

## Optimasi Ekspresi *Human Epidermal Growth Factor* (h-EGF) Rekombinan dalam *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan Variasi Media dan Konsentrasi Penginduksi

Riyona Desvy Pratiwi

Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong Science Center, Bogor, Jawa Barat, 16911

\*Penulis korespondensi: [riyona.desvy.pratiwi@lipi.go.id](mailto:riyona.desvy.pratiwi@lipi.go.id)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v7.n2.23824>

**Abstrak:** *Epidermal growth factor* (EGF) merupakan protein yang sangat penting dalam proliferasi, diferensiasi, dan pematangan sel. EGF sintetik atau *recombinant human EGF* (rh-EGF) telah digunakan secara klinis untuk mengatasi kondisi kekurangan EGF alami seperti mempercepat pemulihan luka pada penderita diabetes dan teravaksin untuk pengobatan kanker paru. Ekspresi rh-EGF dilaporkan tidak mudah karena protein ini sensitif terhadap proteolisis intraselular. Kondisi yang optimal sangat diperlukan untuk ekspresi rh-EGF agar diperoleh protein dalam jumlah yang tinggi. Hingga saat ini, sejumlah studi ekspresi rh-EGF telah dilaporkan, namun harus difusi dengan protein peningkat solubilitas. Pada penelitian ini, rh-EGF berhasil diekspresikan, meskipun tanpa protein peningkat solubilitas. Ekspresi rh-EGF dikontrol oleh promotor T7 yang tergantung pada isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalaktopiranosid (IPTG). Konsentrasi IPTG yang optimal menentukan keberhasilan ekspresi protein yang diinduksinya. Ekspresi rh-EGF dilakukan dalam dua media, yaitu Luria Bertani (LB) dan Terrific Broth (TB) dengan kondisi non induksi dan induksi IPTG konsentrasi 0,1 mM; 0,5 mM; dan 1 mM. Lama induksi juga divariasikan, yakni 3 dan 6 jam. Konsentrasi rh-EGF tertinggi (0,21 mg/ml) diperoleh dengan ekspresi menggunakan TB yang induksi IPTG 0,5 mM selama 6 jam.

**Kata kunci:** *recombinant human epidermal growth factor*, induksi IPTG, pET21b(+), *Escherichia coli* BL21(DE3)

**Abstract:** *Epidermal growth factor (EGF) is important in cells proliferation, differentiation, and maturation. Recombinant human epidermal growth factor (rh-EGF) has been clinically used to overcome natural EGF deficiency, such as for accelerating wound recovery in patients with diabetes and for a therapeutic vaccine in lung cancer treatment. Expression of rh-EGF was reported burdensome due to sensitivity towards intracellular proteolysis. An optimized condition is highly required in expression of rh-EGF in order to obtain protein in high yield. To date, a number of studies on rh-EGF expression have been reported, yet requiring fusion with solubility enhancing-protein. In this study, rh-EGF has been successfully expressed, eventhough without solubility enhancing-protein. The expression of rh-EGF was controlled by T7 promoter which depends on isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranoside (IPTG). Optimized concentration of IPTG assures successful expression of the induced protein. The expression of rh-EGF was carried out in two types of media, i.e Luria Bertani (LB) and Terrific Broth (TB), either without or with IPTG induction (0.1 mM; 0.5 mM; 1 mM). Induction time was varied – 3 and 6 h. The highest concentration of rh-EGF (0.21 mg/ml) was obtained using TB media which was induced with 0.5 mM IPTG for 6 h.*

**Keywords:** *recombinant human epidermal growth factor, IPTG induction, pET21b(+), Escherichia coli BL21(DE3)*

### PENDAHULUAN

*Human epidermal growth factor* (h-EGF) merupakan protein yang berperan penting dalam proliferasi, maturasi sel, dan penghambatan sekresi asam lambung (Cohen & Carpenter 1990). Kekurangan h-EGF dalam tubuh dapat menyebabkan beberapa penyakit serius yang berhubungan dengan

perbaikan sel dan jaringan, seperti tukak lambung dan luka kronis (Fernández-Montequín *et al.* 2009; Ertugrul *et al.* 2015). h-EGF rekombinan (rh-EGF) diproduksi untuk mencukupi kebutuhan h-EGF pada pasien yang mengalami defisiensi dan gangguan sintesis h-EGF (Negahdari *et al.* 2016).

