

**OPTIMASI EKSPRESI ScFv-BAD ANTI-NS1 VIRUS DENGUE PADA
Escherichia coli ORIGAMI MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHOD***

Dewi Astriany^{1,2*}, Syulastris Effendi², Sherlynda Febriani Aji Kusuma¹, Shinta Kusumawardhani⁴,
Iman Permana Maksum², Dessy Natalia³, Toto Subroto^{2,4}

¹Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Jl. Soekarno Hatta No. 354, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran,
Sumedang

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung,
Bandung

⁴Pusat Riset Bioteknologi Molekular dan Bioinformatika, Universitas Padjadjaran, Bandung

* Alamat korespondensi: dewiastriany@stfi.ac.id

Abstrak

Saat ini dengue masih menjadi masalah kesehatan di dunia dengan manifestasi klinis yang sulit dibedakan dengan penyakit infeksi lainnya, sehingga uji diagnostik yang cepat dan akurat sangat diperlukan untuk konfirmasi penyakit dan penanganan pasien yang tepat. NS1 adalah glikoprotein yang paling imunogenik dan lestari, disekresikan ke dalam aliran darah. Oleh karena itu, pemeriksaan antigen dari virus dengue NS1 telah diidentifikasi sebagai salah satu penanda spesifik dalam uji diagnostik laboratorium, yang dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi dengue primer atau sekunder pada stadium awal. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum ekspresi gen pengkode protein fusi scFv-BAD rekombinan untuk deteksi antigen NS1 virus dengue menggunakan *Response Surface Method*. Optimasi ekspresi gen ini dilakukan dengan induksi oleh berbagai konsentrasi IPTG (0,1, 0,5, dan 1 mM) pada beberapa suhu inkubasi selama 18 jam dalam medium Luria Bertani dengan penambahan biotin. ScFv terbiotinilasi rekombinan sebagai protein intraseluler dimurnikan menggunakan matriks *magnetic beads* dan dikarakterisasi dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein fusi scFv-BAD rekombinan sebagian berada dalam bentuk terlarut dan sebagian berupa badan inklusi. Analisis *Central Composite Design* menunjukkan bahwa konsentrasi IPTG yang sesuai untuk memproduksi protein scFv rekombinan adalah 0,5 mM pada suhu 28 °C pada media Luria Bertani.

Kata Kunci: virus dengue; antigen NS1; scFv; biotinilasi, *E. coli* Origami

Abstract

Dengue is still a health problem in the world with clinical manifestations that are difficult to distinguish from other infectious diseases, so rapid and accurate diagnostic tests are needed to confirm the disease and properly treat patients. NS1 is the most immunogenic and conserved glycoprotein secreted into the bloodstream. Therefore, antigen examination of the dengue NS1 virus has been identified as one of the specific markers in laboratory diagnostic tests that can be used to detect primary or secondary dengue infection at an early stage. This study aims to determine the optimum conditions for the expression of the gene encoding the recombinant scFv-BAD fusion protein for the detection of dengue virus NS1 antigen using the Response Surface Method. Optimization of gene expression was carried out by induction with various concentrations of IPTG (0.1, 0.5, and 1 mM) at various incubation temperatures for 18 hours in Luria Bertani medium with the addition of biotin. Recombinant biotinylated ScFv as an intracellular protein was purified using a magnetic beads matrix and characterized by the SDS-PAGE method. The results showed that part of the recombinant scFv-BAD fusion protein was in the soluble form and part was in the form of inclusion bodies. Central Composite Design analysis showed that the

appropriate concentration of IPTG to produce recombinant scFv proteins was 0.5 mM at 28 °C in Luria Bertani medium.

Keywords: dengue virus; NS1 antigen; scFv; biotinylation, *E. coli* Origami

PENDAHULUAN

Demam berdarah (dengue) adalah penyakit akibat infeksi virus dengue yang disebarkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* atau *Aedes albopictus*. Penyakit ini tersebar di daerah tropis dan sub-tropis di seluruh dunia, terutama di negara-negara Asia dan Amerika Latin (Bhatt *et al.*, 2013). Kejadian demam berdarah secara global telah meningkat 30 kali lipat dalam beberapa dekade terakhir. Virus dengue (DENV) merupakan famili *Flaviviridae* dengan empat serotipe yang berbeda (DENV1, DENV2, DENV3 dan DENV4). Infeksi akibat serotipe ini menyebabkan gejala klinis berupa demam berdarah, demam berdarah dengue (DBD) dan sindrom syok dengue (DSS) (Bhatt *et al.*, 2013). DENV terdiri dari satu *open reading frame* sekitar 11 kb dengan tiga protein struktural (C, PRM dan E) dan tujuh protein non-struktural (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5). NS1 adalah salah satu glikoprotein nonstruktural yang paling penting (40-50 kDa) dan imunogenik, disekresikan dalam bentuk heksamer terlarut atau sebagai protein yang terikat pada membran sel DENV yang terinfeksi (Scaturro *et al.*, 2015). NS1 merupakan target antigen yang menarik untuk keperluan diagnosis karena keberadaannya dalam darah pasien yang terinfeksi mulai hari ke-1 hingga hari ke-6 setelah timbulnya gejala

klinis dan dengan jumlah yang signifikan mulai dari hari ke-6 hingga hari ke-10 baik pada infeksi primer maupun pada infeksi sekunder, sehingga mudah terdeteksi (Amin & Sungkar, 2013).

Diagnosis infeksi dengue menjadi tantangan besar karena siklus hidup virus yang pendek. Banyak metode telah dieksplorasi dan digunakan untuk mendiagnosis infeksi dengue, termasuk isolasi virus, deteksi langsung RNA virus, deteksi antibodi IgM, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) dan tes imunokromatografi. Uji imunokromatografi berbasis nanopartikel emas telah banyak digunakan dalam pengembangan biosensor deteksi dini dan cepat terhadap dengue dengan menggunakan antibodi monoklonal karena sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Fatima *et al.*, 2014). Produksi antibodi monoklonal yang memerlukan waktu lama dan biaya yang tinggi, mendorong peneliti mengembangkan fragmen antibodi dalam bentuk *single chain Fragment variable* (scFv) untuk menggantikan penggunaan antibodi monoklonal sebagai komponen kit diagnostik karena scFv mampu mengikat antigen sama seperti antibodi utuh dan dapat diproduksi pada inang prokariota (Poungpair *et al.*, 2014).

Ekspresi scFv-anti NS1 virus dengue dapat dilakukan dengan menggunakan sistem ekspresi bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) pada

media Luria Bertani dengan menggunakan *Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG) sebagai penginduksi. Salah satu kelemahan overproduksi protein rekombinan adalah diperlukannya optimasi parameter waktu induksi, suhu, dan konsentrasi penginduksi untuk memperoleh jumlah protein yang optimal (Wang *et al.*, 2016).

