feline immunodeficiency virus* (FIV), *human T lymphotropic virus* (HTLV), dan *simian immunodeficiency virus* (SIV) (Flint *et al.* 2009; Herschhorn & Hizi 2010).

Simian retrovirus (SRV-2) tergolong dalam famili *Retroviridae* dan genus *Betaretrovirus*. Virus ini umumnya secara alami menyerang populasi *Macaca* di Asia khususnya di Indonesia (Iskandriati *et al.* 2010). SRV merupakan patogen yang berbahaya yang dapat menyebabkan infeksi endemik bagi populasi primata dan sampai saat ini telah ditemukan tujuh serotipe dari SRV (Nandi *et al.* 2006; Philipp-Staheli *et al.* 2006; Lerche 2010). Virus ini dapat menyebabkan penyakit *simian acquired immunodeficiency syndrome* (SAIDS) yang menyerupai AIDS pada manusia. Penelitian terdahulu tentang SRV-2 telah berhasil mengidentifikasi genom SRV-2 isolat Washington dan diketahui memiliki 4 gen utama, yaitu *gag* (*group specific antigen*), *env* (*envelope*), *prt* (*protease*), dan *pol* (*polymerase*) (Marraci *et al.* 1995; Marraci *et al.* 1999). Gen *pol* diketahui menyandikan dua enzim penting yang berperan dalam proses replikasi retrovirus dalam inang, yaitu RT/RNase-H dan integrase. Hingga kini belum ada penelitian mengenai RT asal SRV-2 khususnya untuk isolat Indonesia. Adanya gen RT pada SRV-2 memungkinkan untuk dikembangkan menjadi enzim rekombinan RT asal SRV-2 isolat Indonesia.

Kegiatan penelitian yang dilakukan ini bertujuan mengembangkan enzim rekombinan RT yang diisolasi dari gen *pol* asal simian betaretrovirus serotype-2 (SRV-2). Virus ini merupakan salah satu retrovirus yang menyerang satwa primata genus *Macaca* dan

telah berhasil diisolasi dari *M. fascicularis* asal Indonesia. Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan dalam upaya pengembangan enzim rekombinan RT SRV-2 meliputi isolasi dan konstruksi gen pengkode RT SRV-2, kloning dan ekspresi gen pada sistem ekspresi *Escherichia coli*. Pada penelitian ini, tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai lanjutan dari penelitian awal, yaitu meliputi analisis ekspresi protein, pemurnian protein, ujian aktivitas enzim, dan aplikasi enzim pada teknik RT PCR. Dengan tersedianya enzim rekombinan RT SRV-2 ini diharapkan ketergantungan enzim sejenis dari produk-produk luar negeri akan berkurang dan mampu meningkatkan penelitian bidang biologi molekuler di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Perbanyak Stok *E. coli* BL21AI yang telah Disubkloning dengan pDEST17 yang Mengandung Gen Pengkode RT SRV-2

Enzim SRV-RT diekspresikan berdasarkan metode *E. coli Expression System with Gateway® Technology* dari Invitrogen. 1–5 µL pDEST17 yang telah disisipkan gen pengkode RTΔRNase H SRV-2 (RT 3284F–RT 4148R tanpa region RNase H) ditambahkan ke dalam vial berisi sel BL21-AI™ *One Shot®* lalu dicampurkan perlahan. Campuran diinkubasi dalam es selama 30 menit kemudian diberi perlakuan *heatshock* pada suhu 42 °C selama 30 detik. Campuran didinginkan dalam es sebelum ditambahkan 250 µL media SOC. Vial dikocok pada kecepatan 200 rpm pada suhu 37 °C selama 30 menit. Sebanyak 20 dan 100 µL campuran digoreskan pada medium padat LB agar dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil transformasi diamati setelah 24 jam, yang ditandai dengan munculnya koloni pada permukaan media. Sebanyak 5 koloni transforman ditumbuhkan dalam medium cair pada suhu 37 °C hingga OD₆₀₀ mencapai 0,6–1,0. Sebanyak 1:20 kultur awal diambil kemudian ditumbuhkan kembali dalam medium cair selama 3 jam agar mencapai fase log. Kultur dipisah menjadi 2 (kultur terinduksi dan takterinduksi) kemudian ditambahkan 0,2% L arabinosa ke dalam salah satu kultur (kultur terinduksi) dan diinkubasi selama 3 jam. Hasil inkubasi kultur terinduksi dan takterinduksi diambil untuk disentrifugasi selama 30 detik kemudian dibekukan pada suhu -20 °C untuk selanjutnya dipurifikasi.