Protein rekombinan sebagian besar diproduksi dalam sel inang *Escherichia coli* karena penanganannya mudah, ekonomis, dan hasil yang diperoleh melimpah (Rosano & Ceccarelli 2014; Hayat *et al.* 2018). Pada penelitian ini *E. coli* BL21(DE3) digunakan sebagai inang ekspresi. Gen target rh-EGF dikonstruksikan dengan vektor pET21b(+), yang merupakan salah satu vektor yang kompatibel dengan *E. coli* BL21(DE3). Di samping itu, vektor pET21b(+) memiliki 6×His-tag yang diperlukan untuk mempermudah proses pemurnian rh-EGF dari protein endogenus *E. coli* BL21(DE3) (Mierendorf *et al.* 2000).

Vektor pET21b(+) menggunakan promotor RNA polymerase T7 atau promotor T7. Ekspresi gen yang dikontrol oleh promotor T7 diinduksi menggunakan IPTG. IPTG merupakan suatu senyawa yang menyerupai alolaktosa, yakni metabolit laktosa yang terdiri dari D-galaktosa dan D-glukosa. Akan tetapi, glukosa pada IPTG digantikan oleh gugus isopropil yang berikatan dengan galaktosida melalui sebuah atom sulfur. Dengan demikian, IPTG tidak terhidrolisis sehingga konsentrasinya akan tetap di dalam kultur transforman (McBrien & Moses 1966).

IPTG berikatan dengan tetramer represor *lac* yang menyebabkan konformasi represor *lac* berubah sehingga tidak dapat berikatan dengan operator *lac*. Dengan demikian RNA polimerase dapat mengenali T7 promotor dan mentranskripsikan gen menjadi mRNA yang dilanjutkan dengan translasi protein. Oleh karena itu, konsentrasi IPTG merupakan faktor yang paling krusial untuk mengekspresikan protein rekombinan pada vektor plasmid yang dikontrol oleh T7 promotor. (Hansen *et al.* 1998).

rh-EGF merupakan protein kecil yang sangat sensitif terhadap proteolisis intraselular (Allen *et al.* 1985). Fusi dengan protein lain yang dapat meningkatkan kelarutannya dan menambah bobot molekul diperlukan untuk meningkatkan keberhasilan ekspresi rh-EGF. rh-EGF pernah diekspresikan dengan bantuan fusi protein SUMO (Ma *et al.* 2016), GB1 (Zheng *et al.* 2016), dan TrpE (Allen *et al.* 1985) sehingga kelarutannya meningkat dalam sitoplasma *E. coli*. rh-EGF\_SUMO dan rh-EGF\_GB1 diekspresikan dengan induksi IPTG, masing – masing 0,6 mM dan 0,2 mM, sedangkan rh-EGF\_TrpE diekspresikan dengan induksi asam akrilik indol. Akan tetapi, kelemahan ekspresi rh-EGF dalam bentuk fusi ini memerlukan proses tahapan lanjutan untuk memisahkan dan memurnikan rh-EGF yang kurang praktis dan ekonomis. Allen *et al.* (1985) melaporkan bahwa rh-EGF tidak berhasil diekspresikan tanpa adanya TrpE.

Ekspresi rh-EGF dalam *E. coli* tanpa menggunakan fusi protein peningkat kelarutan belum pernah dilakukan. Selain itu, optimasi media dan induser untuk mengekspresikan rhEGF juga belum pernah dilaporkan. Penelitian awal diperlukan untuk mengetahui kondisi yang terbaik untuk mengekspresikan rh-EGF tanpa fusi protein ini. Pada

studi ini, dilakukan optimasi kondisi ekspresi rh-EGF terkait konsentrasi IPTG sebagai induser ekspresi, serta dilakukan komparasi penggunaan dua jenis media LB dan TB, juga lama induksi untuk mengekspresikan rh-EGF dengan konsentrasi yang paling tinggi.

## BAHAN DAN METODE

### Alat

Inkubator *shaker* (Series 2G Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA); sentrifus (Heraeus Sepatech Biofuge 13, Germany; Hitachi CR22G, Japan); *rotary shaker* (Lab Line, India); *protein electrophoresis equipment* (Biorad).