Konsentrasi IPTG yang disarankan sebagai inducer berkisar antara 0,1-1,0 mM (Werin, 2019). Beberapa cara induksi dikembangkan salah satunya, bersamaan dengan pertumbuhan sel. Ketika produksi protein rekombinan dan pertumbuhan sel dilakukan secara bersamaan, pertumbuhan sel dan proses sintesis protein rekombinan di dalam sel cenderung lambat karena energi yang dihasilkan dalam proses metabolisme sel terbagi untuk menunjang pertumbuhan dan sintesis protein. Hal ini bisa jadi menguntungkan produksi protein rekombinan, karena kecepatan sintesis protein yang lambat menurunkan kemungkinan pembentukan protein rekombinan nonfungsional yang tidak larut (badan inklusi). Sel bakteri *E. coli* mampu tumbuh pada rentang temperatur yang lebar, yaitu berkisar 23-40 °C, namun ketika badan inklusi menjadi suatu masalah, sintesis protein baik dilakukan pada rentang 15-25 °C (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Konsentrasi IPTG yang tepat serta suhu yang optimum berguna untuk memberikan efisiensi waktu dan biaya produksi scFv-anti NS1 dalam skala besar.

Untuk mengetahui kondisi kultur optimum pada penelitian ini digunakan *Response Surface Method* (RSM). Nilai faktor

signifikansi dioptimasi menggunakan *Central Composite Design* (CCD), untuk memperoleh respon konsentrasi protein yang maksimum pada kultur (Chrast *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi IPTG serta suhu induksi terhadap ekspresi scFv-anti NS1 virus dengue serotipe 2, sehingga dapat memberikan informasi baru mengenai kondisi optimum dalam produksi scFv-anti NS1 sebagai salah satu bahan baku kit deteksi dengue di Indonesia.

METODOLOGI

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: alat elektroforesis gel agarosa dan SDS-PAGE (Bio-Rad), *autoclave sterilizer*, *Laminar Air Flow*, *mini spin* (Eppendorf), neraca analitik (Mettler Toledo AL204), oven, pH meter (Mettler Toledo), pipet mikro, alat sentrifugasi (Tomy MX-305), *shaker incubator* (N-Biotek®), sonikator (Vibra Cell 20 kHz®), pH meter (*Seven Excellence*®), seperangkat alat *magnetic beads* (*PureProteome™ Nickel Magnetic Beads*), kolom Ni-NTA (*QIAexpress*®), *waterbath*, dan spektrofotometer UV-Visibel.

Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan untuk ekspresi protein rekombinan fusi scFv-BAD antara lain: plasmid [*pET21-scFv-BAD*] (Genscript), NS1 Dengue Virus serotipe 2 rekombinan (Abcam), sel kompeten *Escherichia coli* Origami B(DE3) (Novagen), media Luria Bertani (Sigma-Aldrich), Terrific

Broth (Sigma-Aldrich), Super Broth (Sigma-Aldrich), antibiotik ampisilin (Sigma-Aldrich), isopropil- β -D-tiogalaktopiranosida/IPTG (Thermo Scientific), biotin (Sigma-Aldrich), bis-akrilamid (Bio Basic), *Amonium Persulfate*/APS (Bio Basic), *tetramethylethylenediamine*/TEMED (Bio-Rad), *ammonium peroxodisulfate* (APS), *Coomassie Brilliant Blue* (Sigma-Aldrich), *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Merck), agarose, *silver stain (ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit)*, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), marka protein (PeqGOLD *Prestained Protein Marker VIII*; Thermo Scientific *unstained marker*), *Blue/Orange Loading Dye*, *1 kb DNA Ladder*, *Bovine Serum Albumin* (bioPLUS), *TALON Metal Affinity Resin*, membran *polyvinyl difloride* (PVDF), *magnetic beads*, reagen deteksi *Mix ECL Prime Solution* (Bio-Rad), *Streptavidin conjugated to HRP* (Biorad), substrat *SIGMAFAST OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride)*, hidrogen peroksida, H_2SO_4 2 M dan bahan-bahan lain yang diperlukan dalam penelitian protein rekombinan.

Optimasi ekspresi gen fusi scFv-BAD

Ekspresi gen pengkode fusi scFv-BAD diregulasi oleh sistem induksi IPTG untuk menghasilkan protein intraseluler. Kondisi ekspresi scFv-BAD pada vektor pET-21b(+) dioptimasi dengan variasi suhu inkubasi 28, 30, dan 37 °C dan konsentrasi IPTG 0,1; 0,5; 1,0 mM (Wang *et al.*, 2016). *Escherichia coli* Origami yang membawa plasmid fusi scFv-BAD diinkubasi pada 10 mL media cair yang

mengandung glukosa (0,05%), ampisilin (50 mg/mL), dan biotin (10 mM), dengan penambahkan IPTG sebagai penginduksi pada suhu 28, 30, dan 37 °C selama 18 jam dengan kecepatan 200 rpm. Kultur dipanen dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C dan kecepatan 4000 G selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspensi dengan PBS (20 mM *phosphate buffer*; 0,5 M NaCl, pH 7,4) dan dilakukan sonikasi selama 2 menit 'on', 1 menit 'off' selama tiga kali, selanjutnya disentrifugasi kembali pada suhu 4 °C dengan kecepatan 15.000 G selama 10 menit. Larutan supernatan dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* untuk dilanjutkan dengan proses elektroforesis SDS-PAGE. Analisis profil ekstrak kasar (*crude*) dilakukan dengan menggunakan 12% SDS-PAGE. Hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh konsentrasi IPTG serta suhu pada proses ekspresi fusi scFv-BAD dalam media Luria Bertani (LB). Proses ekspresi fusi scFv-BAD setelah diinduksi oleh IPTG berlangsung selama 18 jam.

Prekultur dibuat dengan menginokulasikan 50 μ L stok gliserol sel transforman ke dalam 3 mL media cair yang mengandung ampisilin 3 μ L (150 mg/mL). Prekultur diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 18 jam. Hal ini juga dilakukan pada prekultur *E. coli* Origami B(DE3) sebagai kontrol tanpa penambahan ampisilin.

Desain percobaan yang terdiri dari tiga tingkat variabel yaitu minimum (-1), medium (0), dan maksimum (1) dilakukan terhadap konsentrasi IPTG dan suhu inkubasi

menggunakan faktorial *Response Surface Methode* (RSM) ditunjukkan pada Tabel 1. *Central Composite Design* (CCD) digunakan untuk mengevaluasi efek faktor terhadap respon yang diamati. Konsentrasi protein dihitung dengan persamaan linear regresi menggunakan larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar.

Prekultur sebanyak 500 μ L ditambahkan ke dalam 10 mL media cair yang mengandung 100 μ L glukosa (0,05%), 10 μ L ampisilin (50 mg/mL), dan 10 μ L biotin (10 mM). Kultur diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 90 menit hingga diperoleh nilai OD₆₀₀ mencapai 0,6-0,8, kemudian IPTG (*Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside*) ditambahkan dengan konsentrasi masing-masing 0,1; 0,5; 1 mM

untuk menginduksi ekspresi protein. Setelah diinduksi, kultur bakteri diinkubasi pada variasi suhu 28, 30, dan 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 18 jam. Kultur dipanen dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 4000 G selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet disimpan pada suhu -20 °C. Pelet sebanyak kira-kira 200 mg diresuspensi dengan 3 mL *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan dilakukan sonikasi selama 2 menit 'on', 1 menit 'off' selama tiga kali. Sampel selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 15.000 G selama 10 menit. Larutan supernatan dipindahkan ke dalam tabung *ependorf* untuk dilanjutkan dengan proses elektroforesis SDS-PAGE, dimana protein target akan terdeteksi pada ukuran sekitar 35 kDa.