Pemurnian Enzim Rekombinan RT SRV-2

Setelah diperoleh hasil ekspresi yang diinginkan dengan terbentuknya rekombinan enzim RT SRV-2, langkah selanjutnya ialah memurnikan protein tersebut. Pemurnian dimaksudkan untuk memperoleh protein rekombinan murni yang terbebas dari kemungkinan pengotor dari sisa media pertumbuhan sel maupun protein-protein sampingan dari *E. coli*. Pemurnian dilakukan menggunakan sistem pemurnian Ni²⁺-NTA yang mengandung resin pengikat

logam yang bereaksi dengan protein 6xHis. Protein rekombinan yang diinginkan dilepaskan menggunakan bufer yang mengandung imidazol dengan konsentrasi bertingkat. Diharapkan akan diperoleh hasil berupa rekombinan protein murni, yaitu RT SRV-2.

Pelet sel *E. coli* dilarutkan dalam 1 mL bufer B (8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris·Cl; pH 8,0), dan diinkubasi sambil digoyang selama 1 jam pada kondisi suhu ruang. Campuran selanjutnya disentrifugasi selama 20–30 menit dengan kecepatan 10.000 g pada kondisi suhu ruang, selanjutnya supernatan dikumpulkan. Kolom Ni²⁺-NTA yang telah dikondisikan dengan 600 ul bufer B dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 700 g. Sebanyak 600 µL supernatan dimasukkan ke dalam spin kolom tersebut dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 700 g. Eluat hasil sentrifugasi tersebut selanjutnya ditampung. Spin kolom selanjutnya dicuci dengan 600 µL bufer C (8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris·Cl; pH 6,3) dan disentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 2 menit, tahap tersebut diulang selama 2 kali. Selanjutnya dilakukan elusi dengan 200 bufer E (8 M urea; 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris·Cl; pH 4,5) dan eluat ditampung untuk dianalisis.

Analisis Ekspresi Protein

Jumlah protein dihitung menggunakan uji *bicinchoninic acid* (BCA) dengan standar *bovine serum albumin* (BSA). SDS-PAGE dibuat *gradient gel* dengan konsentrasi 7,5–17,5% dan *stacking gel* dengan konsentrasi 4%. Protein yang telah ditambahi bufer sampel dimasukan ke dalam gel dan elektroforesis dijalankan pada tegangan 150 V selama 1 jam dan kemudian diwarnai dengan pewarna *coomasie brilliant blue*. Pita yang dihasilkan dibandingkan dengan marker *restained molecular standard kaleidoscope* (Biorad).

Hasil elektroforesis SDS-PAGE ditransfer pada membran nitroselulosa dalam bufer transfer pada tegangan 100 V selama 1 jam dengan kondisi dingin. Setelah selesai, membran diblok dengan menggunakan *Blotto* lalu diinkubasi pada suhu 4 °C selama 1 jam. Membran kemudian dicuci menggunakan ddH₂O. Antibodi SRV-2 (-) digunakan sebagai kontrol negatif, dan antibodi SRV-2 (+) digunakan untuk mendeteksi protein target sebelum diinkubasi semalaman. Kedua antibodi didapat dari serum darah *Macaca* baik yang terinfeksi maupun takterinfeksi SRV-2. Konjugat dimasukkan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Dilakukan proses pencucian menggunakan ddH₂O sebanyak 3 kali setiap 5 menit kemudian ditambahkan substrat berupa BCIP (*bromo chloro indolyl phosphat*) dan *nitrotetrazolium blue* yang dicampur di dalam bufer AP lalu diinkubasi selama 20 menit. Hasil inkubasi dicuci menggunakan ddH₂O kemudian diamati.

