

Produksi dan Pemurnian *Human Epidermal Growth Factor* (hEGF) Rekombinan Menggunakan Metode *Heat Treatment*, Fraksionasi Amonium Sulfat dan Kromatografi Filtrasi Gel

Iman P. Maksum^{1,*}, Alifa I. Nabila¹, Sunan M. Alpriansyah¹, Sriwidodo², Toto Subroto¹

¹Laboratorium Biomolekular Kesehatan dan Pangan, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat 45363

²Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363

*Penulis korespondensi: iman.permana@unpad.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v7.n2.22128>

Abstrak: *Human Epidermal Growth Factor* (hEGF) adalah suatu protein yang membantu dalam proses penyembuhan luka, dalam hal proses proliferasi, migrasi dan diferensiasi sel. Protein hEGF dengan tingkat kemurnian tinggi sangat diperlukan agar mencapai aktivitas yang maksimal untuk pengaplikasian sebagai protein terapeutik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakteristik hEGF rekombinan setelah pemurnian menggunakan metode *heat treatment*, fraksionasi amonium sulfat dan kromatografi filtrasi gel, dan menentukan kadar protein hEGF setelah dimurnikan dengan metode ELISA dan Lowry. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah produksi protein hEGF skala fermentor pada sel inang *E. coli*. Supernatan hasil produksi dipanaskan pada suhu 80°C. Supernatan hasil pemanasan difraksionasi dengan penambahan garam amonium sulfat hingga terbentuk endapan. Endapan disuspensikan dalam larutan amonium bikarbonat yang selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom filtrasi gel Sephadex G-25. Serapan dan konduktivitas dari tiap fraksi diukur. Hasil pemurnian dikarakterisasi dengan SDS-PAGE dan diukur kadar protein dengan ELISA dan Lowry. Hasil penelitian menunjukkan hEGF rekombinan berhasil diproduksi pada inang *E. coli* BL21 (DE3) [pD881-PelB-hEGF] dengan kadar sebesar 121,76 µg/mL. Produk protein rekombinan berhasil dimurnikan dengan metode *heat treatment*, fraksionasi amonium sulfat, dan kromatografi filtrasi gel dengan kemurnian sebesar 66,11%.

Kata kunci: hEGF, fermentor, *heat treatment*, fraksionasi, kromatografi filtrasi gel

Abstract: *Human Epidermal Growth Factor* (hEGF) is a protein that helps in the healing process of wounds, in the process of proliferation, migration and cell differentiation. Human epidermal growth factor protein with high purity is required to achieve maximum activity for application as therapeutic proteins. The purposes of this study are to determine the characteristics of recombinant hEGF after purification using ammonium sulfate fractionation and gel filtration chromatography, and to determine the level of hEGF protein after purified by ELISA and Lowry methods. The method used in this study was hEGF protein fermenter scale production in *E. coli* host cells. Supernatant from production was heated at 80°C. The supernatant from heat treatment was fractionated with ammonium sulfate salts until formed precipitate. The precipitate was taken and suspended in a solution of ammonium bicarbonate. Afterwards, the dissolved precipitate was purified with gel filtration chromatography Sephadex G-25. The absorbance and conductivity of each fraction was measured. The results were characterized using SDS-PAGE and measured the level of protein using ELISA and Lowry methods. The result of this research recombinant hEGF can be produced by using the *E. coli* BL21 (DE3) [pD881-PelB-hEGF] host with a yield of 121.76 µg/mL. Recombinant protein product was purified by using heat treatment method, fractionation of ammonium sulfate, and gel filtration chromatography with a purity level of 66.11%.

Keywords: hEGF, fermentor, *heat treatment*, fractionation, gel filtration chromatography

PENDAHULUAN

Human Epidermal Growth Factor (hEGF) merupakan protein hormon rantai tunggal yang terdiri atas 53 residu asam amino tanpa alanin, fenilalanin, dan lisin, serta memiliki enam residu sistein yang membentuk tiga ikatan disulfida yang membuatnya aktif secara biologis dan memiliki berat molekul 6,2 kDa (Wong *et al.* 2016; Melati *et al.* 2019). Protein hEGF merupakan hormon yang berfungsi untuk menginduksi proliferasi dan metabolisme sel-sel epitel pada berbagai sel *in vivo* dan *in vitro*, sehingga banyak digunakan sebagai agen penyembuhan berbagai luka kronis dan juga sebagai kosmetik untuk meregenerasi sel kulit dan mempertahankan elastisitas (Pouranvari *et al.* 2016; Maksum *et al.* 2017).

Awalnya hEGF diisolasi dari urin manusia (Pouranvari *et al.* 2016), namun, jumlah hEGF yang terdapat pada urin sedikit dan dibutuhkan beberapa tahap pemurnian yang dapat mengurangi jumlah hEGF dari kadar awalnya (Tong *et al.* 2001). Oleh karena itu dikembangkanlah teknologi DNA rekombinan sebagai cara paling efektif untuk produksi hEGF rekombinan pada skala komersial (Zhinan *et al.* 2000; Indriyanti *et al.* 2019). Salah satu inang yang banyak digunakan dalam produksi protein rekombinan adalah *Escherichia coli* (Silaban *et al.* 2019). Inang *E. coli* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan inang lainnya, media pertumbuhan yang murah, pertumbuhannya cepat, dan tingkat ekspresi protein yang tinggi (Melati *et al.* 2019; Silaban *et al.* 2014; Maksum *et al.* 2019).

Komponen kunci untuk keberhasilan mengkomersialkan berbagai produk *biopharmaceutical* adalah kemampuannya untuk mencapai produksi skala besar. Tujuan utama dari penelitian mengenai fermentasi yaitu untuk mengefektifkan biaya dari produksi protein yang diinginkan dengan memaksimalkan produktivitas volumetrik. Beberapa bioproses untuk produksi protein rekombinan menggunakan organisme yang telah dimodifikasi secara genetik membutuhkan kondisi kultur yang stabil, proses fermentasi dengan produktivitas tinggi, biaya yang efektif dan prosedur pemurnian (Tripathi *et al.* 2009).

