

Codon Optimized MMLV Reverse Transcriptase Expression and Functional Evaluation in *Escherichia coli*

Elsa Alfiyanti¹, Andani Eka Putra^{2*}, Rita Maliza³, Alponsin⁴

¹Program Magister Ilmu Biomedis, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, Indonesia;

⁴Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi (PDRPI), Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Jl. Perintis Kemerdekaan, Jati, Padang 25129, Sumatera Barat, Indonesia;

Article History

Received : July 03th, 2026

Revised : July 17th, 2026

Accepted : July 22th, 2026

*Corresponding Author:

Andani Eka Putra,
Departemen Mikrobiologi,
Fakultas Kedokteran,
Universitas Andalas, Padang,
Sumatera Barat, Indonesia;
Email:
andani1508@med.unand.ac.id

Abstract: Dependence on imported reverse transcriptase (RT) enzymes remains a challenge for the development of molecular diagnostic reagents, particularly in developing countries. This study aimed to design, express, purify, and functionally evaluate a recombinant Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (MMLV-RT) as a candidate locally produced molecular biology reagent. A codon-optimized synthetic MMLV-RT gene was cloned into the pET-21a(+) expression vector and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). Recombinant protein expression was induced using IPTG, followed by purification using Ni²⁺-NTA affinity chromatography and characterization using SDS-PAGE. Functional activity of the recombinant enzyme was evaluated through reverse transcription of RNA templates followed by conventional PCR amplification. The optimized MMLV-RT gene was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3), producing a recombinant protein band at approximately 55.4 kDa. The highest protein yield was obtained after overnight induction, reaching 3.385 mg/mL. Purification resulted in a dominant protein band corresponding to the expected molecular weight of MMLV-RT. Functional evaluation demonstrated that recombinant MMLV-RT successfully generated specific PCR amplicons with performance comparable to commercial reverse transcriptase without detectable non-specific amplification. These findings indicate that recombinant MMLV-RT produced in *E. coli* BL21 (DE3) retains functional reverse transcriptase activity and has potential for further development as an alternative locally produced reagent for molecular diagnostic applications.

Keywords: Codon optimization; *Escherichia coli*; MMLV reverse transcriptase; Recombinant protein expression; RT-PCR.

Pendahuluan

Bioteknologi molekuler berperan penting dalam sistem kesehatan modern, penelitian biomedis, dan diagnostik penyakit infeksi melalui deteksi patogen yang cepat, sensitif, dan spesifik. Namun, pengembangan bioteknologi di Indonesia masih terkendala oleh tingginya ketergantungan pada reagen molekuler impor, yang meningkatkan biaya serta kerentanan terhadap gangguan rantai pasok global, seperti yang terjadi selama pandemi COVID-19 (El

Zowalaty et al., 2020; Tahamtan & Ardebili, 2020). Oleh karena itu, pengembangan reagen bioteknologi yang dapat diproduksi secara lokal menjadi strategi penting untuk mendukung kemandirian nasional di bidang diagnostik molekuler.

Salah satu komponen utama dalam teknologi diagnostik berbasis RNA adalah *reverse transcriptase* (RT), yaitu enzim yang mengkatalisis sintesis DNA komplementer (*complementary DNA/cDNA*) dari cetakan RNA melalui aktivitas *RNA-dependent DNA*

polymerase. Enzim ini merupakan komponen esensial dalam berbagai aplikasi biologi molekuler, seperti *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR), analisis ekspresi gen, *RNA sequencing*, dan diagnostik penyakit berbasis RNA (Green & Sambrook, 2012; Suhandono et al., 2022). Penggunaan RT-PCR sebagai metode baku (*gold standard*) untuk deteksi virus RNA selama pandemi COVID-19 semakin menegaskan pentingnya ketersediaan enzim RT yang memiliki aktivitas tinggi, stabilitas yang baik, dan kualitas yang konsisten (Corman et al., 2020; Tahamtan & Ardebili, 2020).