Aplikasi Enzim Rekombinan RT asal SRV-2 pada Teknik Reverse Transcriptase PCR

Aktivitas enzim rekombinan *reverse transcriptase* SRV-2 dilakukan dengan mengaplikasikannya pada

teknik RT PCR. Enzim digunakan untuk mentranskripsi balik (*reverse transcription*) mRNA yang diisolasi dari sampel *M. nemestrina* menjadi cDNA. cDNA yang diperoleh selanjutnya diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik untuk β-globin dan GAPDH sebagai *house keeping gene*. Proses reverse transkripsi dilakukan dalam mesin PCR dengan menginkubasi sampel pada suhu 50 °C selama 60 menit dan dilanjutkan dengan suhu 70 °C selama 15 menit. Sementara itu, proses PCR untuk gen β-globin dilakukan pada suhu 95 °C selama 10 menit untuk pre PCR, 94 °C selama 30 detik, 62 °C selama 30 detik, dan 72 °C selama 30 detik. Setiap siklus diulang selama 40 siklus. Hasil PCR selanjutnya dijalankan dalam elektroforesis agarose 1,8% dan divisualisasi dengan mesin GelDoc.

Enzim rekombinan RT SRV-2 juga diaplikasikan pada sampel-sampel yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi PSSP LPPM IPB dalam uji RT PCR, yaitu terhadap uji virus RNA SRV-2 *Canine distemper virus* (CDV). cDNA yang terbentuk diamplifikasi menggunakan metode *nested-PCR* menggunakan pereaksi PCR primer *forward* dan *reverse*, MgCl₂, dNTP, 5x PCR Bufer, Platinum Taq, dan *Nuclease Free Water*. Tahapan amplifikasi untuk CDV ialah denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik; *annealing* pada suhu 54 °C selama 30 detik; dan elongasi pada suhu 72 °C selama 1 menit, siklus diulang sebanyak 40 kali. Setelah proses amplifikasi selesai, dilakukan proses visualisasi produk PCR dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 1,8% yang mengandung etidium bromida 0,1 µg/mL. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan listrik 100 V selama 45 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi menggunakan *Gel Doc*. Dalam aplikasinya enzim rekombinan tersebut dibandingkan dengan enzim komersial sejenis dari produk luar negeri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, RT asal simian betaretrovirus-2 yang dipilih untuk diisolasi dari gen pol terletak pada sekuen ke 3284–4148. Sekuen ini merupakan sekuen *reverse transcriptase* tanpa sekuen RNase H (RTΔRNase H). Reverse transcriptase H- memiliki aktivitas yang lebih baik untuk mensintesis cDNA berukuran panjang bila dibandingkan dengan *reverse transcriptase* H+ (Polumuri *et al.* 2002). Hasil isolasi dan rekombinasi yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya diekspresikan menggunakan sistem ekspresi *E. coli*. Plasmid rekombinan ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL-21 AI dan L-arabinosa digunakan sebagai induktor sistem ekspresi. *E. coli* BL-21 AI merupakan mutan *E. coli* dengan promotor P_{BAD} yang berfungsi dalam meregulasi promotor T7 dalam plasmid rekombinan dengan bantuan L-Ara. Galur ini juga bersifat lebih resisten terhadap toksisitas produk hasil ekspresi. Pada saat tahapan ekspresi, pembagian kultur menjadi kultur tak-

terinduksi tidak dilakukan, karena menurut *Chen et al.* (2009) absennya *L-arabinosa* hanya berpengaruh pada konsentrasi protein yang diekspresikan, tidak berpengaruh pada absen atau tidaknya produk yang dihasilkan.

Menggunakan metode yang telah dijelaskan, RT Δ RNase H SRV-2 berhasil dipurifikasi menggunakan Ni²⁺-NTA *spin column*. Hasil ekspresi berupa His6-tag RT Δ RNase H SRV-2 berikatan dengan ion Ni²⁺ dengan afinitas tinggi. Asam nitrilotriasetat (NTA) berfungsi sebagai agen pengkelat yang memobilisasi nikel sehingga saat dielusi, imidazola akan berkompetisi dengan His6-tag RT Δ RNase H SRV-2 sehingga dapat dipurifikasi. Protein yang telah terpurifikasi dihitung konsentrasinya menggunakan uji BCA dan diperoleh hasil seperti yang tercantum pada Tabel 1. Pada saat protein belum dimurnikan, masih banyak protein-protein kasar lainnya yang tercampur dengan protein target sehingga konsentrasi protein pada fase sebelum dimurnikan menunjukkan angka yang sangat besar. Konsentrasi protein pada setiap fase diseragamkan ke konsentrasi 300 mg/mL untuk analisis SDS-PAGE.