Perolehan volumetrik dari protein rekombinan merupakan fungsi dari konsentrasi unit sel dan perolehan protein selular spesifik. Optimisasi dari proses fermentasi *High Cell Density Cultivation* (HCDC) merupakan salah satu dari langkah kunci meningkatkan perolehan volumetrik dari protein rekombinan. Fermentasi HCDC merupakan perhatian utama dari rekayasa bioproses untuk meningkatkan setiap perolehan dari protein rekombinan pada *E. coli*. Memahami dasar aspek biologis dari sistem ekspresi pada tingkat molekular dan menerjemahkannya pada tingkat proses sangat penting untuk produksi protein rekombinan dengan biaya yang efektif dan efisien (Tripathi *et al.* 2009).

Teknik HCDC untuk mengkultur *E. coli* telah dikembangkan untuk meningkatkan produktivitas dan menyediakan beberapa keuntungan, seperti mengurangi volume kultur, meningkatkan proses hilir, mengurangi limbah, mengurangi biaya produksi dan mengurangi modal untuk peralatan. Sistem HCDC juga memiliki beberapa kekurangan, di antaranya terbatasnya ketersediaan oksigen terlarut, tingkat karbon dioksida yang dapat mengurangi pertumbuhan sel dan menstimulasi pembentukan asetat, berkurangnya efektivitas pencampuran dari fermentor dan timbulnya panas. Pada fermentasi HCDC, memaksimalkan konsentrasi sel membantu dalam meningkatkan produktivitas dari produksi protein rekombinan (Tripathi *et al.* 2009).

Untuk memaksimalkan aktivitas protein hEGF sebagai protein terapeutik, protein hEGF dengan tingkat kemurnian yang tinggi sangat diperlukan. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memurnikan protein hEGF dengan menggunakan beberapa metode, di antaranya dengan menggunakan metode kromatografi afinitas (Bakhshi *et al.* 2012). Biaya yang mahal dan kesulitan dalam memisahkan protein target dari resin menjadi kekurangan dari metode tersebut (Silaban dkk. 2017; Maksum, dkk. 2017). Selain itu, pembuatan kolom afinitas yang sulit karena menggunakan resin yang spesifik untuk hEGF. Oleh karena itu, digunakanlah metode pemurnian lain untuk memurnikan protein hEGF hasil produksi skala fermentor yaitu dengan menggunakan serangkaian metode pemurnian, yaitu metode *heat treatment*, fraksinasi dengan amonium sulfat, dan kromatografi filtrasi gel (Sriwidodo *et al.* 2017).

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas umum yang digunakan di Laboratorium Penelitian Departemen Kimia. Selain itu digunakan peralatan pendukung lainnya seperti AKTA START (GE Healthcare), alat elektroforesis gel agarosa dan SDS-PAGE (Biorad Power Pac™ Basic), *autoclave sterilizer* (Hirayama Autoclave HVE-50), ELISA kit (Biotech), EZ Read 400 Mikroplate Reader (Biochorm), Fermentor (SM), *ice bath*, *ice maker* (GPERGA), *Laminar Air Flow* (LAF), konsentrator (Eppendorf), *magnetic stirrer* (HMS-79 Magenetic Heated), milipore, *mini spin* (Eppendorf), neraca timbang (Mettler Toledo AL204), oven, pH meter (Mettler Toledo InLab pH combination polymer electrodes), pipet mikro, sentrifugator (Tomy MX-305), *shaking incubator* (N-Biotek), sonikator (Vibra Cell 20 kHz), spektrofotometer UV/visibel (Ultrospec 3000 pro UV/Vis), tabung falcon, tabung mikro, tabung mikrosentrifugasi, tip pipet mikro, alat sinar ultraviolet $\lambda_{312\text{nm}}$ (Vilber Lourmat TCP-20M), vortex (Boeco V-1 plus), dan *water bath* (Poly Science).

Bahan-bahan digunakan dalam penelitian ini yaitu agar bacto (Oxoid), agarose (Sigma-Aldrich), akuabides, amonium bikarbonat (Merck), ammonium persulfat (Bio Basic INC), amonium sulfat (Merck), asam asetat glasial (Merck), asam sulfat (Merck), aquabides (IKA), bromfenol blue, *comassive brilliant blue*, EDTA (1st Base), *E. coli* BL21(DE3)[pD881-PelB-hEGF] hasil dari penelitian sebelumnya oleh Sriwidodo *et al.* (2017) (California, USA), ekstrak ragi (1st Base), glycerol (1st Base), kalium dihidrogen fosfat (Merck), kanamisin sulfat (Sigma-Aldrich), L-rhamnosa (Sigma-Aldrich), marka protein (Biorad), magnesium klorida (Merck), magnesium sulfat (Merck), natrium hidroksida (Merck), natrium klorida (Merck), natrium nitrat (Merck), SDS (Merck), sukrosa (Merck), Sephadex G-25, tris base (Merck), tricine (Sigma-Aldrich), tripton (1st Base), Urea (Merck).

Preparasi Medium Fermentasi, Feeding dan Bufer

Proses produksi dilakukan dengan skala 2 L dengan komposisi medium untuk konsentrasi komponen satu kali meliputi ekstrak ragi (5 g/L), tripton (10 g/L), natrium klorida (10 g/L), sukrosa (12 g/L), gliserol (3.53 g/L), magnesium sulfat (0,56 g/L), kalium hidrogen fosfat (18,08 g/L) dan natrium nitrat (0,875 g/L). Bahan-bahan tersebut kemudian dimasukkan ke wadah fermentor dan ditambahkan akuades steril sampai volume 2 L, lalu dilarutkan dan disterilisasi dengan *autoclave*.

Komposisi *feeding* yang digunakan meliputi gliserol (12,5 mL), tripton (85 mg/mL), ekstrak ragi (43 mg/mL) dan magnesium sulfat (5,3 mg/mL). Bahan-bahan tersebut kemudian dimasukkan ke botol *schott* steril dan ditambahkan akuades steril sampai volume 100 mL, lalu dilarutkan dan disterilisasi dengan *autoclave*. Untuk asam dan basa yang digunakan pada proses fermentasi adalah asam sulfat dan natrium hidroksida. Masing-masing disiapkan sebanyak 100 mL dengan konsentrasi 5 M, setelah itu disterilisasi dengan *milipore*.