Di antara berbagai jenis *reverse transcriptase*, *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase* (MMLV-RT) merupakan salah satu enzim yang paling banyak digunakan karena memiliki efisiensi sintesis cDNA yang tinggi, fidelitas yang baik, serta kompatibel dengan berbagai aplikasi diagnostik dan penelitian molekuler. Berbagai modifikasi melalui rekayasa protein telah dilakukan untuk meningkatkan stabilitas termal, prosesivitas, dan efisiensi sintesis cDNA sehingga memperluas aplikasinya dalam diagnostik molekuler dan bioteknologi (Arezi & Hogrefe, 2009; Oscorbin et al., 2021). Oleh karena itu, pengembangan MMLV-RT rekombinan menjadi pendekatan yang prospektif untuk menghasilkan sumber enzim alternatif yang dapat diproduksi secara mandiri.

Produksi MMLV-RT rekombinan umumnya dilakukan menggunakan sistem ekspresi heterolog *Escherichia coli*, karena organisme ini memiliki laju pertumbuhan yang cepat, biaya produksi relatif rendah, serta sistem ekspresi gen yang telah terkarakterisasi dengan baik (Tungekar et al., 2021). Sistem ekspresi berbasis vektor pET pada *E. coli* BL21(DE3) banyak digunakan karena promotor T7 mampu menghasilkan ekspresi protein target yang tinggi dan terkontrol (Mital et al., 2021; Rosano et al., 2019). Akan tetapi, ekspresi gen heterolog masih menghadapi kendala berupa perbedaan preferensi penggunaan kodon (*codon usage bias*) antara organisme asal dan organisme inang. Ketidakesesuaian tersebut dapat menurunkan efisiensi translasi, menyebabkan akumulasi protein tidak larut, dan mengurangi hasil produksi protein rekombinan.

Optimasi kodon merupakan strategi yang efektif untuk meningkatkan efisiensi ekspresi protein tanpa mengubah urutan asam amino. Gen

MMLV-RT yang telah dioptimasi kodonnya dilaporkan dapat diekspresikan pada *Escherichia coli* dengan tetap mempertahankan aktivitas *reverse transcriptase* (Nuryana et al., 2022). Selain itu, optimasi kodon dan rekayasa MMLV-RT terbukti meningkatkan efisiensi ekspresi, stabilitas, dan performa enzim pada berbagai aplikasi biologi molekuler (Arezi & Hogrefe, 2009; Ellefson et al., 2016; Oscorbin et al., 2021). Namun, sebagian besar penelitian masih berfokus pada konstruksi gen atau ekspresi protein secara terpisah. Penelitian yang mengintegrasikan desain gen sintetik hasil optimasi kodon, ekspresi menggunakan sistem pET-21a(+)/*E. coli* BL21(DE3), pemurnian protein rekombinan, dan verifikasi aktivitas enzim melalui RT-PCR konvensional masih terbatas, khususnya untuk mendukung pengembangan reagen diagnostik molekuler yang dapat diproduksi secara lokal.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan mendesain gen sintetik MMLV-RT yang telah dioptimasi kodonnya, mengekspresikannya pada *Escherichia coli* BL21(DE3), mengevaluasi produksi dan pemurnian protein rekombinan, serta menguji aktivitas biologis enzim melalui aplikasi RT-PCR konvensional. Kebaruan penelitian ini terletak pada integrasi proses desain gen sintetik berbasis optimasi kodon, produksi protein rekombinan, pemurnian, dan validasi aktivitas enzim dalam satu alur pengembangan reagen molekuler. Hasil penelitian diharapkan menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan MMLV-RT rekombinan sebagai alternatif reagen diagnostik molekuler yang diproduksi secara lokal, sehingga dapat mendukung kemandirian industri bioteknologi dan memperkuat kapasitas nasional dalam bidang diagnostik berbasis RNA.