Hasil analisis SDS-PAGE pasca purifikasi (Gambar 1) menunjukkan hasil seperti yang diharapkan. Hasil analisis bobot molekul berupa 288 asam amino dan enam histidin yang dihitung menggunakan perangkat lunak pada situs <http://www.changbioscience.com/genetics/mw> menghasilkan bobot molekul RT Δ RNase H SRV-2 sebesar 32,70 kDa sesuai dengan penampakan pita protein hasil induksi menggunakan L-ara pada daerah di atas marker molekuler 30,7 kDa. Berdasarkan ketebalan pita, RT Δ RNase H SRV-2 memiliki konsentrasi yang tinggi pada fase supernatan yang tidak dimurnikan, selanjutnya sebagian kecil RT SRV-2 tercuci pada setiap fase sehingga pada fase elusi, keberadaan pita target terlihat lebih tipis.

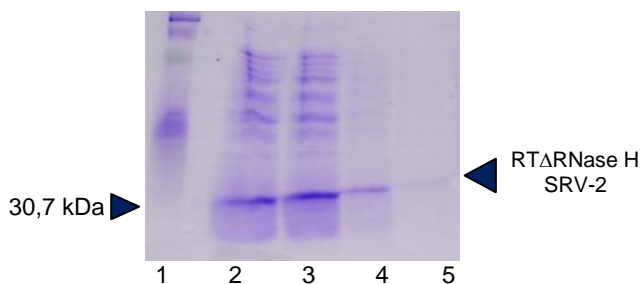
Tabel 1 Hasil penentuan konsentrasi protein rekombinan RT Δ RNase H SRV-2 dengan uji BCA

Fase purifikasi	Konsentrasi protein (ug/ml)
Supernatan	2760
Pengikatan	2280
Pencucian tahap 1	578
Pencucian tahap 2	186
Elusi tahap 1	303
Elusi tahap 2	312

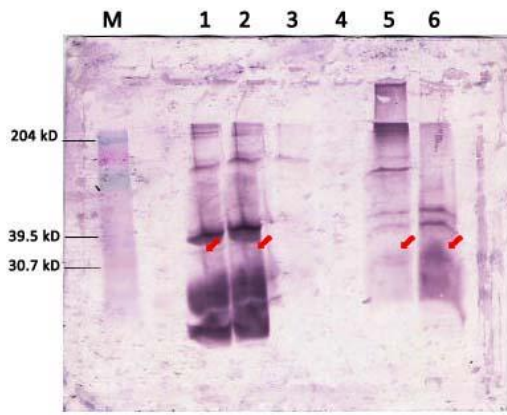
Hasil yang didapat pada analisis Western Blot (Gambar 2) tidak terlalu baik akibat antibodi yang digunakan bukan merupakan antibodi murni yang bekerja spesifik terhadap protein hasil ekspresi. Antibodi yang digunakan diambil dari serum darah *Macaca* sehingga masih banyak protein-protein lain yang ikut terbawa pada serum ini seperti antibodi terhadap bakteri *E. coli*. Penggunaan anti-histidin dapat menjadi solusi untuk memperoleh hasil uji yang lebih bersih dan spesifik. Terlepas dari banyaknya pengotor, hasil analisis kontrol positif menunjukkan keberadaan pita target pada ukuran yang sesuai yang tidak tampak pada kontrol negatif.

Aktivitas enzim rekombinan RT Δ RNase H SRV-2 dianalisis dengan mengaplikasikannya pada teknik RT PCR. Sebagai pembanding digunakan enzim RT komersial produk luar negeri, yaitu Superscript III RT (Invitrogen). Dari uji aktivitas awal ini terlihat enzim RT SRV-2 mempunyai aktivitas yang sama dengan produk komersial dilihat dari kemampuan mentranskripsi balik mRNA menjadi cDNA yang selanjutnya diamplifikasi terhadap target β -globin (Gambar 3).