Tabel 1. Desain percobaan dengan nilai variabel bebas

Percobaan	Desain variabel		Konsentrasi IPTG (mM)	Suhu (°C)
1	0	0	0,5	30
2	-1	1	0,1	37
3	-1	0	0,1	30
4	1	-1	1	28
5	1	0	1	30
6	1	1	1	37
7	0	0	0,5	30
8	0	0	0,5	30
9	0	0	0,5	30
10	0	1	0,5	37
11	-1	-1	0,1	28
12	0	0	0,5	30
13	0	-1	0,5	28

Penentuan kondisi optimum ekspresi gen fusi scFv-BAD

Ekspresi dalam skala lebih besar dilakukan dengan menginokulasikan 100 μ L stok gliserol sel hasil transformasi ke dalam 5 mL media LB yang mengandung stok ampisilin 5 μ L (50 mg/mL). Prekultur tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 18 jam. Sebanyak 2,5 mL prekultur ditambahkan ke dalam 250 mL media LB yang telah diberi penambahan 250 μ L stok ampisilin kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 180 menit hingga diperoleh nilai OD₆₀₀ mencapai 0,6-0,8.

Protein scFv terbiotinilasi diekspresikan dengan cara menginkubasi 200 mL prekultur dalam 2 L media cair LB dengan penambahan 20 mL stok glukosa 5%, 2 mL stok ampisilin, dan 2 mL stok biotin. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 200 rpm hingga diperoleh nilai OD₆₀₀ mencapai sekitar 0,6. Setelah OD₆₀₀ tercapai, kultur diinduksi dengan penambahan 2 mL IPTG 1M kemudian diinkubasi pada suhu 20 °C dengan kecepatan 200 rpm selama 18 jam.

Kultur dipanen dengan sentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang, pelet diresuspendi dengan PBS (20 mM *phosphate buffer*; 0,5 M NaCl, pH 7,4) kemudian disentrifugasi kembali pada suhu 4 °C dengan kecepatan 6000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspendi untuk selanjutnya dilakukan sonikasi. Hasil sonikasi disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit.

Supernatan selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk proses pemurnian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi ekspresi gen fusi scFv-BAD

IPTG adalah suatu senyawa yang menyerupai alolaktosa, yakni metabolit laktosa yang terdiri atas D-galaktosa dan D-glukosa. Glukosa pada IPTG digantikan oleh gugus isopropil yang berikatan dengan galaktosida melalui sebuah atom sulfur. Oleh karena itu, konsentrasi IPTG di dalam sel akan tetap karena tidak terhidrolisis. IPTG akan berikatan dengan tetramer repressor *lac* yang menyebabkan konformasi *repressor lac* berubah sehingga tidak dapat berikatan dengan operator *lac*. Sehingga RNA *polymerase* dapat mengenali promotor T7 dan mentranskripsikan gen menjadi mRNA yang dilanjutkan dengan translasi protein rekombinan. Penggunaan IPTG memerlukan monitoring untuk memastikan IPTG ditambahkan pada konsentrasi optimum karena IPTG juga dapat menjadi toksik, menyebabkan beban metabolik pada sel inang, dan harganya yang relatif mahal sehingga tidak efisien untuk produksi skala besar (Briand *et al.*, 2016).

Kelemahan penggunaan IPTG adalah toksisitas dan beban metabolik terhadap sel inang, harga yang relatif mahal sehingga tidak efisien untuk produksi skala besar, serta memerlukan monitoring untuk memastikan IPTG ditambahkan dalam konsentrasi optimum (Briand *et al.*, 2016). Laktosa dapat digunakan sebagai alternatif sebagai penginduksi dalam konsentrasi yang lebih tinggi sehingga

konsentrasi optimum yang diperlukan untuk induksi tetap tersedia.

Sel inang yang digunakan adalah *E. coli* Origami B(DE3). Sel inang ini mengalami mutasi pada *thioredoxin reductase (trxB)* dan *glutathione reductase (gor)* sehingga mampu meningkatkan pembentukan ikatan disulfida di sitoplasma. Ikatan disulfida sangat penting bagi protein rekombinan untuk membentuk konformasi tiga dimensi yang aktif secara biologis. Selain itu, galur B juga mampu meningkatkan stabilitas protein karena adanya mutasi *Ion* dan *ompT*. DE3 menandakan bakteri memiliki salinan kromosom gen RNA polymerase T7 yang berada dibawah kendali *lacUV5* yang merupakan turunan dari *lac* promotor. Sistem ekspresi pET pada plasmid pET21b(+) memiliki fitur promoter T7, yakni memiliki aktivitas yang kuat dan protein rekombinan dapat terakumulasi hingga 50% dari protein seluler (Pratiwi, 2019).

Kekuatannya untuk dapat berikatan dengan ligan avidin atau streptavidin banyak diterapkan dalam analisis protein (Al-Halabi & Meyer, 2010). Pada penelitian ini, protein fusi scFv-BAD berikatan dengan biotin yang terdapat dalam media kultur dengan bantuan enzim BirA dari *E. coli* Origami. Proses biotinisasi ini dilakukan untuk keperluan pemurnian dan juga penggunaan protein fusi scFv-BAD selanjutnya sebagai komponen kit diagnostik. Kit deteksi dengan teknik imunokromatografi yang banyak digunakan dalam diagnosis penyakit dapat ditingkatkan nilai sensitivitasnya, salah satunya dengan

memanfaatkan sistem ikatan biotin-streptavidin (Cui *et al.*, 2018).

Hasil ekspresi dipanen kemudian disentrifugasi untuk memisahkan fraksi kultur berdasarkan berat molekul, serta dilakukan pada suhu 4 °C untuk menjaga agar protein tidak mengalami degradasi. Pelet yang dihasilkan selanjutnya dilakukan proses lisis menggunakan sonikator dengan penambahan larutan *phosphate buffer saline* (PBS) serta PMSF sebagai inhibitor protease untuk menjaga protein agar tidak terpecah. Proses lisis berfungsi untuk memecah sel bakteri dan mengeluarkan protein target keluar dari sel. Residu sel dipisahkan dengan sentrifugasi. Supernatan dan pelet selanjutnya dianalisis menggunakan SDS-PAGE untuk memastikan keberadaan protein target.