### Bahan yang Digunakan

*E. coli* DH5 $\alpha$ \_pET21b(+)\_hEGF<sub>syn</sub> diperoleh dari Nurmalasari (2010). Gen h-EGF diikuti oleh gen 6×His-tag pada C-terminal; media LB (0,5 g *yeast extract*; 1 g tripton, dan 1 g NaCl dalam 100 ml akuades); media TB (2,4 g *yeast extract*; 1,2 g tripton; 0,4 ml gliserol; 10 ml larutan kalium fosfat yang terdiri dari 0,231 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan 1,254 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 90 ml akuades). *Yeast extract*, tripton (Caisson); NaCl, urea,  $\beta$ -merkaptotanol (Merck); tris, glisin, gliserol, larutan akrilamid 30% (BioBasic); tricine, marka *ultra low range molecular*, standar h-EGF (Sigma), isopropil  $\beta$ -D-1-thiogalaktopiranosida atau IPTG, 1-Step NBT/BCIP *substrate solution* (Thermo Scientific); antibodi primer (antibodi monoklonal EGF mencit) dan antibodi sekunder (*goat anti-mouse IgG-AP*) diperoleh dari Santa Cruz, marka *All Blue prestained low range*, membran nitroselulosa (Biorad). Bahan kimia lainnya dari Sigma.

### Variasi konsentrasi Induser IPTG untuk Ekspresi h-EGF dalam *E. coli* BL21(DE3)

*E. coli* BL21(DE3)\_pET21b(+)\_h-EGF diperoleh dengan mengisolasi rekombinan plasmid pET21b(+)\_h-EGF dari inang subkloningnya *E. coli* DH5 $\alpha$ , dilanjutkan dengan transformasi rekombinan plasmid tersebut ke dalam inang ekspresi *E. coli* BL21(DE3) (Pratiwi *et al.* 2019, data belum dipublikasikan).

Prekultur *E. coli* BL21(DE3)\_pET21b(+)\_h-EGF disiapkan dengan menambahkan 50  $\mu$ l stok gliserol ke dalam 1 ml media LB, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 160 rpm. Prekultur sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam 5 ml media LB mau pun TB, selanjutnya diinkubasi pada 37°C, 160 rpm selama  $\pm$ 2 jam atau hingga diperoleh *optical density* (OD) antara 0,6 – 0,8. Pada tahap ini, dilakukan induksi dengan menambahkan IPTG sejumlah 0,1; 0,5; dan 1 mM. Setelah penambahan IPTG, sel diinkubasi lagi masing – masing selama 3 jam dan 6 jam. Sel kemudian dipanen dengan sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm, 4°C, 5 menit. Pelet sel dilarutkan dengan 2 ml larutan solubilisasi (8M urea, 50 mM glisin, dan 80

mM merkaptotanol), lalu diinkubasi pada suhu 8°C selama 72 jam (Rodiansyah *et al.* 2019). Protein terlarut dipisahkan dari sisa pelet melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Protein terlarut pada bagian supernatan dianalisa dengan *tricine*-SDS PAGE dan Western blot.

#### Karakterisasi dan Penentuan Konsentrasi h-EGF

Sejumlah 50 µl protein terlarut ditambahkan dengan 50 µl 2× *loading dye*, kemudian diinkubasi dalam air mendidih selama 5 menit. Sampel dikarakterisasi dengan *tricine* – SDS PAGE menggunakan gel 15% akrilamid-bisakrilamid, voltase 70 volt selama 3 – 3,5 jam. BSA dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,4 mM digunakan sebagai standar untuk penentuan konsentrasi protein. Gambar hasil SDS PAGE dikonversi menjadi latar hitam dengan pita berwarna hijau terang menggunakan perangkat lunak C-Digit Image Studio (LICOR), kemudian disemikuantifikasikan menggunakan perangkat lunak ImageJ (NIH). Semikuantifikasi dilakukan dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

#### Karakterisasi h-EGF dengan Western blotting

Western blotting dilakukan merujuk ke Ausuble *et al.* (2012) dengan modifikasi terutama pada konsentrasi larutan blocking dan kedua antibodi. Protein pada gel hasil *tricine* – SDS PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa selama 2 jam, 90 volt, pada kondisi dingin. Selanjutnya dilakukan blocking membran menggunakan larutan blocking (5% skim milk dalam *tris buffered saline* (TBS)) selama 2 jam pada kondisi dingin. Masing-masing antibodi primer dan sekunder ditambahkan dengan perbandingan 1:3500 (2 µl antibodi ke dalam 7 ml larutan blocking). Pencucian dilakukan setiap pergantian tahapan inkubasi dengan larutan pencuci (0.1% Tween 20 dalam TBS), sebanyak tiga kali dengan waktu inkubasi 15 menit; 5 menit; dan 5 menit. Deteksi dilakukan dengan penambahan larutan substrat 1-Step NBT/BCIP sebanyak 2 ml, lalu diinkubasi pada