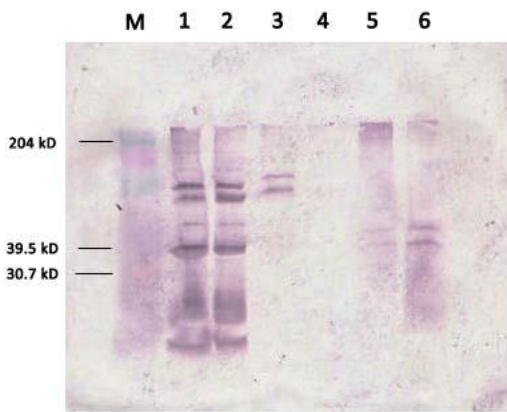
Aplikasi enzim rekombinan RT Δ RNase H SRV-2 pada teknik RT PCR juga dilakukan terhadap target gen yang lain, yaitu terhadap virus RNA *canine distemper virus* (CDV) dan *simian betaretrovirus* serotipe-2. Dari hasil aplikasi pada teknik RT PCR tersebut terlihat enzim rekombinan RT SRV-2 dari berbagai fase pemurnian berhasil dalam mentranskripsi balik mRNA menjadi cDNA. Hal ini ditunjukkan oleh pita ampikon berukuran 206 bp untuk SRV-2 dan 418 bp untuk CDV (Gambar 4). Hasil tersebut menunjukkan kesamaan dengan enzim RT komersial secara kualitatif walaupun pita yang dihasilkan terlihat lebih tipis yang menandakan aktivitas dari SRV-RT masih belum optimum. RT Δ RNase H SRV-2 yang didapat pada tahap elusi bekerja lebih baik dengan aktivitas yang tinggi bila dibandingkan dengan fase-fase pemurnian lainnya.



Gambar 1 Hasil elektroforesis SDS PAGE terhadap sampel protein rekombinan RT SRV-2, (1) protein marker, (2) prapemurnian, (3) bufer pengikat, (4) bufer pencuci, dan (5) bufer elusi.

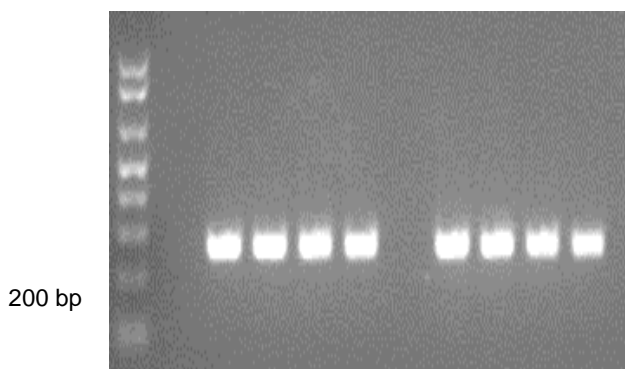


(a)

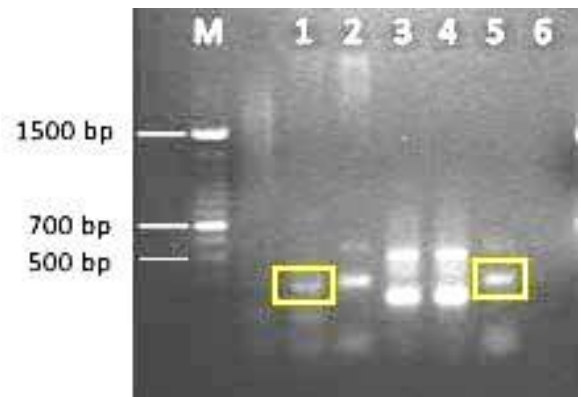


(b)

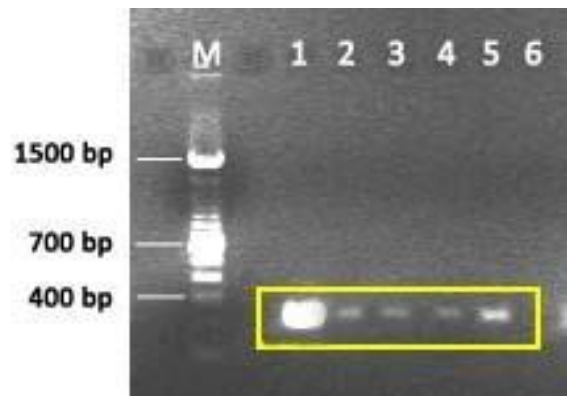
Gambar 2 Analisis Western Blot pasca-purifikasi SRV-RT dengan antibodi positif SRV (a) dan antibodi negatif SRV (b). Hasil purifikasi dianalisis menggunakan gradient gel 7,5–15% dengan konsentrasi protein 300 mg/ml. M: Kaleidoscope Prestain Standard (Bio-Rad); 1: supernatan; 2: fase binding; 3: fase pencucian ke-1; 4: fase pencucian ke-2; 5: fase elusi ke-1; 6: fase elusi ke-2. Pita target sebesar 32,70 kDa ditunjukkan oleh tanda panah.