Pada Tabel 2 ditunjukkan bobot pelet kultur *E. coli* Origami pada media Luria Bertani yang ditumbuhkan selama 18 jam. Berdasarkan bobot pelet yang dihasilkan dari ekspresi protein mengindikasikan terbentuknya fraksi tidak larut selama proses berlangsung. Perolehan fraksi tidak larut tertinggi diperoleh pada kondisi ekspresi suhu tinggi, yaitu suhu 37°C pada konsentrasi 0,5 mM. Menurut Gadgil (2008), suhu optimum pertumbuhan bakteri *E. coli* adalah 37°C. Meskipun demikian, penurunan suhu setelah induksi diperlukan untuk memperoleh protein target dalam bentuk terlarut karena produksi protein pada suhu tinggi akan menghasilkan protein yang terendapkan (Silaban *et al.*, 2018). Seperti pada penelitian Roudsari (2016), induksi pada suhu rendah menurunkan jumlah protein yang berbentuk

badan inklusi. Terbentuknya badan inklusi dapat disebabkan oleh adanya proses pelipatan protein yang tidak tepat.

Secara teoritis, bobot molekul protein fusi scFv-BAD yang dihasilkan oleh inang *E. coli* dengan vektor plasmid pET-21b adalah 35,42 kDa. Karakterisasi protein fusi scFv-BAD

hasil ekspresi dilakukan menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE. Konsentrasi gel poliakrilamid yang digunakan adalah sebesar 12%. Hal ini memungkinkan protein dengan rentang bobot molekul 10–100 kDa dapat bermigrasi dengan baik.

Tabel 2. Bobot pelet kultur *E. coli* Origami

Suhu (°C)	Bobot Pelet (mg)			
	Tanpa Induksi	Induksi IPTG		
		0,1 mM	0,5 mM	1 mM
28	52,1	24,9	44,6	31
30	70	85	64	64
37	76	64	94	48

Penggunaan surfaktan SDS dan pemanasan dapat merusak struktur tiga dimensi protein karena ikatan disulfida dapat terpecah. Rantai polipeptida akan menjadi linier karena terbentuknya gugus sulfhidril dan dikelilingi oleh muatan negatif dari surfaktan SDS sehingga dapat bergerak dalam arus listrik menuju kutub positif dalam medan listrik (Oktaviani & Ekaningias, 2019). Gel yang digunakan dibentuk dari hasil polimerisasi bisakrilamid dengan penambahan amonium persulfat dan dipercepat dengan penambahan TEMED, dimana TEMED berfungsi menggabungkan ikatan antar polimer satu dengan yang lainnya.

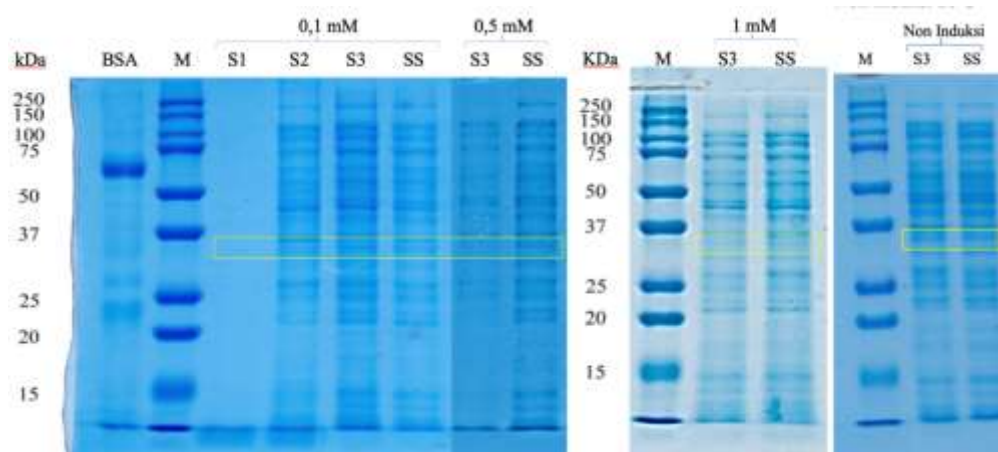
Sampel ditambahkan bufer yang mengandung Tris-HCl, SDS untuk membuat protein bermuatan negatif, merkapto-etanol untuk memotong ikatan disulfida pada protein sehingga struktur protein menjadi linear,

Coomassie brilliant blue sebagai pewarna, serta gliserol sebagai pemberat (Oktaviani & Ekaningias, 2019).

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa pada kondisi ekspresi suhu 28 °C dalam media LB, protein fusi scFv-BAD dapat terekspresi pada kultur tanpa induksi dan dengan induksi IPTG konsentrasi terendah, yakni 0,1 mM dalam waktu 18 jam. Ekspresi protein yang terjadi tanpa penginduksi menandakan terjadinya *leaky expression* atau ekspresi level basal (Pratiwi, 2019). Ekspresi level basal terjadi apabila konformasi tetramer repressor *lac* berubah dan terlepas dari operator *lac* sehingga promotor T7 aktif untuk mengekspresikan protein target. *Leaky expression* dapat terjadi karena represi promotor tidak efisien, sehingga transkripsi akan terus berlangsung walaupun tidak diberikan induksi.

Promotor seperti ini tidak dapat digunakan untuk ekspresi gen yang mungkin toksik terhadap pertumbuhan *E. coli* (Fulcrand *et al.*, 2016). Kemungkinan terjadinya *leaky expression* ini harus diverifikasi dengan memastikan apakah protein tersebut adalah protein target misalnya dengan melakukan elektroforesis terhadap kontrol negatif (*E. coli*

tanpa plasmid pembawa gen target) atau dengan metode *Western blot* terhadap fraksi terlarut dan tidak terlarut. Untuk mencegah terjadinya *leaky expression* dapat dilakukan beberapa cara misalnya menumbuhkan sel pada media dengan glukosa atau gliserol dalam konsentrasi kecil sebelum ditambahkan IPTG, atau mengganti penginduksi dengan arabinosa.



Gambar 1. Elektroforegram SDS-PAGE sampel pada suhu 28 °C, dengan induksi IPTG konsentrasi 0,1; 0,5; 1 mM dan tanpa induksi (BSA: *Bovine Serum Albumin*, M: *Marker*, S1: sebelum induksi, S2: setelah induksi, S3: fraksi intrasel, SS: supernatan).

Pada penambahan konsentrasi IPTG 0,1 mM, terlihat pita protein muncul pada sekitar 35 kDa yang menandakan keberadaan protein target yaitu fusi scFv-BAD. Pita sampel SS merupakan supernatan hasil sentrifugasi sampel yang telah disonikasi, menunjukkan bahwa protein dapat terekspresi secara intraseluler. Pita protein yang dihasilkan masih terlihat tipis. Hal tersebut dapat disebabkan oleh proses *destaining* yang dirasa belum cukup sehingga latar belakang tidak bersih sempurna atau dimungkinkan karena konsentrasi protein yang terekspresi tidak cukup pekat.

Pada pita protein dengan konsentrasi IPTG 0,5 mM terlihat lebih tebal dibandingkan dengan konsentrasi IPTG 1 mM, mengindikasikan bahwa fusi scFv-BAD terekspresi dalam konsentrasi yang lebih tinggi. Penggunaan IPTG dengan konsentrasi tinggi dapat membahayakan sel *E. coli* sehingga pertumbuhan sel terhambat dan kemampuan sel untuk mempertahankan plasmid rekombinan yang dibawanya akan terganggu (Marini *et al.*, 2014).