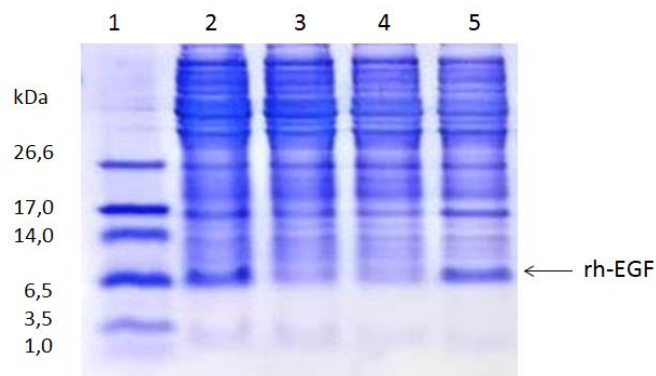
kondisi gelap selama 15 menit. Setelah pita protein target muncul, membran dibilas dengan akuades, kemudian segera didokumentasikan segera menggunakan kamera digital.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

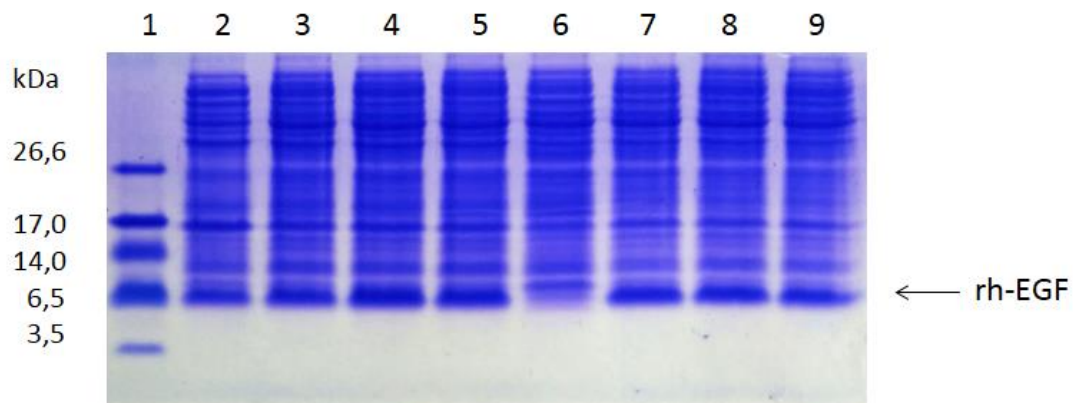
Jenis media pertumbuhan, konsentrasi induser IPTG, dan lama induksi merupakan faktor yang mempengaruhi level ekspresi rh-EGF. Pada Gambar 1 terlihat jelas bahwa rh-EGF diekspresikan meskipun tanpa induksi IPTG dan dengan induksi IPTG konsentrasi terendah, yakni 0,1mM dalam media TB dengan induksi selama 3 jam. Ekspresi rh-EGF tidak diharapkan pada kondisi tanpa induksi, akan tetapi hal ini terjadi karena adanya *leaky expression* atau ekspresi level basal.

Ekspresi level basal terjadi apabila terjadi perubahan konformasi tetramer represor lac menjadi bentuk superkoil sehingga represor lac terlepas dari operator lac meskipun tanpa IPTG. Oleh karena itu, promotor T7 tetap aktif untuk mengekspresikan protein target (Fulcrand *et al.* 2016). Sebaliknya, rh-EGF terekspresi sangat rendah atau hampir tidak terekspresi, pada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 0,5 dan 1 mM. Penggunaan IPTG dengan konsentrasi tinggi dapat membahayakan sel *E. coli* BL21(DE3) yang membawa plasmid rekombinan. IPTG dapat menghambat pertumbuhan sel dan mengganggu kemampuan sel inang untuk mempertahankan plasmid rekombinan yang dibawanya (Dvorak *et al.* 2015).