Bahan dan Metode

Desain Gen, Optimasi Kodon, dan Konstruksi Plasmid Rekombinan

Gen sintetik *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) berukuran 1.512 bp dirancang berdasarkan sekuens gen target dan dioptimasi menggunakan perangkat lunak GenSmart (GenScript, USA) untuk meningkatkan kesesuaian ekspresi pada *Escherichia coli*. Optimasi dilakukan dengan mempertimbangkan preferensi penggunaan kodon, kandungan GC, stabilitas mRNA, serta kemungkinan pembentukan struktur sekunder.

Gen hasil optimasi kemudian dikloning ke dalam vektor ekspresi pET-21a(+) menggunakan situs restriksi NdeI dan XhoI di bawah regulasi promoter T7.

Plasmid rekombinan pET-21a(+)-MMLV-RT ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α menggunakan metode heat shock. Sebanyak 2 μ L plasmid ditambahkan ke dalam 50 μ L sel kompeten, kemudian dilakukan perlakuan heat shock pada suhu 42°C selama 30 detik. Sel hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB agar yang mengandung ampicilin (100 μ g/mL) untuk seleksi koloni transforman.

Verifikasi Plasmid Rekombinan

Konfirmasi keberadaan gen MMLV-RT dilakukan menggunakan metode colony PCR dengan primer T7 promoter dan T7 terminator. Produk PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1,5%. Plasmid dari koloni positif kemudian diisolasi menggunakan kit isolasi plasmid dan dikonfirmasi berdasarkan kualitas DNA menggunakan spektrofotometer NanoDrop.

Ekspresi Protein Rekombinan MMLV-RT

Plasmid rekombinan yang telah terkonfirmasi kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3) untuk ekspresi protein. Kultur bakteri ditumbuhkan dalam media LB cair yang mengandung ampicilin (100 μ g/mL) hingga mencapai fase pertumbuhan eksponensial (OD₆₀₀ 0,4–0,6). Ekspresi protein diinduksi menggunakan IPTG dengan konsentrasi 1 mM dan diinkubasi selama 16 jam. Setelah proses induksi, sel dipanen melalui sentrifugasi dan disimpan pada suhu –20°C sebelum proses ekstraksi protein.

Purifikasi dan Analisis Protein Rekombinan

Protein rekombinan MMLV-RT dipurifikasi menggunakan sistem afinitas berbasis Ni²⁺ melalui MagneHis™ Protein Purification System. Analisis ekspresi dan kemurnian protein dilakukan menggunakan metode SDS-PAGE pada gel Bolt™ 4–12% Bis-Tris Plus yang kemudian diwarnai menggunakan Coomassie Brilliant Blue. Konsentrasi protein hasil purifikasi diukur menggunakan spektrofotometer NanoDrop pada panjang gelombang 280 nm.

Uji Aktivitas Enzim Reverse Transcriptase

Aktivitas biologis enzim rekombinan MMLV-RT dievaluasi berdasarkan

kemampuannya dalam mensintesis cDNA dari cetakan RNA SARS-CoV-2. Sintesis cDNA dilakukan menggunakan 1 μ g RNA dengan komponen reaksi yang terdiri atas primer oligo(dT), dNTP, Rnase inhibitor, dan enzim MMLV-RT rekombinan dalam volume reaksi 20 μ L. Reaksi transkripsi balik dilakukan pada suhu 37°C selama 60 menit dan dilanjutkan dengan inaktivasi enzim pada suhu 70°C selama 10 menit.

Produk cDNA kemudian digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi PCR konvensional menggunakan primer spesifik SARS-CoV-2 dan GoTaq® Green Master Mix. Amplifikasi dilakukan selama 40 siklus dengan suhu annealing 55°C, kemudian produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5%.