Ekspresi protein pada kondisi suhu 30 °C tanpa penginduksi IPTG dan dengan penambahan IPTG 0,1 mM, tidak

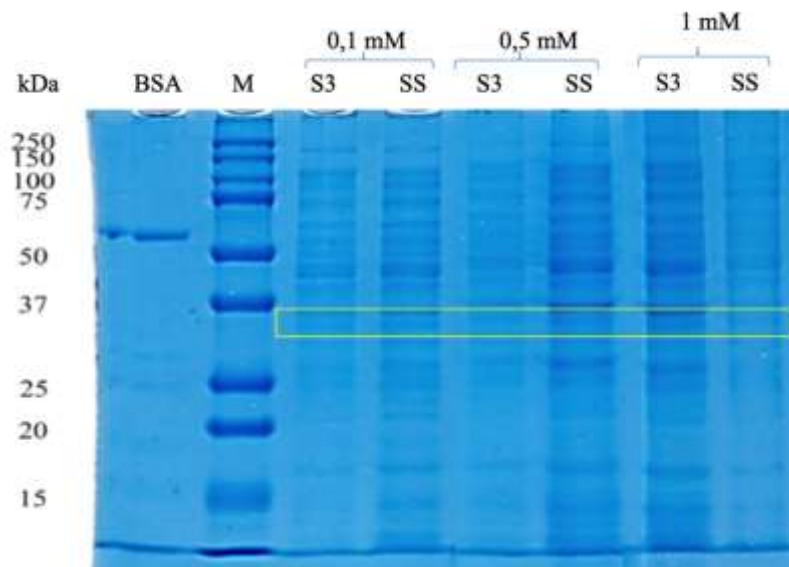
memperlihatkan adanya pita protein pada kondisi terlarut (Gambar 2). Pita protein fusi scFv-BAD terlihat cukup tebal pada kondisi sel setelah mengalami lisis (S4). Hal ini dapat mengindikasikan keberadaan protein terbentuk secara intraselular. Meskipun demikian, pita tidak terlihat pada kondisi setelah mengalami sonikasi (SS), menandakan proses ekspresi berlangsung. Namun dengan tidak terlihatnya pita protein pada supernatan menandakan bahwa protein berada pada keadaan tidak terlarut.

Pada kondisi induksi IPTG sebesar 0,5 mM dengan suhu inkubasi 30 °C menunjukkan bahwa pita protein berada pada kondisi setelah sel mengalami lisis (S4) serta pada larutan supernatan yang menandakan protein target diekspresikan secara intraseluler. Pada konsentrasi 0,5 mM menunjukkan pita protein berada pada fase terlarut, sedangkan pada konsentrasi 1 mM menunjukkan pita protein berada setelah lisis, yang menandakan protein berada pada intrasel.

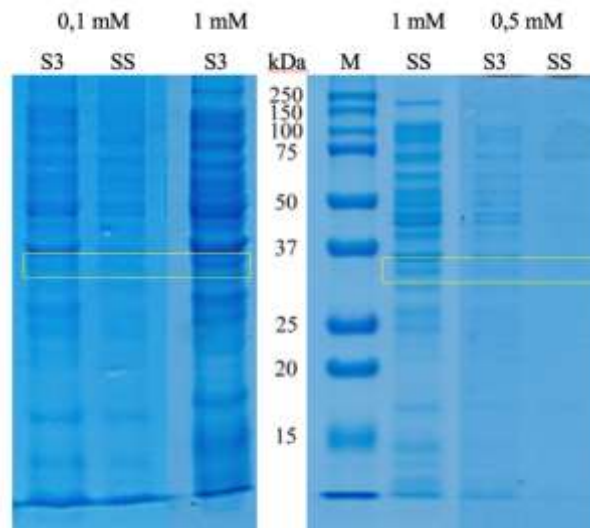
Gambar 2 memperlihatkan hasil SDS-PAGE pada kondisi ekspresi dengan penambahan penginduksi IPTG konsentrasi 1 mM pada suhu 30 °C dimana pita protein berada pada kondisi sel telah mengalami proses lisis (S4). Keberadaan pita protein tersebut menunjukkan bahwa protein dapat terekspresi dalam bentuk tidak terlarut.

Pada kondisi ekspresi suhu 37 °C, tidak terlihat pita protein dari sampel supernatan (Gambar 3). Suhu 37 °C merupakan suhu yang optimum untuk pertumbuhan bakteri *E. coli* pada penambahan penginduksi IPTG konsentrasi 0,1 mM, dimana pita protein terlihat berada pada kondisi sel setelah mengalami lisis. Pada kondisi ekspresi dengan peningkatan suhu memungkinkan bakteri mengalami metabolisme yang lebih cepat. Kebutuhan sumber karbon adanya menjadi penting, mengingat media LB merupakan media standar dalam proses ekspresi protein rekombinan, serta memiliki sedikit sumber karbon bila dibandingkan dengan media tumbuh lainnya (Gaciarz *et al.*, 2017).

Pada kondisi ekspresi dengan penambahan IPTG 0,5 mM (Gambar 3) terlihat bahwa pita protein tidak dihasilkan dalam bentuk terlarut. Pada kondisi penambahan IPTG sebesar 1 mM, menggambarkan adanya pita protein setelah sampel melalui proses lisis menggunakan sonikator, tetapi konsentrasi lebih rendah diperlihatkan pada supernatan yang diperoleh. Hal tersebut dapat menjadi indikasi terbentuknya badan inklusi yang menyebabkan protein tidak larut. Untuk memastikan hal tersebut, fraksi tidak terlarut dianalisis menggunakan SDS-PAGE dengan terlebih dahulu dipreparasi menggunakan urea dan pemanasan agar dapat berubah menjadi bentuk terlarut.



Gambar 2. Elektroforegram SDS-PAGE sampel pada suhu 30 °C, dengan induksi IPTG konsentrasi 0,1; 0,5; 1 mM (S3: fraksi intrasel, SS: supernatan).



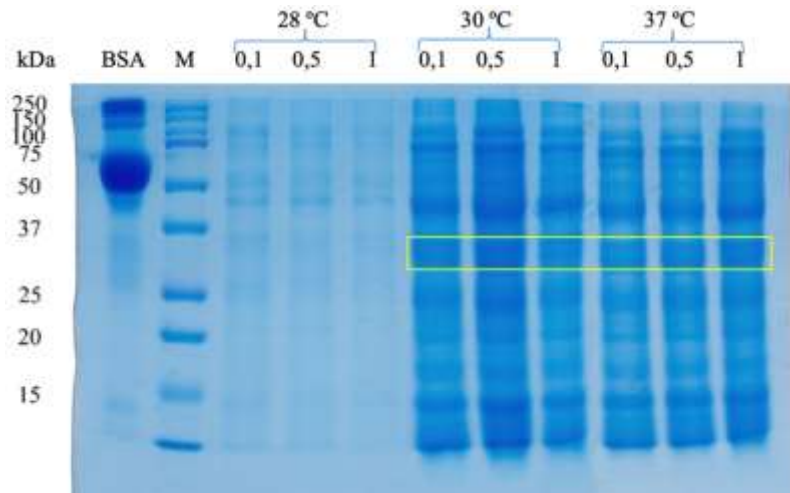
Gambar 3. Elektroforegram SDS-PAGE sampel pada suhu 37 °C, dengan induksi IPTG konsentrasi 0,1; 0,5; 1 mM (M: Marker, S3: fraksi intrasel, SS: supernatan).