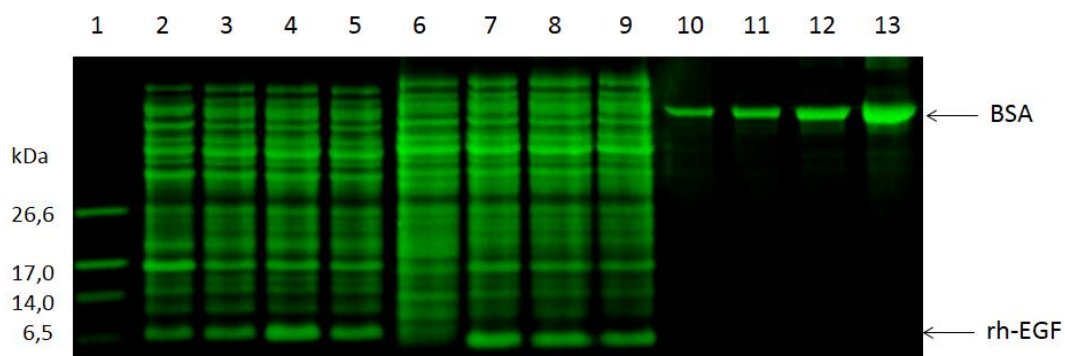
Penambahan waktu induksi juga mempengaruhi level ekspresi rh-EGF. Pita rh-EGF yang diekspresikan dalam media TB terlihat dengan induksi IPTG mau pun non induksi pada semua konsentrasi dengan lama induksi 6 jam pada suhu 37°C (Gambar 2). Hal ini memperkuat dugaan sebelumnya, bahwa pertumbuhan kultur transforman dengan IPTG konsentrasi tinggi dengan lama induksi 3 jam tidak cukup untuk mengekspresikan rh-EGF (Gambar 1).



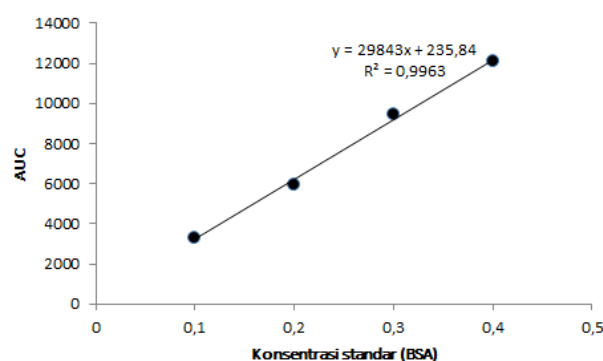
**Gambar 1.** Profil *tricine* – SDS PAGE rh-EGF yang diekspresikan menggunakan media TB dengan variasi konsentrasi induser IPTG, diinduksi selama 3 jam pada suhu 37°C. 1) marka protein; 2) tanpa IPTG; 3) IPTG 1mM; 4) IPTG 0,5 mM; 5) IPTG 0,1 mM.



**Gambar 2.** Profil hasil tricine – SDS PAGE rh-EGF yang diekspresikan menggunakan media TB dan LB dengan variasi konsentrasi induser IPTG selama 6 jam pada suhu 37°C. 1) marka protein; 2) tanpa IPTG, media TB; 3) IPTG 0,1 mM, media TB; 4) IPTG 0,5 mM, media TB; 5) IPTG 1 mM, media TB; 6) tanpa induksi, media LB; 7) IPTG 0,1 mM, media LB; 8) IPTG 0,5 mM, media LB; 9) IPTG 1 mM, media LB.



**Gambar 3.** Profil tricine – SDS PAGE rh-EGF yang diekspresikan menggunakan media TB dan LB dengan variasi induksi IPTG selama 6 jam pada suhu 37°C, dengan standar BSA; 1) marka protein; 2) tanpa IPTG, media TB; 3) IPTG 0,1 mM, media TB; 4) IPTG 0,5 mM, media TB; 5) IPTG 1 mM, media TB; 6) tanpa IPTG, media LB; 7) IPTG 0,1 mM, media LB; 8) IPTG 0,5 mM, media LB; 9) IPTG 1 mM, media LB; 10) BSA 0,05 mg/ml; 11) BSA 0,1 mg/ml; 12) BSA 0,2 mg/ml; 13) BSA 0,4 mg/ml.