Tabel 2. SARS-CoV-2 Primers

Sequences 5'-3'	
SARS-CoV-2 (Forward)	CGCAATTACACACAGAC
SARS-CoV-2 (Reverse)	GTTCTTTATGCTAGCCACT

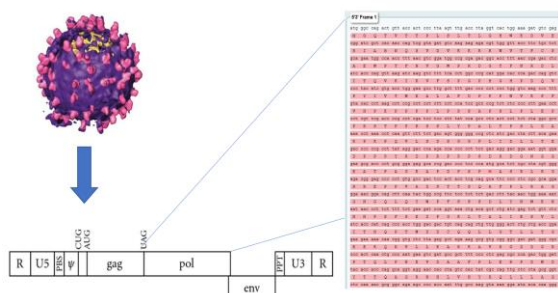
Hasil dan Pembahasan

Desain Gen Sintetik, Optimasi Kodon, dan Konfirmasi Transformasi

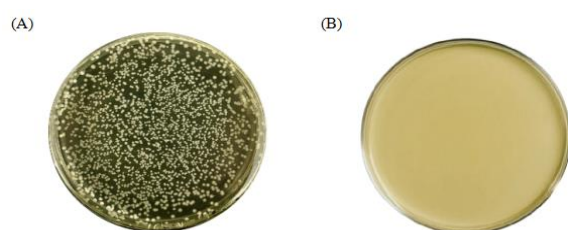
Gen sintetik *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) dirancang melalui pendekatan optimasi kodon untuk meningkatkan kompatibilitas ekspresi pada *Escherichia coli*. Hasil optimasi menunjukkan nilai Codon Adaptation Index (CAI) sebesar 0,73 dengan kandungan GC sebesar 57,14%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa sekuens gen hasil optimasi memiliki kesesuaian yang baik terhadap sistem translasi *E. coli*. Analisis perbandingan sekuens menunjukkan tingkat identitas nukleotida sebesar 72,18% antara gen asli dan gen hasil optimasi, tanpa menyebabkan perubahan urutan asam amino berdasarkan analisis BLASTx. (Gambar 1).

Gen MMLV-RT hasil optimasi kemudian dikloning ke dalam vektor ekspresi pET-21a(+) dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α untuk propagasi plasmid. Koloni transforman berhasil tumbuh pada media selektif LB agar yang mengandung ampicilin 100 μ g/mL, sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan pertumbuhan koloni. Hal tersebut menunjukkan

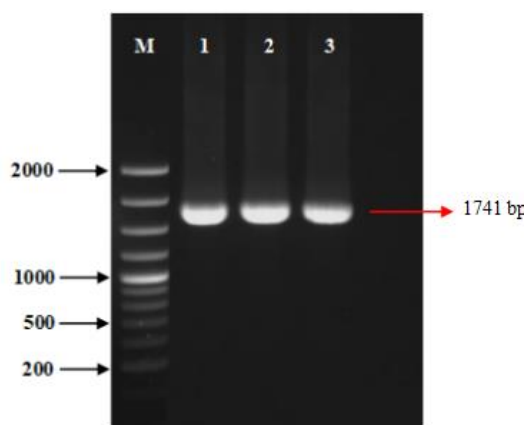
keberhasilan proses transformasi dan seleksi plasmid rekombinan.



Gambar 1. Ilustrasi wilayah gen *pol* dari genom MMLV dan ORF dari konstruksi gen sintetik MMLV-RT.



Gambar 2. Hasil transformasi *Escherichia coli* DH5 α pada media selektif LB agar yang mengandung ampisilin 100 μ g/mL. (A) Koloni transforman yang membawa plasmid rekombinan pET-21a(+)-MMLV-RT; (B) Kontrol negatif *E. coli* DH5 α .