Fermentasi *E. coli* BL21(DE3)[pD881-PelB-hEGF], Sampling dan Panen

Proses fermentasi dimulai dengan pembuatan inokulum, koloni tunggal pada LB padat diambil menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke 20 mL medium LB cair yang telah ditambahkan 20 µL kanamisin, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, pengocokkan 200 rpm selama 18 jam. Tahapan selanjutnya yaitu merangkai wadah fermentor berisi medium yang sudah steril dengan rotor, pH meter dan detektor lain yang tersambung dengan komputer untuk *monitoring*. Selain itu selang *feeding*, asam dan basa juga dihubungkan ke wadah fermentor. Setelah itu fermentor dinyalakan dengan kondisi fermentasi meliputi pH 7, suhu 37°C, pengadukan 250 rpm, oksigen terlarut 30-40% dan dimasukkan kanamisin sebanyak 2 mL. Kemudian sebanyak 20 mL inokulum dimasukkan ke medium fermentasi.

Proses fermentasi dilakukan dengan dua tahapan, yaitu fase HCDC pada 4 jam pertama, kemudian setelah 4 jam dilanjutkan dengan fase *fed-batch*. Fase *fed-batch* dilakukan dengan mengalirkan *feeding*, kecepatan *feeding* yang digunakan yaitu 3 mL/jam. Waktu induksi mulai dihitung setelah fase *fed-batch* dimulai. Konsentrasi L-rhamnosa yang digunakan untuk penginduksian yaitu 4 mM. Proses sampling dan pengecekan OD₆₀₀ dilakukan pada awal *feeding*, t0, t3, t5, t8 dan t20.

Pemurnian Protein hEGF dengan Metode Heat Treatment

Kultur *E. coli* BL21 (DE3) [pD881-PelB-hEGF] t20 hasil fermentor, diambil dan dimasukkan ke dalam beberapa tabung falcon berukuran 50 mL, lalu dipisahkan pelet sel dan supernatannya dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 g, 4°C selama 20 menit. Supernatan hasil produksi skala fermentor dipanaskan di dalam penangas air dengan suhu 80°C selama 30 menit. Hasilnya kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g, suhu 4°C, selama 30 menit. Supernatan dan endapan dipisahkan untuk kemudian dikarakterisasi.

Pengendapan Protein hEGF dengan Garam Amonium Sulfat

Supernatan hasil metode *heat treatment* diambil dan ditambah dengan garam amonium sulfat sampai kejenuhan 100%. Hasil pengendapan kemudian didiamkan semalam, lalu campurannya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 25.000 g selama 20 menit pada suhu 0°C. Endapan yang diperoleh digunakan untuk pengerjaan selanjutnya.

Pemurnian Protein hEGF dengan Kromatografi Filtrasi Gel Sephadex G-25

Protein hasil pengendapan dengan garam amonium sulfat disuspensikan dalam 25 mL larutan amonium bikarbonat 50 mM pH 7,8, kemudian dimasukkan ke dalam kolom filtrasi gel Sephadex G-25 (terintegrasi dalam alat AKTA Prime) yang telah disetimbangkan dengan larutan amonium bikarbonat 50 mM pH 7,8, dan sebagai larutan pengelusnya adalah larutan amonium bikarbonat 50 mM pH 7,8. Eluat-eluatnya ditampung dalam sejumlah tabung masing-masing 3 mL dengan laju alir 1 mL/menit. Serapan dari tiap fraksi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm dan konduktivitasnya diukur dengan alat konduktivimeter. Kemudian dibuat kurva antara serapan terhadap fraksi dan konduktivitas terhadap fraksi. Puncak yang muncul diambil untuk dikarakterisasi.

Karakterisasi Protein hEGF dengan Tricine SDS-PAGE

Sebanyak 15 µL sampel dicampurkan dengan 5 µL bufer reduksi sampel di dalam tabung mikro. Campuran tersebut kemudian dipanaskan pada suhu

37°C selama 15 menit pada water *bath*. Kemudian 20 μL campuran dan marka protein sebanyak 7 μL dimasukkan ke dalam sumur gel yang berbeda. Kabel elektrode dipasangkan dengan perangkat elektroforesis kemudian gel dielektroforesis pada 30 V sampai batas *stacking gel* dan kuat arus dinaikkan sampai 100 V ketika sampel berada pada resolving gel selama ± 120 menit. Gel kemudian dilepaskan dari glass plate sandwich, kemudian direndam dalam larutan staining (*Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25%, metanol 45%, asam asetat 10%), lalu diinkubasi pada suhu 25°C dalam keadaan gelap disertai pengocokan lambat selama ± 18 jam. Selanjutnya gel dicuci menggunakan akuades kemudian disimpan dalam larutan destaining hingga pewarna gel yang berlebih hilang. Gel kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 6 jam. Gel yang memiliki pita-pita protein kemudian direkam sebagai elektroforegram.

Pengukuran Kadar hEGF dengan Metode ELISA

Sebanyak 250 pg/mL standar hEGF dilarutkan dengan 5 mL pelarut RD5E satu kali. Kemudian dari larutan standar hEGF (250 pg/mL), dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan pelarut RD5E satu kali sampai diperoleh 7 konsentrasi standar hEGF (125 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,3 pg/mL; 15,6 pg/mL; 7,81 pg/mL; 3,91 pg/mL dan 0 pg/mL).

Sebanyak 1 mL supernatant dari hasil panen kultur jam ke-20 setelah induksi dan hasil pemurnian diambil sebanyak 10 μL kemudian dicampurkan supernatan dalam 990 μL pelarut RD5E satu kali (pengenceran 100 kali), kemudian 10 μL pengenceran 100 kali dicampurkan ke dalam 990 μL pelarut RD5E satu kali (Pengenceran 10.000 kali), kemudian 10 μL pengenceran 10.000 kali dicampurkan ke dalam 990 μL pelarut RD5E satu kali (Pengenceran 1.000.000 kali).