Gambar 3 Hasil uji 2-langkah RT PCR menggunakan RT SRV-2 yang dibandingkan dengan enzim RT komersial Superscrip III *Reverse transcriptase* (SSIII, Invitrogen®). Gen target yang diamplifikasi adalah gen β -globin dengan mRNA sampel asal *M. nemestrina*.



(a)



(b)

Gambar 4 Aktivitas enzimatik dari RT-SRV-2 yang telah dipurifikasi menggunakan sampel RNA CDV menghasilkan pita berukuran 418 bp (a) dan RNA SRV-2 menghasilkan pita sebesar 206 bp (b). Sebagai kontrol positif digunakan SSTIII Invitrogen komersial, sedangkan untuk kontrol negatif, reaksi dilakukan tanpa sampel RNA. M: Marker 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1: kontrol positif; 2: fase binding; 3: fase pencucian ke-1; 4: fase pencucian ke-2; 5: fase elusi ke-1; 6: kontrol negatif.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini, enzim rekombinan RT Δ RNase H SRV-2 berhasil diekspresikan, dipurifikasi, diuji aktivitasnya, dan diaplikasikan terhadap teknik RT PCR. Enzim rekombinan tersebut juga terbukti memiliki aktivitas yang serupa dengan enzim RT komersial walaupun masih memiliki aktivitas yang lebih rendah. Aplikasi enzim rekombinan RT Δ RNase H SRV-2 terhadap teknik RT-PCR telah berhasil mentranskripsi balik mRNA menjadi cDNA terhadap *house keeping gene* β -globin. Selain itu, telah berhasil pula mentranskripsi balik sampel RNA menjadi cDNA asal virus CDV dan SRV-2. Perlu dilakukan perbandingan dan pemekatan enzim rekombinan yang dihasilkan untuk menghasilkan produk dengan aktivitas enzim yang lebih tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui proyek Penelitian Unggulan IPB tahun 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen Y, Xu W, Sun Q. 2009. A novel and simple method for high-level production of reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) in *Eschericia coli*. *Biotechnol Lett*. 31: 1051–1057.
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. 2009. *Principle of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington DC (US): ASM Pr.
- Herschhorn A, Hizi A. 2010. Retroviral reverse transcriptase. *Cell Mol Life Sci*. 67(16): 2717–2747.
- Hizi A, Herschhorn A. 2007. Retroviral reverse transcriptases (other than those of HIV-1 and murine leukemia virus): A comparison of their molecular and biochemical properties. *Virus Res*. 134(1–2): 203–220.
- Iskandriati D, Saepuloh U, Mariya S, Grant RF, Solihin DD, Sajuthi D, Pamungkas J. 2010. Isolation and characterization of simian retrovirus type D from *Macaca fascicularis* and *M. nemestrina* in Indonesia. *Microbiol Indones*. 4(3): 132–136.
- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. 256(5065): 1783–1790.
- Lerche NW. 2010. Simian retroviruses: Infection and disease-implications for immunotoxicology research in primates. *J Immunotoxicol*. 7(2): 93–101.
- Marracci GH, Kelley RD, Pilcher KY, Crabtree L, Shiigi SM, Avery N, Leo G, Webb MC, Hallick LM, Axthelm MK. 1995. Simian AIDS type D serogroup 2 retrovirus: isolation of an infectious molecular clone and sequence analyses of its envelope glycoprotein gene and 3' long terminal repeat. *J Virol*. 69(4): 2621–2628.
- Marracci GH, Avery NA, Shiigi SM, Couch G, Palmer H, Pilcher KY, Nichols H, Hallick LM, Axthelm MK, Machida CA. 1999. Molecular cloning and cell-specific growth characterization of polymorphic variants of type D serogroup 2 simian retroviruses. *Viol*. 261(1): 43–58.
- Nandi JS, Van DS, Chhangani AK, Mohnot SM. 2006. New simian β retroviruses from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) and langurs (*Semnopithecus entellus*) from Rajasthan, India. *Virus Genes*. 33(1): 107–116.
- Philipp-Staheli J, Marquardt T, Thouless ME, Bruce AG, Grant RF, Tsai CC, Rose TM. 2006. Genetic variability of the envelope gene of Type D simian retrovirus-2 (SRV-2) subtypes associated with SAIDS-related retroperitoneal fibromatosis in different macaque species. *Viol J*. 3: 11–25.
- Polumuri SK, Ruknudin A, Schulze DH. 2002. RNase H and its effects on PCR. *Biotechniques*. 32(6): 1224–1225.