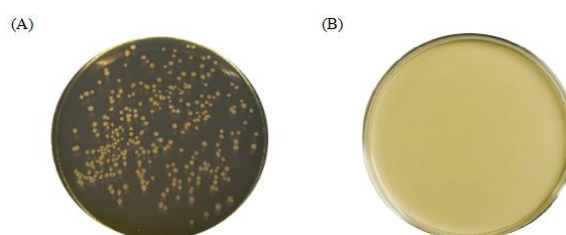
Gambar 3. Hasil PCR konfirmasi DNA plasmid hasil isolasi dan verifikasi gen MMLV-RT. M menunjukkan marker DNA 1 kb; sumur 1–3 menunjukkan isolat DNA plasmid terpilih yang dianalisis

Konfirmasi keberadaan gen MMLV-RT dilakukan menggunakan colony PCR dengan primer T7 promoter dan T7 terminator. Hasil amplifikasi menunjukkan pita DNA berukuran sekitar 1714 bp yang sesuai dengan ukuran gen target. Plasmid hasil isolasi menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 19,5 ng/ μ L dengan rasio A260/A280 sebesar 1,91, yang

menunjukkan kualitas DNA yang memadai untuk tahap ekspresi protein.

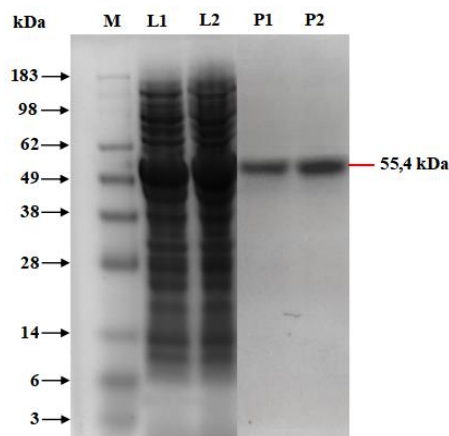
Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan MMLV-RT

Plasmid rekombinan pET-21a(+)-MMLV-RT yang telah dikonfirmasi kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* BL21(DE3) untuk ekspresi protein. Keberhasilan transformasi ditunjukkan melalui pertumbuhan koloni pada media selektif yang mengandung ampisilin.



Gambar 4. Hasil transformasi *Escherichia coli* BL21(DE3) pada media selektif LB agar yang mengandung ampisilin 100 μ g/mL. (A) Koloni transforman yang membawa plasmid rekombinan pET-21a(+)-MMLV-RT; (B) Kontrol negatif *E. coli* BL21(DE3).

Ekspresi protein dilakukan menggunakan sistem promotor T7 dengan induksi IPTG 1 mM selama 16 jam. Analisis SDS-PAGE terhadap fraksi lisat sel menunjukkan adanya pita protein spesifik dengan ukuran sekitar 55,4 kDa, sesuai dengan berat molekul prediksi MMLV-RT.



Gambar 6. Analisis SDS-PAGE protein rekombinan MMLV-RT. M menunjukkan marker protein; L1 dan L2 menunjukkan fraksi lisat sel sebelum purifikasi; P1 dan P2 menunjukkan fraksi protein hasil purifikasi.

Protein rekombinan kemudian dipurifikasi menggunakan sistem afinitas Ni²⁺ berbasis His-

tag. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa fraksi lisat kasar (L1 dan L2) memiliki banyak pita protein nonspesifik yang berasal dari protein endogen *E. coli*. Setelah proses purifikasi, fraksi protein hasil elusi (P1 dan P2) menunjukkan pita dominan pada ukuran sekitar 55,4 kDa dengan berkurangnya protein kontaminan. Hasil pengukuran konsentrasi protein menunjukkan bahwa produksi protein rekombinan mencapai 3,385 mg/mL setelah induksi *overnight*.

Evaluasi Aktivitas Fungsional MMLV-RT Rekombinan

Aktivitas biologis enzim MMLV-RT rekombinan dievaluasi berdasarkan kemampuannya dalam mensintesis cDNA dari RNA SARS-CoV-2 sebagai cetakan. Produk cDNA kemudian diamplifikasi menggunakan PCR konvensional. Hasil elektroforesis menunjukkan terbentuknya pita DNA spesifik dengan ukuran sekitar 183 bp pada sampel yang menggunakan enzim MMLV-RT rekombinan. Pola pita yang dihasilkan memiliki intensitas yang sebanding dengan enzim reverse transcriptase komersial dan tidak menunjukkan adanya pita nonspesifik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa protein rekombinan yang diproduksi memiliki aktivitas biologis sebagai reverse transcriptase dan mampu menghasilkan cDNA yang dapat digunakan sebagai cetakan PCR.