Masing-masing 200 μL standar hEGF dan sampel dimasukkan ke dalam setiap sumur pada plat ELISA, kocok perlahan kemudian diinkubasi selama dua jam pada suhu ruang. Larutan dalam sumur dibuang kemudian dicuci dengan menambahkan 400 μL bufer pencuci ke dalam setiap sumur, larutan pencuci dibuang kemudian sumur dikeringkan dengan meletakkan plat di atas kertas penyerap. Pencucian dilakukan sebanyak tiga kali. Sebanyak 200 μL konjugasi hEGF dimasukkan ke dalam setiap sumur, lalu plat diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang. Larutan dari sumur dibuang dan dicuci sebanyak tiga kali dengan bufer pencuci. Sebanyak 200 μL larutan substrat dimasukkan ke dalam setiap sumur, lalu diinkubasi plat selama 20 menit pada suhu ruang dan terlindungi dari sinar matahari. Kemudian ditambahkan dengan segera 50 μL *stop solution* pada setiap sumur dan segera dilakukan pengukuran absorbansinya pada $\lambda_{450\text{nm}}$ dengan koreksi $\lambda_{540\text{nm}}$ dan $\lambda_{570\text{nm}}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

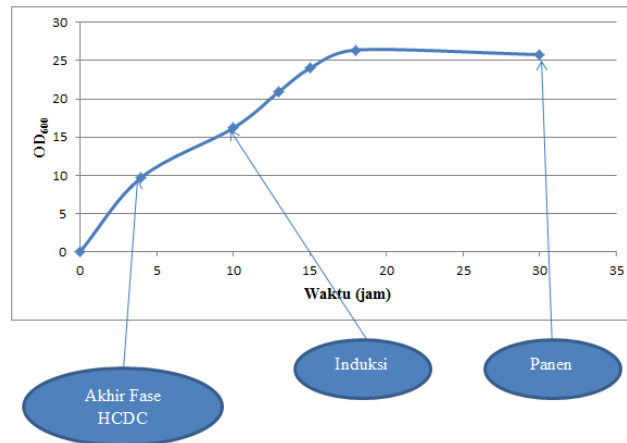
Produksi hEGF rekombinan secara ekstraselular memberikan beberapa keuntungan terutama untuk proses panen dan pemurnian, sehingga banyak dilakukan penelitian untuk mencari kondisi optimum yang dapat mendorong ekspresi ekstraselular hEGF rekombinan secara maksimal dari sel inang *E. coli*. Salah satu kondisi yang dioptimalkan yaitu waktu induksi dan konsentrasi komponen medium. Selain itu, tahap pemurnian dari protein hEGF sendiri sangatlah penting untuk menghasilkan protein hEGF yang dapat digunakan sebagai protein rekombinan.

Produksi hEGF Rekombinan Skala Fermentor

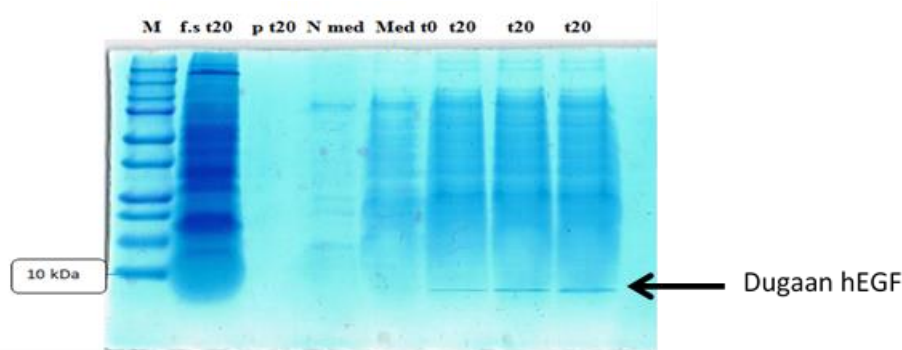
Pada produksi skala fermentor ini proses yang digunakan adalah *fed-batch* dan HCDC. Tahapan HCDC dilakukan pada empat jam pertama yang berfungsi untuk meningkatkan konsentrasi sel pada kultur. Tahapan ini dilakukan dengan cara menumbuhkan sel pada medium yang kaya akan sumber karbon, di antaranya sukrosa, dengan cara ini maka akan meningkatkan laju pertumbuhan sel secara signifikan. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 1, dimana pada jam keempat nilai OD_{600} sudah mencapai angka 9,74. Kemudian pada jam keempat dilakukan *feeding* pertama yang menandakan dimulainya tahapan *fed-batch*. Tahapan *fed-batch* dilakukan untuk menjaga laju pertumbuhan sel dan laju ekspresi hEGF rekombinan pada kultur. Waktu induksi mulai dihitung setelah dilakukannya tahapan *fed-batch*, sehingga induksi dilakukan 5 jam 45 menit setelah dimulainya *fed-batch* dan panen dilakukan 20 jam setelah dilakukannya induksi.

Gambar 1 menunjukkan bahwa selama tahapan *fed-batch* pertumbuhan sel meningkat walaupun laju pertumbuhan selnya mengalami penurunan. Laju pertumbuhan sel kembali meningkat setelah dilakukannya induksi dengan L-ramnosa. Namun pada kurva tersebut ditunjukkan bahwa nilai OD_{600} antara jam kedelapan setelah induksi sampai waktu panen mengalami penurunan, padahal secara teori selama proses *fed-batch* seharusnya pertumbuhan sel selalu mengalami kenaikan karena adanya *feeding* (Zhang *et al.* 2009; Yee & Blanch 1992). Penurunan nilai OD_{600} ini dapat disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi asetat selama proses fermentasi di atas jam kedelapan setelah induksi, dengan meningkatnya konsentrasi asetat akan menyebabkan cekaman bagi sel yang menghambat laju pertumbuhan sel (Tripathi *et al.* 2009).

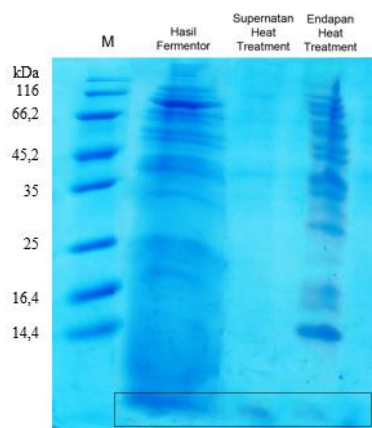
Hasil panen produksi skala fermentor kemudian dikarakterisasi dengan Tricine SDS-PAGE. Pada proses panen dilakukan sampling pada tiga lapisan yang berbeda dari kultur fermentor supaya mempermudah dalam menghomogenkan sampel kultur yang akan digunakan untuk karakterisasi dengan ELISA. Karakterisasi dengan Tricine SDS-PAGE dilakukan pada protein fraksi medium dan juga fraksi terlarut yang hasilnya ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Kurva konsentrasi sel *E. coli* transforman PeIB selama proses HCDC dan *fed-batch* pada produksi skala fermentor. Jam ke: 0-4 merupakan akhir fase HCDC; Jam ke: 4-20 merupakan fase eksponensial; Jam ke: 20-30 merupakan fase stasioner. *Feeding* dimulai pada jam ke-4 dan induksi dilakukan 5,79 jam setelah dimulainya *fed-batch*. Kurva pertumbuhan dibuat dengan metode turbidimetri.



