

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Gen sintetik RT rekombinan berhasil dikonstruksi ke dalam vektor ekspresi pET-21a(+) dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5a untuk propagasi plasmid, yang dikonfirmasi melalui PCR koloni dan PCR menggunakan DNA plasmid hasil isolasi.
2. Gen RT rekombinan berhasil diekspresikan dalam *E. coli* BL21 (DE3) menggunakan induksi IPTG, yang ditunjukkan oleh munculnya pita protein berukuran $\pm 55,4$ kDa pada analisis SDS-PAGE.
3. Variasi waktu induksi IPTG memengaruhi tingkat ekspresi protein RT rekombinan. Ekspresi optimum diperoleh pada waktu induksi overnight (± 16 jam), yang menghasilkan intensitas pita protein dan *yield* protein tertinggi.
4. Enzim RT rekombinan yang dihasilkan menunjukkan aktivitas biologis yang fungsional dalam mensintesis cDNA dari *template* RNA dan memiliki performa yang sebanding dengan enzim reverse transcriptase komersial, sehingga berpotensi dikembangkan sebagai alternatif enzim untuk aplikasi diagnostik molekuler.

6.2 Saran

1. Optimasi gen sintetik RT perlu dilakukan lebih lanjut untuk meningkatkan nilai *codon adaptation index* (CAI) sehingga efisiensi ekspresi protein rekombinan dapat ditingkatkan.
2. Optimasi kondisi ekspresi protein perlu dilakukan melalui variasi suhu induksi, konsentrasi IPTG, dan penggunaan strain atau sistem pendukung pelipatan protein (*co expression chaperone*) untuk mengurangi pembentukan *inclusion bodies* dan meningkatkan fraksi protein larut.
3. Pengembangan metode refolding protein dari fraksi tidak larut (*insoluble fraction*) perlu dilakukan untuk meningkatkan proporsi

protein aktif secara biologis dan meningkatkan aktivitas enzim yang dihasilkan.

4. Kuantifikasi protein disarankan menggunakan metode tambahan seperti *Bradford assay* atau *BCA assay* sebagai validasi terhadap pengukuran NanoDrop A280 sehingga diperoleh estimasi konsentrasi protein yang lebih akurat.
5. Karakterisasi aktivitas enzim perlu dilakukan secara lebih komprehensif melalui penentuan aktivitas spesifik, efisiensi transkripsi balik, serta parameter kinetika enzim seperti K_m dan V_{max} sehingga performa enzim dapat dibandingkan secara lebih objektif dengan enzim reverse transcriptase komersial.
6. Optimasi formulasi dan stabilitas enzim selama penyimpanan perlu dilakukan, termasuk evaluasi penggunaan agen stabilisasi seperti gliserol, DTT, atau BSA untuk mempertahankan aktivitas enzim dalam jangka panjang.
7. Produksi enzim pada skala yang lebih besar perlu dievaluasi untuk menilai kelayakan proses produksi dan mendukung pengembangan enzim reverse transcriptase lokal sebagai reagen biologi molekuler yang lebih ekonomis dan kompetitif.