Gambar 7. Hasil amplifikasi PCR gen target SARS-CoV-2 menggunakan cDNA hasil sintesis dengan enzim MMLV-RT rekombinan dan enzim RT komersial. M menunjukkan marker DNA 50 bp; sumur 1–3 menggunakan MMLV-RT rekombinan, sedangkan sumur 4–6 menggunakan RT komersial.

Pembahasan

Optimasi Kodon dan Keberhasilan Ekspresi Gen Sintetik MMLV-RT

Optimasi kodon merupakan salah satu tahapan penting dalam produksi protein rekombinan karena perbedaan preferensi

penggunaan kodon antara organisme asal gen dan organisme inang dapat memengaruhi efisiensi translasi, stabilitas mRNA, serta jumlah protein yang diekspresikan. Pada penelitian ini, gen sintetik MMLV-RT memiliki nilai Codon Adaptation Index (CAI) sebesar 0,73, yang menunjukkan tingkat kesesuaian kodon yang baik terhadap sistem translasi *Escherichia coli*. Selain itu, kandungan GC sebesar 57,14% masih berada dalam kisaran yang direkomendasikan untuk menjaga stabilitas transkrip mRNA tanpa meningkatkan risiko terbentuknya struktur sekunder yang dapat menghambat proses translasi. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa desain gen sintetik yang digunakan berpotensi mendukung ekspresi protein rekombinan secara efisien.

Hasil penelitian ini sejalan dengan Nuryana et al. (2022) yang melaporkan bahwa optimasi kodon pada gen MMLV-RT meningkatkan keberhasilan ekspresi protein rekombinan pada *E. coli* tanpa mengubah aktivitas biologis enzim. Temuan serupa juga dilaporkan oleh Gustafsson et al. (2004) yang menyatakan bahwa penyesuaian penggunaan kodon terhadap preferensi organisme inang mampu meningkatkan efisiensi translasi melalui peningkatan kestabilan mRNA dan ketersediaan tRNA yang sesuai. Selain itu, Rosano dan Ceccarelli (2019) menjelaskan bahwa optimasi kodon merupakan salah satu strategi utama untuk meningkatkan hasil produksi protein rekombinan pada sistem ekspresi *E. coli*, terutama bagi gen yang berasal dari organisme eukariotik.

Keberhasilan transformasi plasmid rekombinan pada *E. coli* DH5 α dan BL21(DE3) menunjukkan bahwa konstruksi gen sintetik berhasil dipertahankan secara stabil dan siap digunakan pada tahap propagasi maupun ekspresi protein. *E. coli* DH5 α umum digunakan sebagai strain kloning karena memiliki efisiensi transformasi tinggi serta mampu mempertahankan stabilitas plasmid rekombinan. Sementara itu, *E. coli* BL21(DE3) merupakan strain ekspresi yang banyak digunakan karena membawa gen T7 RNA polymerase pada kromosomnya sehingga memungkinkan ekspresi protein target secara kuat melalui promotor T7 pada vektor pET (Green & Sambrook, 2012; Rosano & Ceccarelli, 2019). Penggunaan kombinasi vektor pET-21a(+) dan strain BL21(DE3) juga telah banyak diterapkan dalam produksi berbagai protein rekombinan karena menghasilkan tingkat ekspresi yang tinggi

dengan sistem induksi yang sederhana menggunakan IPTG (Rosano & Ceccarelli, 2019).