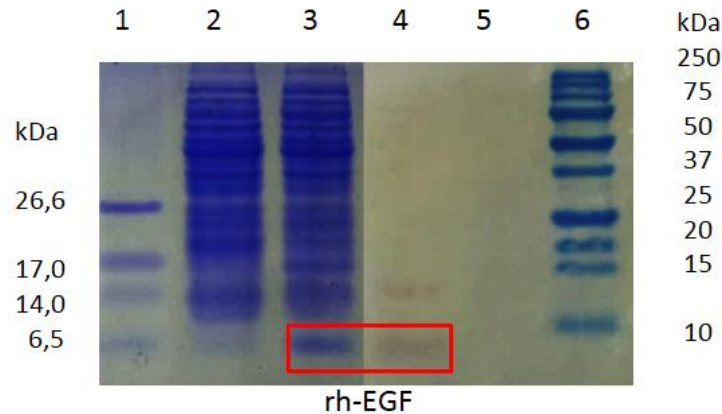
**Gambar 4.** Kurva baku BSA hasil pengukuran menggunakan perangkat lunak ImageJ

Rh-EGF yang diperoleh dengan induksi selama 6 jam ini kemudian dikuantifikasi menggunakan standar BSA melalui penentuan secara semikuantitatif menggunakan perangkat lunak ImageJ (Arya *et al.* 2015). Gambar gel diubah menjadi warna hijau terang berlatar belakang hitam

sebelum dianalisa dengan ImageJ agar diperoleh area pengukuran yang tegas sehingga pengukuran konsentrasi rh-EGF valid (Gambar 3). Area yang diukur adalah pita protein pada ukuran 6,5 kDa. Konsentrasi rh-EGF ditetapkan dengan memasukkan nilai area pengukuran masing-masing pita rh-EGF ke

**Tabel 1.** Konsentrasi rh-EGF yang dihitung menggunakan perangkat lunak ImageJ menggunakan standar BSA.

Media + perlakuan	Konsentrasi (mg/ml)
TB tanpa IPTG	0,096 ± 0,0026
TB + IPTG 0.1 mM	0,117 ± 0,0022
TB + IPTG 0.5 mM	0,210 ± 0,0031
TB + IPTG 1 mM	0,142 ± 0,0006
LB tanpa IPTG	Tidak terdeteksi
LB + IPTG 0.1mM	0,201 ± 0,0110
LB + IPTG 0.5 mM	0,174 ± 0,0039
LB + IPTG 1mM	0,151 ± 0,0046



**Gambar 5.** Profil hasil tricine – SDS PAGE (kiri) dan Western blot (kanan) rh-EGF. 1) marka protein; 2) tanpa IPTG, media LB; 3) IPTG 0,5mM, media LB; 4) tanpa IPTG, media LB; 5) IPTG 0,5 mM, media LB; 6) marka protein.

dalam persamaan kurva baku BSA, yakni  $y = 29843x + 235,84$  dengan  $r^2 = 0,9963$  (Gambar 4). Hasil pengukuran konsentrasi masing-masing rh-EGF dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan data pada Tabel 1, terlihat bahwa jenis media yang berbeda menghasilkan level ekspresi rh-EGF yang berbeda pula. Perbedaan ini dipengaruhi oleh komposisi masing – masing media. Media LB merupakan media minimum yang terdiri dari *yeast extract*, tripton, dan NaCl, sedangkan media TB mengandung *yeast extract* dan tripton dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dalam media LB, gliserol sebagai sumber karbon, dan garam fosfat yang berguna sebagai bufer yang mencegah asidifikasi kultur transforman oleh karena metabolisme sel *E. coli* (Rosano 2014).

Protein rh-EGF juga diperoleh meskipun dengan konsentrasi yang relatif rendah pada kultur transforman tanpa induksi menggunakan media TB dengan masa inkubasi 6 jam, seperti halnya pada kultur transforman tanpa induksi menggunakan media TB yang diinkubasi selama 3 jam. Akan tetapi, rh-EGF tidak diekspresikan dalam media LB tanpa induksi dengan masa inkubasi 6 jam (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa komposisi media TB berperan dalam terjadinya ekspresi basal. Gliserol di dalam media TB yang berfungsi sebagai sumber karbon mampu meningkatkan level cAMP (adenosin monofosfat siklik) sehingga CAP (protein aktivator

katabolit) bisa berikatan dengan DNA. Dengan demikian, operator lac aktif dan proses transkripsi dapat berlangsung meskipun tanpa induksi IPTG (Grossman *et al.* 1998; Rosano & Ceccarelli 2014).