Keberadaan protein dalam badan inklusi dapat dibuktikan dengan melakukan preparasi menggunakan larutan urea pada fraksi tidak terlarut yang diperoleh dari hasil sentrifugasi setelah mengalami proses sonikasi, dan kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 15 menit yang bertujuan untuk menghilangkan bahan penyusun membran sel bakteri *E. coli* serta melepaskan ikatan antar protein untuk

meningkatkan kelarutan (Palmer & Wingfield, 2012). Setelah itu, sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan protein dengan material bakteri berdasarkan perbedaan berat molekul serta dianalisis menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE. Bagi sebagian besar protein rekombinan, pembentukan ikatan disulfida yang benar sangat penting untuk mencapai konformasi tiga dimensi yang aktif secara

biologis. Pembentukankatan disulfida yang salah dapat menyebabkan kesalahan lipatan

protein dan membentuk agregat menjadi badan inklusi.



Gambar 4. Elektroforegram SDS-PAGE fraksi tidak terlarut pada suhu 28, 30 dan 37 °C, dengan induksi IPTG konsentrasi 0,1; 0,5; 1 mM (BSA: *Bovine Serum Albumin*, M: *Marker*).

Berdasarkan hasil elektroforesis SDS-PAGE dari fraksi tidak terlarut, menunjukkan bahwa pada kondisi suhu 28°C tidak ditemukan adanya pita protein (Gambar 4). Keberadaan protein tidak terlarut terdapat pada kondisi suhu 30 dan 37°C. Hal ini sejalan dengan hasil elektroforesis sampel terlarut, dimana tidak teramatinya pita protein target pada kondisi suhu 30 dan 37°C.

Namun kondisi berbeda terdapat pada kondisi ekspresi suhu 37°C, dimana pada konsentrasi penginduksi IPTG 1 mM, menunjukkan keberadaan pita protein terlarut. Berdasarkan Nor (2010), rentang induksi IPTG yang optimal berada di bawah 2 mM, serta rekomendasi umum digunakan yaitu 1 mM. Meskipun demikian, pada beberapa penelitian, ekspresi protein dengan konsentrasi IPTG 1 mM membentuk badan inklusi (Valente *et al.*, 2006; Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani & Maghsoudi, 2016). Interpretasi keberadaan

protein scFv pada elektroforegram SDS-PAGE dapat dilihat pada Tabel 3.

Penurunan suhu dapat menurunkan laju ekspresi sehingga mencegah terbentuknya badan inklusi karena tersedia lebih banyak waktu untuk proses pelipatan (Marini *et al.*, 2014). Penggunaan suhu tinggi selama proses ekspresi protein, serta induksi konsentrasi tinggi di bawah sistem promotor yang kuat seringkali mengakibatkan ekspresi protein yang diinginkan berada pada laju translasi yang tinggi. Hal ini menyebabkan habisnya sistem kendali mutu protein bakteri dan sebagian protein terlipat serta yang mengalami salah pelipatan pada akhirnya bersatu membentuk badan inklusi (Singh *et al.*, 2015).

Permasalahan utama dalam ekspresi protein rekombinan pada sistem *E. coli* adalah pembentukan badan inklusi (Salehinia *et al.*, 2018). Kelarutan protein rekombinan dapat ditingkatkan pada kondisi suhu yang rendah,

tetapi kecepatan pertumbuhan dan sintesis protein mungkin akan menurunkan pula jumlah protein yang diekspresikan. Pembentukan badan inklusi dapat pula menjadi sebuah keuntungan, dimana protein akan mudah untuk

dimurnikan sepanjang protein rekombinan tersebut kemudian dapat dilipat-ulang (*refolding*) (Fathi-Roudsari, Akhavian-Tehrani & Maghsoudi, 2016).

Tabel 3. Interpretasi keberadaan protein scFv pada elektroforegram SDS-PAGE

Suhu (°C)	Konsentrasi IPTG			
	0 mM (Non-Induksi)	0,1 mM	0,5 mM	1 mM
28	✓	✓	✓	✓
30	-	✓	✓	✓
37	-	-	-	✓

*✓= terdapat pita protein target dalam bentuk terlarut

Elektroforegram SDS-PAGE yang diperoleh menunjukkan pita protein yang tipis, yang kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi scFv-BAD yang kecil. Untuk memperoleh tampilan pita protein lebih jelas, salah satunya dapat dilakukan dengan melakukan pewarnaan gel menggunakan *silver stain*. Teknik pewarnaan ini merupakan metode pewarnaan protein yang cepat dan sensitif, dimana *silver stain* dapat menampakkan protein yang terdapat dalam matriks gel dengan jelas pada konsentrasi 0,05-0,006 ng, hal tersebut menunjukkan bahwa pewarnaan dengan *silver stain* 100 kali lebih sensitif dibandingkan pewarnaan dengan *Coomassie brilliant blue* serta memungkinkan untuk mendeteksi protein pada konsentrasi yang lebih rendah.

Penentuan kondisi optimum ekspresi gen fusi scFv-BAD

Untuk mengetahui kondisi kultur optimum pada ekspresi protein scFv-BAD rekombinan, digunakan *Response Surface Method* (RSM). Nilai faktor signifikansi dioptimasi menggunakan *Central Composite Design* (CCD), difokuskan untuk memperoleh respon konsentrasi protein yang maksimum dan optimal dengan adanya pengaruh suhu dan konsentrasi IPTG pada kultur. Desain tersebut digunakan sebagai kombinasi metode matematika dan statistik untuk menguji nilai-nilai respon melalui pemodelan dan analisis beberapa variabel independen yang mempengaruhi respon (Chrast *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016).

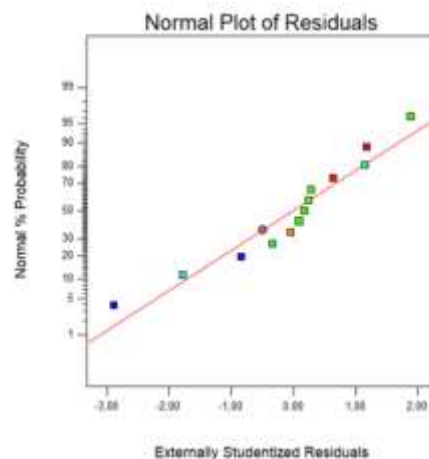
Model CCD yang dipilih terdiri dari dua faktor, yaitu konsentrasi IPTG dan suhu inkubasi pada tiga level. Ekspresi dari protein

rekombinan adalah respon yang diukur dalam eksperimen. Desain dan respon kondisi eksperimen ditampilkan pada Lampiran 9. Dari kombinasi secara acak, didapatkan tiga belas perlakuan yang dilakukan metode ekspresinya sesuai desain yang telah ditentukan. Kadar protein rekombinan dihitung berdasarkan persamaan regresi linier standar BSA dengan koefisien determinasi 0,9982.