Temuan penelitian ini juga konsisten dengan laporan Rosano dan Ceccarelli (2014) yang menunjukkan bahwa keberhasilan ekspresi protein rekombinan pada *E. coli* dipengaruhi oleh kombinasi antara optimasi kodon, pemilihan strain ekspresi, dan sistem vektor yang digunakan. Dengan demikian, keberhasilan konstruksi dan transformasi gen sintetik MMLV-RT pada penelitian ini menunjukkan bahwa strategi optimasi kodon yang diterapkan telah memberikan dasar yang baik untuk produksi enzim reverse transcriptase rekombinan yang berpotensi dikembangkan sebagai reagen diagnostik molekuler yang diproduksi secara lokal.

Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan

Protein rekombinan MMLV-RT berhasil diekspresikan dengan berat molekul sekitar 55,4 kDa, sesuai dengan karakteristik MMLV-RT rekombinan yang telah dilaporkan sebelumnya. Sistem ekspresi pET-21a(+)_BL21(DE3) memberikan keuntungan berupa kemampuan menghasilkan protein dalam jumlah tinggi melalui regulasi promotor T7.

Induksi menggunakan IPTG selama 16 jam menghasilkan akumulasi protein yang tinggi. Namun, ekspresi protein yang tinggi juga dapat meningkatkan tekanan metabolik pada sel inang sehingga berpotensi menyebabkan kesalahan pelipatan protein atau pembentukan inclusion body. Oleh karena itu, keberhasilan produksi protein tidak hanya ditentukan oleh jumlah protein, tetapi juga oleh kemampuan mempertahankan aktivitas biologisnya (Rosano & Ceccarelli (2014).

Purifikasi menggunakan sistem Ni²⁺-NTA memanfaatkan interaksi antara His-tag pada protein rekombinan dengan ion nikel sehingga memungkinkan pemisahan protein target dari protein kontaminan. Peningkatan intensitas pita 55,4 kDa setelah purifikasi menunjukkan bahwa sistem afinitas tersebut efektif dalam memperkaya protein MMLV-RT. Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan sebelumnya bahwa sistem His-tag/Ni²⁺ affinity chromatography merupakan metode yang efektif untuk menghasilkan protein rekombinan dengan tingkat kemurnian tinggi (Bornhorst & Falke, 2000; Spriestersbach et al., 2015).

Evaluasi Aktivitas Fungsional Enzim MMLV-RT Rekombinan

Keberhasilan ekspresi protein tidak selalu menunjukkan bahwa protein tersebut memiliki fungsi biologis. Oleh karena itu, evaluasi aktivitas enzim menjadi tahap penting untuk memastikan bahwa protein rekombinan tetap aktif setelah proses ekspresi dan purifikasi.

Pada penelitian ini, MMLV-RT rekombinan mampu menghasilkan cDNA dari RNA SARS-CoV-2 dan menghasilkan amplifikasi PCR spesifik dengan ukuran sekitar 183 bp. Hasil tersebut menunjukkan bahwa enzim rekombinan memiliki aktivitas RNA-dependent DNA polymerase yang berfungsi dengan baik.

Performa yang sebanding dengan enzim komersial menunjukkan bahwa MMLV-RT hasil produksi bakteri memiliki potensi untuk digunakan sebagai alternatif enzim RT dalam aplikasi RT-PCR. Hal ini mendukung penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa MMLV-RT rekombinan hasil optimasi kodon mampu menghasilkan cDNA berkualitas dan mendukung aplikasi diagnostik molekuler (Nuryana et al., 2022).

Kesimpulan

Penelitian ini berhasil menghasilkan enzim MMLV-RT rekombinan melalui sistem ekspresi *Escherichia coli* BL21(DE3) menggunakan vektor pET-21a(+). Optimasi kodon menghasilkan konstruksi gen yang sesuai untuk ekspresi bakteri dan mampu menghasilkan protein rekombinan dengan berat molekul sekitar 55,4 kDa.