Gambar 2. Elektrogram Tricine SDS-PAGE hasil panen skala fermentor. Lajur M: Marka protein (200; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15 dan 10 kDa); Lajur f.s t20: Protein fraksi terlarut pada jam ke-20 setelah induksi; Lajur N med: Protein fraksi medium *E. coli* BL21 *native*, Lajur mt0-t20: Protein fraksi medium pada jam ke 0-20 setelah induksi.



Gambar 3. Elektrogram hasil *heat treatment* pada suhu 80°C selama 30 menit. Lajur M: Marka protein (116; 66,2; 45,2; 35; 25; 16,4 dan 14,4 kDa); Lajur Hasil Fermentor: Supernatan kultur pada media fermentor; Lajur Supernatan *Heat Treatment*: Hasil pemurnian *heat treatment* sebagai fraksi protein-protein yang tahan panas; Lajur Endapan *Heat Treatment*: Sebagai fraksi protein-protein yang tidak tahan panas (terdenaturasi).

Berdasarkan Gambar 2, ditunjukkan bahwa terdapat pita protein di bawah berat molekul 10 kDa, setelah dibandingkan log berat molekul protein dan mobilitas relatifnya didapatkan bahwa berat molekulnya 6,2 kDa, sehingga dapat disimpulkan bahwa hEGF rekombinan berhasil diekspresikan. Bentuk pita yang tebal dan tegas menandakan bahwa hEGF rekombinan diekspresikan dalam kadar yang tinggi. Pada protein fraksi terlarut, pita protein hEGF rekombinan yang dihasilkan tidak terlalu tegas namun warnanya tebal dan jelas, tidak tegasnya pita tersebut dapat disebabkan proses denaturasi protein selama proses SDS-PAGE yang tidak sempurna karena larutan protein fraksi terlarut sangat pekat. Proses denaturasi protein yang tidak sempurna menyebabkan protein masih dalam bentuk globular ketika running SDS-PAGE dan laju pergerakannya menjadi tidak konstan (Rath *et al.* 2009).

Pemurnian dengan Menggunakan Metode *Heat Treatment*

Hasil protein hEGF yang didapatkan dari produksi menggunakan fermentor diinkubasi pada suhu 80°C selama 30 menit di penangas air. Setelah itu, hasilnya disentrifugasi (kecepatan 10.000 g, suhu 4°C, selama 30 menit) kemudian dipisahkan endapan dan supernatannya. Endapan dan supernatan kemudian dikarakterisasi dengan SDS-PAGE.

Karakterisasi SDS-PAGE hasil *heat treatment* pada suhu 80°C (Gambar 3) menunjukkan bahwa terdapat protein hEGF pada fraksi supernatan hasil *heat treatment* (ditandai dengan kotak hitam) dengan perhitungan berat molekul sebesar ±6,3 kDa. Protein-protein lainnya yang berada pada fraksi endapan hasil *heat treatment* adalah protein-protein yang telah terdenaturasi karena tidak tahan panas. Dari hasil elektroforegram di atas, dapat dibuktikan bahwa protein hEGF memiliki sifat tahan terhadap panas.

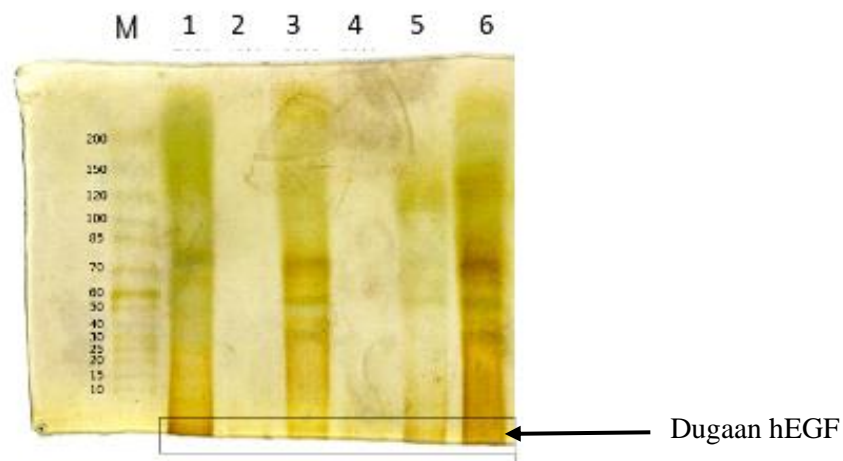
Pengendapan Protein hEGF dengan Fraksinasi Amonium Sulfat

Kondisi optimal kejenuhan amonium sulfat untuk fraksinasi sangat dibutuhkan untuk mendapatkan hasil yang optimal pada fraksinasi. Kondisi kejenuhan yang digunakan untuk optimasi adalah 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%, 0-100% amonium sulfat.

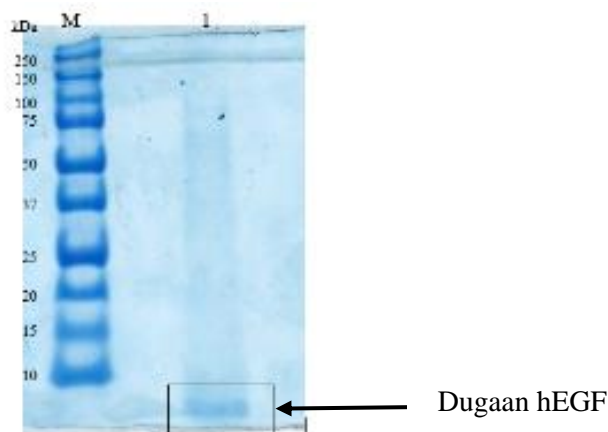
Protein hEGF hasil fermentor dikocok secara perlahan dengan menggunakan pengocok magnetik sambil ditambahkan garam amonium sulfat sebanyak kebutuhan kondisi kejenuhan ke dalamnya. Larutan kemudian disimpan selama 30 menit di dalam lemari es dengan suhu -20°C untuk menyempurnakan interaksi yang terjadi. Setelah didiamkan selama 30 menit, larutan tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 20.000 g, suhu 4°C, selama 60 menit. Endapan yang telah disuspensikan kemudian dikarakterisasi dengan SDS-PAGE untuk melihat kondisi yang optimal.