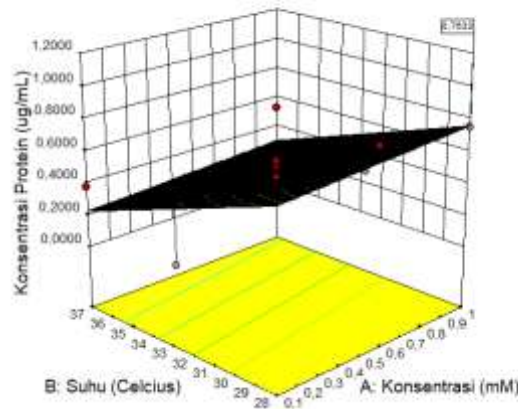
Model yang diperoleh berdasarkan hasil analisis adalah $Y = 0,4961 + 0,03586X_1 - 0,231345X_2$, dimana Y = konsentrasi protein, X_1 = konsentrasi IPTG, dan X_2 = suhu inkubasi. Berdasarkan persamaan regresi tersebut, faktor suhu memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon konsentrasi protein. Hal

tersebut diperoleh dari nilai *slope* faktor suhu yang cukup signifikan.

Hasil analisis varians (ANOVA) untuk desain yang digunakan menunjukkan bahwa model CCD yang signifikan disarankan sesuai data yang diperoleh adalah model linear karena nilai probabilitas (P-value) < 0,05, yaitu 0,0287. R^2 yang diperoleh adalah 0,5085 yang mengindikasikan kecocokan antara nilai prediksi dan nilai sebenarnya masih terlalu jauh dimana semakin jauh dari angka 1 sehingga semakin jauh kecocokan antara nilai prediksi dengan nilai aktual. Sedangkan nilai *adeq. Precision* yang mengukur *signal to ratio* (S/N) pada penelitian ini adalah 6,24. Hal ini menunjukkan bahwa sinyal yang dihasilkan memadai karena lebih besar dari 4 (Gambar 5).



Gambar 5. Plot nilai residual (menggunakan perangkat lunak *Design-Expert*®) dari ekspresi protein fusi scFv-BAD mengikuti distribusi normal (sebarannya berada pada daerah garis lurus) artinya nilai regresi memenuhi asumsi normalitas (Asumsi normalitas yaitu mengidentifikasi bahwa semua sampel yang diuji memiliki karakteristik yang sama).



Gambar 6. Grafik plot kontur permukaan tiga dimensi dari interaksi variabel suhu dan konsentrasi IPTG terhadap respon ekspresi protein fusi scFv-BAD melalui desain *Response Surface Method*.

Interaksi antar variabel yaitu pengaruh dari konsentrasi IPTG dan suhu terhadap ekspresi protein rekombinan ditunjukkan dalam bentuk plot kontur permukaan. Berdasarkan pada plot kontur permukaan tersebut, parameter konsentrasi IPTG tidak berpengaruh signifikan terhadap respon konsentrasi protein, sedangkan untuk parameter suhu inkubasi sangat berpengaruh pada respon, dimana semakin tinggi suhu inkubasi akan semakin rendah respon yang diperoleh (Gambar 6). Optimasi lebih lanjut dapat dilakukan dengan penambahan parameter waktu panen sehingga diperoleh konsentrasi scFv yang lebih optimum.

E. coli secara luas digunakan dan diketahui sesuai untuk ekspresi protein rekombinan dengan suhu optimum 37 °C, tetapi saat diperlukan ekspresi tinggi, kemampuan *E. coli* untuk mengekspresikan protein rekombinan secara akurat menurun, dan dapat terbentuk badan inklusi. Suhu lingkungan yang rendah dapat meningkatkan kelarutan protein,

tetapi kecepatan pertumbuhan dan sintesis yang lebih rendah dapat mengakibatkan menurunnya jumlah protein yang terbentuk (Singh *et al.*, 2015).

Kombinasi yang baik dari sistem ekspresi dan inang yang digunakan sangat penting untuk memperoleh ekspresi protein rekombinan dalam jumlah yang banyak dalam bentuk pelipatan yang benar. Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan bahwa sebagian protein rekombinan fusi scFv-BAD dihasilkan dalam bentuk terlarut dan sebagian lagi dalam bentuk badan inklusi.

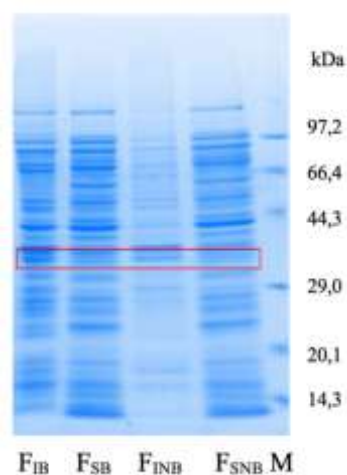
Berdasarkan hasil ekspresi protein rekombinan scFv-BAD dan optimasi kondisi optimum pada penelitian ini, suhu inkubasi 28 °C dipilih sebagai suhu yang paling optimum menghasilkan protein fusi scFv-BAD dalam keadaan terlarut dengan konsentrasi IPTG 0,5 mM. Keberhasilan untuk memproduksi suatu protein rekombinan sangat dipengaruhi oleh optimasi penggunaan kodon, inang yang

digunakan, serta suhu lingkungan pada proses ekspresi. Suhu rendah dengan penambahan konsentrasi inducer rendah pada waktu inkubasi yang lama adalah faktor-faktor lingkungan yang paling efektif untuk memperoleh protein rekombinan terlarut yang optimum (Sina, Farajzadeh & Dastmalchi, 2015). Kondisi optimum yang telah diperoleh tersebut kemudian digunakan untuk produksi scFv rekombinan dalam skala yang lebih besar.

Ekspresi protein fusi scFv-BAD selanjutnya dilakukan dalam 250 mL medium LB dengan penambahan biotin dan ampisilin. Kultur diinduksi dengan IPTG 0,5 mM dilanjutkan inkubasi pada suhu 28 °C selama 18 jam dan kecepatan 200 rpm. Kultur sel dipanen dan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan PBS lalu disonikasi, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada

suhu 4 °C. Protein fusi scFv-BAD yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE. Pada Gambar 7 dapat dilihat bahwa hasil ekspresi menunjukkan adanya pita protein dengan bobot molekul 35 kDa pada fraksi supernatan hasil sonikasi kultur. Fraksi ini kemudian digunakan untuk tahap pemurnian selanjutnya.