Protein rekombinan berhasil diproduksi dan dimurnikan menggunakan sistem afinitas Ni²⁺, dengan hasil produksi mencapai 3,385 mg/mL. Evaluasi aktivitas biologis menunjukkan bahwa MMLV-RT rekombinan mampu mensintesis cDNA dan menghasilkan amplifikasi PCR spesifik yang sebanding dengan enzim komersial. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MMLV-RT rekombinan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai alternatif reagen reverse transcriptase lokal untuk aplikasi RT-PCR dan pengembangan produk bioteknologi molekuler.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. dr. Andani Eka Putra, M.Sc dan Pusat

Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi (PDRPI), Fakultas Kedokteran Universitas Andalas atas fasilitas laboratorium dan dukungan teknis selama pelaksanaan penelitian.

Referensi

- Arezi, B. & Hogrefe, H. (2009). Full-length cDNA synthesis with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and its applications. *Methods in Molecular Biology*, 529: 315–327. doi:10.1007/978-1-60327-527-2_19.
- Baranauskas, A., Paliksa, S., Alzbutas, G., Vaitkevicius, M., Lubiene, J., Letukiene, V., Burinskas, S., Sasnauskas, G. & Skirgaila, R. (2012). Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Engineering, Design & Selection*, 25 (10): 657–668. doi:10.1093/protein/gzs034.
- Bornhorst, J. A. & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, 326: 245–254. doi:10.1016/S0076-6879(00)26058-8.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G. J. C., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M. P. G. & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25 (3): 2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- El Zowalaty, M. E., Young, S. G. & Järhult, J. D. (2020). Environmental impact of the COVID-19 pandemic – a lesson for the future. *Infection Ecology & Epidemiology*, 10 (1): 1768023. doi:10.1080/20008686.2020.1768023.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Nuryana, I., Laksmi, F. A., Agustriana, E., Dewi, K. S., Andriani, A., Thontowi, A., Kusharyoto, W. & Lisdiyanti, P. (2022). Expression of codon-optimized gene encoding murine Moloney leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *The Protein Journal*, 41 (4–5): 515–526. doi:10.1007/s10930-022-10066-5.
- Oscorbin, I. P. & Filipenko, M. L. (2021). M-MuLV reverse transcriptase: Selected properties and improved mutants. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19: 6315–6327. doi:10.1016/j.csbj.2021.11.030.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
- Rosano, G. L., Morales, E. S. & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28 (8): 1412–1422. doi:10.1002/pro.3668.
- Spiestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H. & Maertens, B. (2015). Purification of His-tagged proteins. *Methods in Enzymology*, 559: 1–15. doi:10.1016/bs.mie.2014.11.003.
- Suhandono, S., Meitha, K., Dwivany, F. M., Septiani, P., Kristianti, T. & Wati, L. (2022). *Diagnostik Molekuler*. ITB Press, Bandung.
- Tahamtan, A. & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: Issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20 (5): 453–454. doi:10.1080/14737159.2020.1757437.
- Tyagi, S., Kabade, P. G., Gnanapragasam, N., Singh, U. M., Gurjar, A. K. S., Rai, A., Sinha, P., Kumar, A. & Singh, V. K. (2023). Codon usage provide insights into the adaptation of rice genes under stress condition. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2): 1098. doi:10.3390/ijms24021098.
- Mital, S., Christie, G., & Dikicioglu, D. (2021). Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: A systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01698-w>
- Tungekar, A. A., Castillo-Corujo, A., & Ruddock, L. W. (2021). So you want to express your protein in *Escherichia coli*? *Essays in Biochemistry*, 65(2), 247–260. <https://doi.org/10.1042/EBC20200170>

Ellefson, J. W., Gollihar, J., Shroff, R., Shivram, H., Iyer, V. R., & Ellington, A. D. (2016). Synthetic evolutionary origin of a

proofreading reverse transcriptase. *Science*, 352(6293), 1590–1593.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf5409>