Komposisi media TB yang lebih kompleks dibandingkan media LB juga berguna untuk mengatasi efek toksik IPTG terhadap sel *E. coli*. Peningkatan konsentrasi IPTG dalam media LB berkorelasi linear negatif terhadap konsentrasi rh-EGF, artinya semakin tinggi konsentrasi IPTG justru memperkecil konsentrasi rh-EGF yang diperoleh (Tabel 1). Sementara itu, kenaikan konsentrasi IPTG dari 0,1 mM menjadi 0,5 mM juga menaikkan konsentrasi rh-EGF (Tabel 1). Gliserol yang terdapat dalam media TB diketahui dapat meningkatkan kecepatan pertumbuhan sel *E. coli* secara linear (Malakar & Venkatesh 2012). Suplemen gliserol pada kultur transforman yang ditumbuhkan dengan media TB membantu sel inang untuk mengatasi efek toksik dari IPTG (Malakar & Venkatesh 2012). Namun, kapabilitas komposisi dalam media TB untuk mengatasi toksisitas IPTG tampaknya terbatas. Konsentrasi rh-EGF menurun dengan induksi yang lebih tinggi, yakni 1 mM dalam media TB (Tabel 1).

Penambahan IPTG yang tidak berefek positif dengan level ekspresi rh-EGF, diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Fazaeli *et al* (2019) dan Malakar & Venkatesh (2012). Fazaeli *et al.* (2019) melaporkan bahwa ekspresi kolesterol



oksidase tertinggi dalam sel *Chromo bacterium sp.* DS1 diperoleh dengan konsentrasi induser IPTG 0,05 mM. Di samping itu, Malakar & Venkatesh (2012) melaporkan bahwa penambahan IPTG menurunkan kecepatan pertumbuhan sel inang *E. coli* MG1655 secara linear, meskipun demikian aktivitas galaktosidase yang diperoleh tidak berbeda signifikan. IPTG merupakan substrat yang tidak bisa dimetabolisme oleh sel inang dan bersifat toksik, khususnya pada *E. coli* BL21(DE3). Gula alami seperti laktosa lebih disarankan untuk digunakan sebagai pengganti IPTG. Akan tetapi, laktosa bisa dimetabolisme oleh sel inang sehingga jumlahnya di sepanjang masa inkubasi tidak tetap (Dvorak *et al.*, 2015). Alternatif lain yang dapat diterapkan selain mengganti bahan penginduksi adalah dengan menggantikan sel inang. Sel *E. coli* BL21(DE3) dapat digantikan dengan dua sel turunannya yang lebih tahan terhadap IPTG, yakni C41(DE3) dan C43(DE3) untuk mengatasi toksisitas terhadap IPTG (Dumon-Seignovert *et al.* 2004).

Karakterisasi rh-EGF dengan metode Western blot dilakukan untuk memastikan bahwa pita protein yang diperoleh dengan ukuran sekitar 6,5 kDa adalah benar rh-EGF. Sampel yang dikarakterisasi dengan Western blot adalah protein *crude* yang belum dipurifikasi. Western blot dilakukan menggunakan antibodi monoklonal EGF mencit sebagai antibodi primer dan *goat anti-mouse* IgG-AP sebagai antibodi sekunder.

Hasil Western blot (Gambar 5) menunjukkan bahwa protein terlarut dari kultur transforman tanpa induksi dalam media LB tidak memberikan pita sama sekali di membran nitroselulosa, sedangkan dari sampel induksi dalam media LB diperoleh pita pada membran nitroselulosa di ukuran 6,5 kDa, meskipun diperoleh satu pita lainnya di ukuran sekitar 14 kDa yang diperkirakan karena variasi migrasi rh-EGF karena adanya fusi dengan 6×His-tag. Polihistidin terbukti mempengaruhi migrasi protein karena dapat mengakibatkan perbedaan jumlah SDS yang berikatan dengan protein, mengubah radius hidrodinamis protein, terjadinya *histidine stacking*, dan menimbulkan variasi derajat kekompakan protein karena adanya ikatan dengan metal. Pengaruh polihistidin ini dapat dihilangkan dengan penambahan agen pengkhelet seperti EDTA (Shelake *et al.* 2017) (Gambar 3).

## KESIMPULAN

Kondisi yang optimal untuk mengekspresikan rh-EGF dengan konsentrasi yang paling tinggi (0,21 mg/ml) adalah menggunakan media TB dengan induksi IPTG 0,5 mM selama 6 jam.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas pendanaan dari Indonesia Toray Scientific Foundation 2017 dan Bapak Dr. Asrul Muhamad Fuad dari Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI yang