Pada elektroforegram hasil optimisasi kondisi kejenuhan garam amonium sulfat dengan pewarnaan elektroforegram menggunakan metode *quick silver staining* (Chevallet *et al.* 2006) (Gambar 4) menunjukkan bahwa terdapat pita protein yang cukup terlihat di bawah pita marka 10 kDa pada lajur 3 dan 5, yaitu pita protein hEGF (ditandai dengan kotak hitam) dengan perhitungan berat molekul sebesar ±6,4 kDa. Penggunaan kondisi kejenuhan garam amonium sulfat yang optimal untuk mengendapkan protein hEGF yaitu pada 40-100%.

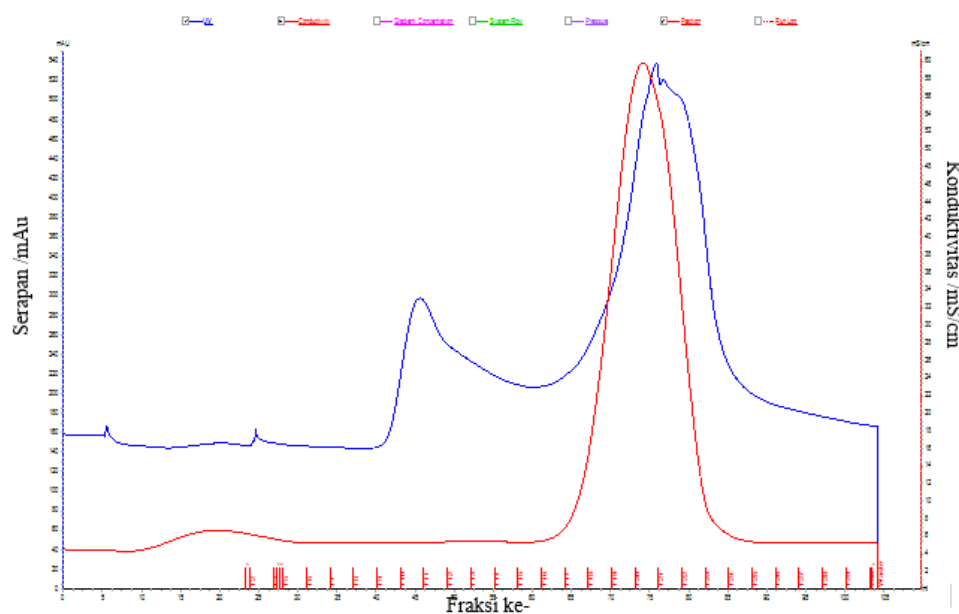
Karena telah ditemukan kondisi kejenuhan optimal (Gambar 4), sampel hEGF hasil produksi fermentor kemudian diendapkan dengan penambahan garam amonium sulfat kejenuhan 40-100%.



Gambar 4. Elektroforegram hasil optimisasi kondisi kejenuhan garam amonium sulfat untuk fraksinasi protein hEGF. Lajur M: Marka protein (200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15 dan 10 kDa). Lajur 1-6: Penambahan amonium sulfat dengan kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, 80-100%, 0-100%. Kondisi kejenuhan optimal diperoleh dengan penambahan ammonium sulfat pada 40-60% dan 80-100%. Pita hEGF ditunjukkan dengan kotak hitam.



Gambar 5. Elektrofogram hasil fraksinasi dengan amonium sulfat. Lajur M: Marka protein (250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15 dan 10 kDa); Lajur 1: Sampel dengan penambahan garam amonium sulfat kejenuhan 40-100%, yang menunjukkan ada dugaan hEGF rekombinan (di bawah 10 kDa).



Gambar 6. Kromatogram filtrasi gel Sephadex G-25 hasil pengendapan protein hEGF. Garis biru menunjukkan serapan pada panjang gelombang 280 nm. Garis merah menunjukkan konduktivitas. Kolom yang digunakan C18 *fast flow*, $V=1\text{m/s}$. Eluen menggunakan larutan bufer ammonium bikarbonat 50 mM pH 7,8.

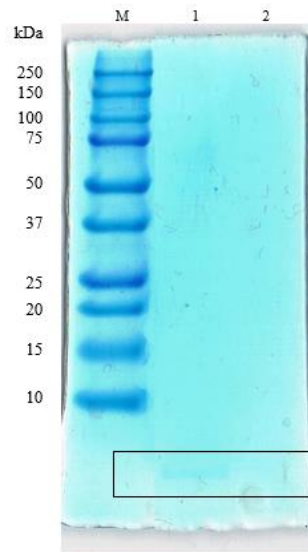
Hasil dari karakterisasi menggunakan SDS-PAGE (Gambar 5) menunjukkan bahwa terdapat protein hEGF pada endapan hasil fraksinasi (ditandai dengan kotak hitam) dengan perhitungan berat molekul sebesar $\pm 6,3$ kDa dan menunjukkan pita yang cukup tebal. Protein hEGF dapat diendapkan dengan baik pada kondisi kejenuhan amonium sulfat 40-100%.

Pemurnian Protein hEGF dengan Kromatografi Filtrasi Gel Sephadex G-25

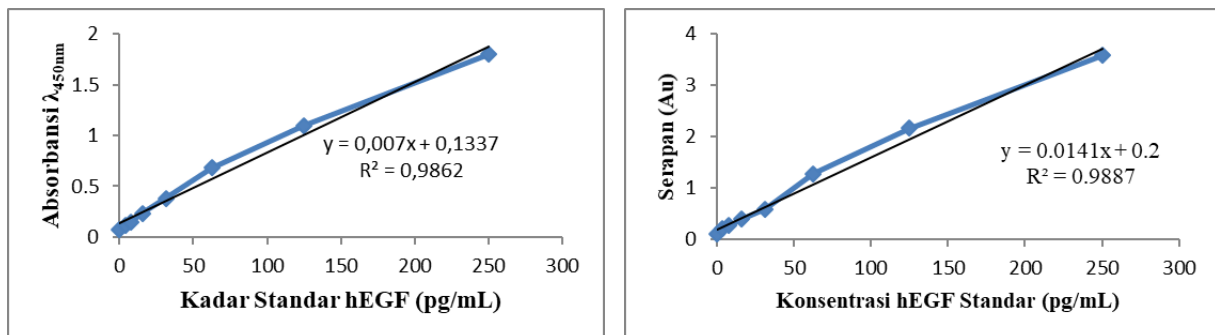
Larutan sampel hasil pengendapan dengan amonium sulfat kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi filtrasi gel Sephadex G-25 yang terintegrasi AKTA Prime dengan larutan bufer

amonium bikarbonat 50 mM pH 7,8. Kecepatan tetesan diatur sehingga laju alirnya adalah 1 mL/menit. Volume tiap fraksi yang ditampung adalah sebanyak 3 mL. Fraksi-fraksi yang ditampung, diukur pada panjang gelombang 280 nm dan diukur konduktivitasnya, hasilnya dapat ditunjukkan pada Gambar 6.