Berbagai parameter dapat berpengaruh pada ekspresi dan kelarutan protein rekombinan yang diproduksi, diantaranya adalah sekuens kodon, pemilihan vektor ekspresi dan inang, serta faktor lingkungan. Kesesuaian antara sistem ekspresi dan inang sangat penting untuk mengekspresikan protein rekombinan dalam bentuk terlarut. Pada penelitian ini digunakan vektor pET-21b(+) yang telah secara luas digunakan untuk memproduksi protein rekombinan terlarut dalam jumlah yang banyak, salah satunya karena vektor ini membawa promotor T7 (Smith *et al.*, 2012).



Gambar 7. Elektroforegram SDS-PAGE hasil ekspresi scFv-BAD dalam 250 mL media Luria Bertani dengan konsentrasi IPTG 0,5 mM pada suhu 28 °C (F_{IB}: Fraksi tidak terlarut dengan biotinisasi, F_{SB}: Fraksi terlarut dengan biotinisasi, F_{INB}: Fraksi tidak terlarut tanpa biotinisasi, F_{SNB}: Fraksi terlarut tanpa biotinisasi, M: Marker)

SIMPULAN

Gen sintetik penyandi scFv-BAD yang disisipkan pada plasmid pET21b(+) dapat diekspresikan pada sel inang *E. coli* Origami dan menghasilkan protein fusi scFv-BAD rekombinan dengan bobot molekul 35 kDa. Parameter suhu dan konsentrasi IPTG mempengaruhi tingkat ekspresi protein fusi scFv-BAD, dimana kondisi optimum yang diperoleh dengan menggunakan analisis statistik *Central Composite Design* (CCD) adalah ekspresi pada suhu 28 °C dan konsentrasi IPTG 0,5 mM yang menghasilkan protein target dengan konsentrasi 2,7 µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah memberikan dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Halabi, L. & Meyer, T. 2010. In Vivo Biotinylated scFv Fragments. *Antibody Engineering*. 2:219–226.

Amin, H.Z. & Sungkar, S. 2013. Perkembangan Mutakhir Vaksin Demam Berdarah Dengue. *eJournal Kedokteran Indonesia*. 1(3):226–233.

Balder Werin. 2019. Optimising IPTG and Lactose Induction of Recombinant Expression with Flow-based Online Analysis. *Master Thesis*.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., *et al.* 2013. The global distribution and burden of dengue.

Nature. 496(7446):504–507.

Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J.M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R. & Neiers, F. 2016. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 6(September):1–11.

Chrast, L., Chaloupkova, R. & Damborsky, J. 2018. Gram-scale production of recombinant microbial enzymes in shake flasks. *Microbiol Lett*. 365(2):1–22.

Cui, X., Vasylieva, N., Shen, D., Barnych, B., Yang, J., He, Q., Jiang, Z., Zhao, S., *et al.* 2018. Biotinylated single-chain variable fragment-based enzyme-linked immunosorbent assay for glycocholic acid. *Analyst*. 143(9):2057–2065.

Fathi-Roudsari, M., Akhavian-Tehrani, A. & Maghsoudi, N. 2016. Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 8(1):1–7.

Fatima, A., Wang, H., Kang, K., Xia, L., Wang, Y., Ye, W., Wang, J. & Wang, X. 2014. Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. *PLoS ONE*. 9(4):1–12.

Fulcrand, G., Dages, S., Zhi, X., Chapagain, P., Gerstman, B.S., Dunlap, D. & Leng, F. 2016. DNA supercoiling, a critical signal regulating the basal expression of the lac operon in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 6(19243):1–12.

- Gaciarz, A., Khatri, N.K., Velez-Suberbie, M.L., Saaranen, M.J., Uchida, Y., Keshavarz-Moore, E. & Ruddock, L.W. 2017. Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media. *Microbial Cell Factories*. 16(1):1–12.
- Li, R.F., Wang, B., Liu, S., Chen, S.H., Yu, G.H., Yang, S.Y., Huang, L., Yin, Y.L., *et al.* 2016. Optimization of the Expression Conditions of CGA-N46 in *Bacillus subtilis* DB1342(p-3N46) by Response Surface Methodology. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 8(3):277–283.
- Marini, G., Luchese, M.D., Argondizzo, A.P.C., de Góes, A.C.M.A., Galler, R., Alves, T.L.M., Medeiros, M.A. & Larentis, A.L. 2014. Experimental design approach in recombinant protein expression: Determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. *BMC Biotechnology*. 14(1):1–13.
- Oktaviani, E. & Ekaningias, M. 2019. Analisis Protein Isolat Bakteri *Escherichia coli* BL 21 menggunakan Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE). *Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains (PENBIOS)*. 4(1):1–7.
- Palmer, I. & Wingfield, P.T. 2012. Preparation and extraction of insoluble (Inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*. 1(SUPPL.70):1–25.
- Poungpair, O., Bangphoomi, K., Chaowalit, P., Sawasdee, N., Saokaew, N., Choowongkamon, K., Chaicumpa, W., & Yenchitsomanus, P. T. 2014. Generation of human single-chain variable fragment antibodies specific to dengue virus non-structural protein 1 that interfere with the virus infectious cycle. *MAbs*, 6(2), 474–482.
- Pratiwi, R.D. 2019. Optimasi Ekspresi Human Epidermal Growth Factor (h-EGF) Rekombinan dalam *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan Variasi Media dan Konsentrasi Penginduksi. *Chimica et Natura Acta*. 7(2):91–97.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5:1–17.
- Salehinia, J., Sadeghi, H.M.M., Abedi, D. & Akbari, V. 2018. Improvement of solubility and refolding of an anti-human epidermal growth factor receptor 2 single-chain antibody fragment inclusion bodies. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 13(6):566–574.
- Scaturro, P., Cortese, M., Chatel-Chaix, L., Fischl, W. & Bartenschlager, R. 2015. Dengue Virus Non-structural Protein 1

- Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathogens*. 11(11):1–32.
- Silaban, S., Simorangkir, M., Maksun, I.P., Subroto, T. & Hasan, K. 2018. Pengaruh Suhu pada Ekspresi Pretrombin-2 Manusia Rekombinan di *Escherichia coli* ER2566. *Jurnal Sains Indonesia*. 42(2):25–30.
- Sina, M., Farajzadeh, D. & Dastmalchi, S. 2015. Effects of environmental factors on soluble expression of a humanized anti-TNF- α scFv antibody in *Escherichia coli*. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 5(4):455–461.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A.K., Singh, S.M. & Panda, A.K. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*. 14(1):1–10.
- Smith, L.E., Yang, J., Goodman, L., Huang, X., Huang, R., Dressman, J., Morris, J., Silva, R.A.G.D., *et al.* 2012. High yield expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-II in *Escherichia coli*. *Journal of Lipid Research*. 53(8):1708–1715.
- Valente, C.A., Monteiro, G.A., Cabral, J.M.S., Fevereiro, M. & Prazeres, D.M.F. 2006. Optimization of the primary recovery of human interferon α 2b from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*. 45(1):226–234.
- Wang, Huimin, Zhao, F., Han, X., & Yang, Z. 2016. Production and characterization of a biotinylated single-chain variable fragment antibody for detection of parathion-methyl. *Protein Expression and Purification*, 126, 1–8.