telah mengizinkan penulis untuk menggunakan plasmid rekombinan pET21b(+)\_hEGF<sub>syn</sub>.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allen G., Paynter, C.A.. & Winther, M.D. (1985). Production of epidermal growth factor in *Escherichia coli* from a synthetic gene. *Journal of Cell Science*. 1985 : 29-38
- Arya, A., Gangwar, A., Sharma N.K., Sethy, N.K. & Bhargava, K. (2015). Computational method for semi-quantitative analysis of immunoblots of modified proteins using ImageJ. *Journal of Protein and Proteomics*. 6(3): 261-270.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Ferreira, A.J.P., Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L. & Schaechter, M. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology – A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley. New Jersey.
- Cohen, S. & Carpenter, G. (1990). Epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 265(14): 7709 - 7712.
- Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: A comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expression and Purification*. 37(1): 203–206.
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel PI., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z. & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*. 14(201): 1-15
- Ertugrul, B.M., Buke, C., Ersoy, O.S., Ay, B., Demirez, D.S. & Savk, O. (2015). Intralesional epidermal growth factor for diabetic foot wounds: the first cases in Turkey. *Diabetic Foot & Ankle*. 6(1): 28419..
- Fazaeli, A., Goestani, A., Lakzaei, M., Rasi Varaei, S.S., & Aminian, M. (2019). Expression optimization, purification, and functional characterization of cholesterol oxidase from *Chromobacterium sp.* DS1. *PLoS ONE*. 14(2): e0212217
- Fernández-Montequín, J.I., Betancourt B.Y., Leyva-Gonzalez, G., Mola E.L., Galan-Naranjo, K., Ramirez-Navas, M., Bermudez-Rojas, S., Rosales, F., Garcia-Iglesias, E., Berlanga-Acosta, J., Siva-Rodriguez, R., Garcia-Siverio, M. & Martinez, L.H. (2009). Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot-P) in chronic diabetic foot ulcer: Treatment up to complete wound closure. *International Wound Journal*. 6(1): 67–72.
- Fulcrand, G., Dages, S., Zhi, X., Chapagain, P., Gerstman, B.S., Dunlap, D. & Leng, F. (2016)

- A critical signal regulating the basal expression of the lac operon in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 6(19243) : 1–12.
- Grossman, H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R. & Osbourne, M.S. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression instationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209 95 – 103.
- Hansen, L.H., Knudsen, S., & Sørensen, S.J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*. 36(6): 341-347.
- Hayat, S.M.G., Farahani, N., Golichenari, B. & Sahebkar, A. (2018). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* : what we need to know. *Current Pharmaceutical Design*. 24(6): 718-725.
- Ma, Y., Yu, J., Lin, J., Wu, S., Li, S. & Wang, J. (2016). High efficient expression, purification, and functional characterization of native human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *Biomed Research International*. 2016 : 3758941
- Malakar, P. & Venkatesh, K.V. (2012). Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(6): 2543–2549.
- McBrien, D.C.H. & Moses, V. (1966). Effect of isopropylthiogalactoside on induction of the galactose operon by D-fucose in a lactose deletion mutant of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 91(3): 1391 - 1392
- Mierendorf R.C., Morris B.B., Hammer B. & Novy R.E. (2000) Expression and purification of recombinant proteins using the pET system. In: Rapley, R. (ed). *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Humana Press. New Jersey.
- Negahdari B. & Shahosseini, Z. (2016). Production of human epidermal growth factor using adenoviral based system. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 11(1): 43-48.
- Nurmalasari (2010) Konstruksi Gen Sintetik EGFsyn Pengkode Human Epidermal Growth Factor (hEGF) Menggunakan Metode Thermodynamical Balanced Inside-Out (TBIO). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Pratiwi, RD., Sahid, MNA., Zanjabila, S., Dewi, KS., Fuad, AM. (2019). Expression, purification, and bioactivity assay of human recombinant epidermal growth factor fused with 6×His-tag, belum dipublikasikan.
- Rodiansyah, A., Pratiwi, R.D., Zanjabila, S. & Fuad, A.M. (2019). Modification of recombinant human epidermal growth factor (rh-EGF) expression vector by site-directed mutagenesis for therapeutic protein production. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 24(1): 8 – 16.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5: 172.
- Shelake, R.M., Ito, Y., Masumoto, J., Morita, E.H. & Hayashi, H. (2017). A novel mechanism of “metal gel-shift” by histidine-rich Ni<sup>2+</sup>-binding Hpn protein from *Helicobacter pylori* strain SS1. *PloS One*. 12(2): e0172182
- Zheng, X., Wu, X., Fu, X., Dai, D. & Wang, F. (2016). Expression and purification of human epidermal growth factor (hEGF) fused with GB1. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 30(4): 813-818.
-