Hasil dari kromatografi filtrasi gel tersebut (Gambar 6) terbentuk dua puncak protein pada fraksi 10 dan fraksi 20. Fraksi 10 terpisah dengan garam, sedangkan untuk fraksi 20 tidak terpisah dengan garam. Hasil uji kadar dengan metode ELISA untuk fraksi 10 dan fraksi 20 menunjukkan bahwa fraksi 10 ($2,79 \mu\text{g/mL}$) mengandung lebih banyak protein hEGF dibandingkan dengan fraksi 20 ($0,38 \mu\text{g/mL}$).



Gambar 7. Elektroforegram Tricine SDS-PAGE hasil pemurnian dengan kolom filtrasi gel Sephadex G-25. Lajur M: Marka protein (250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15 dan 10 kDa); Lajur 1: Sampel dengan penambahan garam amonium sulfat kejenuhan 40-100%, yang menunjukkan ada dugaan hEGF rekombinan (di bawah 10 kDa).



(a)

(b)

Gambar 8. (a) Kurva baku standar ELISA hasil produksi skala fermentor. (b) Kurva baku standar ELISA hasil pemurnian.

Hal ini menunjukkan bahwa protein hEGF yang terdapat dalam sampel memiliki berat molekul yang lebih tinggi dari besar pori-pori Sephadex G-25 sehingga tidak tertahan di dalam matriks.

Fraksi 10 dan fraksi 20 dari hasil dengan pemurnian menggunakan kolom Sephadex G-25 kemudian dikarakterisasi dengan SDS-PAGE (Gambar 7). Pada Gambar 7 menunjukkan bahwa pada fraksi 10 terdapat pita di bawah marka 10 kDa yang menunjukkan bahwa pita tersebut adalah pita protein hEGF dengan berat molekul $\pm 6,2$ kDa. Pada lajur yang berisi fraksi 20, tidak ditemukannya pita pada elektroforegram.

Pengukuran Kadar hEGF Rekombinan Hasil Fermentor dan Hasil Pemurnian dengan Metode ELISA

Penentuan kadar protein hEGF dilakukan dengan protokol kit ELISA (R&D systems a biotechnne brand – Quantikine ELISA – hEGF). Tahap pertama yang

dilakukan adalah preparasi standar, preparasi sampel, dan pembuatan reagen-reagen yang diperlukan. Standar dan sampel diencerkan dengan faktor pengenceran yang disesuaikan dengan kadar protein target. Standar protein hEGF diencerkan bertingkat untuk membuat kurva baku standar.

Sumur mengandung antibodi primer yang berfungsi untuk menangkap standar atau sampel hEGF. Setelah itu, sampel ditempatkan pada pelat ELISA yang telah dipetakan dan diinkubasi selama 2 jam di suhu ruang. Sisa larutan kemudian dibuang dan dicuci menggunakan bufer pencuci sebanyak tiga kali. Larutan bufer pencuci harus hilang sempurna untuk maju ke langkah berikutnya. Setelah itu, ditambahkan larutan konjugasi hEGF ke dalam setiap sumur dan diinkubasi selama satu jam di suhu ruang. Konjugasi hEGF yang mengandung anti-hEGF ini akan terikat pada protein hEGF yang sebelumnya telah terikat di sumur ELISA (Indriyani *et al.* 2019).

Tabel 1. Hasil ELISA untuk ringkasan hasil pemurnian. ELISA menggunakan kit dari Qiayee Biotechnology. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Sampel	Pengenceran	Absorbansi	Kadar hEGF (pg/mL)	Kadar hEGF Dikalikan Faktor Pengenceran (µg/mL)
Hasil Fermentor	2.000.000	0,3861	13,20	26,40
Heat Treatment	2.000.000	0,3059	7,51	15,02
Fraksionasi	2.000.000	0,3198	8,50	16,99
G-25 Fraksi 10	20.000	2,1653	139,38	2,79

Tabel 2 Hasil perhitungan kadar protein total dengan metode Lowry. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 750 nm. *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan sebagai standar.

Sampel	Absorbansi	Kadar Protein (µg/mL)
Hasil Fermentor	1,058	450,74
Heat Treatment	0,169	64,22
Fraksionasi	0,131	47,69
G-25	0,031	4,22

Tabel 3. Ringkasan hasil pemurnian protein hEGF

Sampel	Kadar Protein hEGF (µg/mL)	Kadar Protein Total (µg/mL)	Kemurnian (%)
Hasil Fermentor	26,4	450,74	5,86
Heat Treatment	15,02	64,22	23,39
Fraksionasi	16,99	47,69	35,62
Sephadex G-25	2,79	4,22	66,11

Selanjutnya dilakukan kembali pencucian dengan bufer pencuci untuk menghilangkan larutan konjugasi hEGF yang tidak mengikat protein hEGF. Kemudian larutan substrat ditambahkan ke dalam semua sumur dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Enzim pada larutan konjugasi hEGF akan mengubah substrat sebagai indikator yang akan menentukan berapa konsentrasi hEGF yang terkandung dalam setiap sampel. Enzim akan mengubah substrat menjadi produk yang ditandai dengan perubahan warna dari tidak berwarna menjadi biru. Kemudian ditambahkan *stop solution* untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi. Setelah ditambahkan, larutan akan berubah warna menjadi warna kuning yang menandai reaksi enzimatik berhenti. Selanjutnya, pelat ELISA dipindai dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm. Intensitas warna kuning yang dihasilkan sesuai dengan serapan dan konsentrasi hEGF yang dihasilkan.

Hasil absorbansi dari standar hEGF akan dibandingkan dengan sampel untuk menentukan kadar hEGF rekombinan pada sampel. Kurva baku standar untuk hasil fermentor ditunjukkan pada Gambar 8(a) dan kurva baku standar untuk hasil pemurnian ditunjukkan pada Gambar 8(b).

Setelah dibandingkan dengan kurva baku standar, didapatkan bahwa kadar hEGF rekombinan yang disekresikan ke medium pada skala fermentor yaitu 121,76 µg/mL.

Dari hasil pengukuran kadar protein hEGF menggunakan metode ELISA, didapatkan bahwa kadar hEGF semakin berkurang seiring dengan dilakukannya tahap-tahap pemurnian (Tabel 1).

Perhitungan Kadar Protein Total dengan Metode Lowry

Penentuan kadar protein total dengan metode Lowry, dilakukan dengan cara membandingkan

serapan sampel dengan suatu kurva baku protein, konsentrasi terhadap serapan. Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kadar protein total menurun seiring dengan proses pemurnian yang dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat banyak protein pengotor yang menghilang seiring dengan penggunaan tahap pemurnian, sehingga protein target menjadi semakin murni.

Ringkasan Hasil Pemurnian Protein hEGF

Kemurnian setelah masing-masing metode pemurnian ditunjukkan pada Tabel 3. Dengan menggunakan tahap-tahap yang telah dilakukan, terjadi peningkatan persentase kemurnian sebesar 66,11%. Hal ini menunjukkan bahwa protein hEGF semakin murni karena semakin sedikit pengotor yang menyertai protein tersebut. Namun perolehan hEGF yang semakin menurun dengan diperoleh sebesar 2,79 µg/mL, maka pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan metode pemurnian protein lainnya seperti menggunakan kromatografi penukar ion (Zhang *et al.* 2015).

KESIMPULAN

hEGF rekombinan dapat diproduksi pada skala fermentor menggunakan inang *E. coli* BL21 (DE3) [pD881-PelB-hEGF] dengan perolehan sebesar 121,76 µg/mL dan dapat dimurnikan dengan menggunakan metode *heat treatment*, fraksinasi amonium sulfat, dan kromatografi filtrasi gel dengan persen kemurnian sebesar 66,11%.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakhshi, M., Ebrahimi, F., Hajizadeh, A. & Alikhani, H.K. (2012). Purification and biological activity assessment: Comparison between two recombinant human epidermal growth factors with different molecular weights. *European Journal of Experimental Biology*. 2(5): 1672–1679.
- Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. 1(4): 1852.
- Indriyani, A., Anggraeni, N.I.S. Sriwidodo, & Maksum, I.P. (2019). Optimization extracellular secretion of recombinant human epidermal growth factor (hEGF) in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pD881-OmpA-hEGF by using response surface method (RSM). *International Journal of Research in Pharmaceutical Science*. 10(3), 1824-1831.
- Maksum, I.P., Budiantoro, O., Hasan, K., Soemitro, S., & Subroto, T. (2017). Pemurnian pretrombin-2pH hasil ko-ekspresi *chaperone* pada *Escherichia coli* ER2566 menggunakan sistem IMPACT. *Chimica et Natura Acta*. 5(2): 57-64.
- Maksum, I.P., Lestari, A., Fauzia, R.P., Rachman, S.D., & Soedjanaatmadja, U.M.S. (2019). *Escherichia coli* BL21 (DE3) expression system using TorA signal peptide for recombinant human albumin (rHA) secretion. *International Journal of Research in Pharmaceutical Research*. 10(4): 3319-3324.
- Maksum, I.P., Utama, E., Sriwidodo, & Subroto, T. (2017). Extracellular secretion of recombinant human epidermal growth factor by using trimethylamine N-oxide reductase A (TorA) signal peptide in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 9: 1007-1016.
- Melati, R., Indriyani, A., Gaffar, S., Sriwidodo, & Maksum, I.P. (2019). Comparison extracellular secretion of recombinant human epidermal growth factor using TorA and PelB signal peptides in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 12(11): 81-84.
- Pouranvari S., Ebrahimi F., Javadi G. & Maddah, B. (2016). Cloning, expression, and cost effective purification of authentic human epidermal growth factor with high activity. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 18(3): 1–8.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G. & Deber, C.M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS*. 6(106): 1760-1765.
- Silaban, S., Gaffar, S., Simorangkir, M., Maksum, I.P., & Subroto, T. (2019). Effect of IPTG concentration on recombinant human prethrombin-2 expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) ArcticExpress. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 217: 012039.
- Silaban, S., Maksum, I.P., Gaffar, S., Hasan, K., Subroto, T., & Soemitro, S. (2014). Codon optimization and chaperone assisted solubilization of recombinant human prethrombin-2 expressed in *Escherichia coli*. *Microbiology Indonesia*. 8(4): 177-182.
- Silaban, S., Maksum, I.P., Hasan, K., Enus, S., Subroto, T. & Soemitro, S. (2017). Pemurnian prethrombin-2 manusia rekombinan di *Escherichia coli* untuk produksi trombin sebagai komponen lem fibrin. *Jurnal Pendidikan Kimia*. 9(1), 265-272.
- Sriwidodo, Subroto, T., Maksum, I.P., Riswanto, N., & Rostinawati, T. (2017) Extracellular secretion recombinant of human epidermal growth factor (hEGF) using pectate lyase B (PelB) signal peptide in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *International Journal of Research in Pharmaceutical Science*. 8: 1-8.
- Tong, W.Y., Yao, J., Zhu, Q. & Yu, J. (2001). An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 674-679.
- Tripathi, N.K., Sathyseelan, K., Jana, A.M. & Rao, P.V.L. (2009). High yield production of

- heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Defence Science Journal*. 59(2), 137-146.
- Wong, W.K.R., RC Huang, E.L., Wong, R.S., Morris, C. & Hackett, J. (2001). Applications, and efficient large-scale production, of recombinant human epidermal growth factor. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 18(1): 51-71.
- Yee, L. & Blanch, H.W. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 10: 1550-1556.
- Zhang, H., Zheng, Y., Liu, Q., Tao, X., Zheng, W., Ma, X., & Wei, D. 2009. Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*. 43(2): 163-168.
- Zhang, Y., Zhang, K., Wan, Y., Zi, J., Wang, Y., Wang, J., Wang, L. & Xue, X. (2015). A p H-induced, intein-mediated expression and purification of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*. 31(3): 758-764.
- Zhinan, X., Gang, L., Peilin, C. & Wong, W.K.R., (2000). Factors influencing excretive production of human epidermal growth factor (hEGF) with recombinant *Escherichia coli* K12 system. *Bioprocess Engineering*. 23(6): 669-674.
-