

Produksi Rekombinan *Bovine Lactoferrin* pada Sistem Ekspresi *Escherichia coli*

(*PRODUCTION OF RECOMBINANT BOVINE LACTOFERRIN
IN ESCHERICIHIA COLI EXPRESSION SYSTEM*)

¹Ni Luh Wayan Yulia Mirayanti *,
²Made Pharmawati, ³I Gusti Ngurah Kade Mahardika,

¹Mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Biologi,
²Program Studi Magister Ilmu Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
³Laboratorium Virologi Veteriner; Laboratorium Biomedik,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jln. Kampus Unud, Bukit Jimbaran, Badung-Bali, Indonesia
*Email: mirayanty24@ymail.com

ABSTRAK

Lactoferrin merupakan glikoprotein berukuran 80 kDa yang memiliki keunggulan dalam aktivitas biologis sebagai antimikroba, antibakteri, antivirus, antiparasit, hingga imunomodulator. Kemajuan bidang teknologi rekombinan memungkinkan untuk menghasilkan protein *lactoferrin* dalam skala besar, sehingga produksi rekombinan *lactoferrin* dapat dilakukan di berbagai sistem ekspresi. *Escherichia coli* menjadi salah satu inang pada sistem ekspresi yang banyak digunakan dalam produksi protein rekombinan. Rekombinan protein *bovine lactoferrin* diproduksi dengan penyisipan gen *bovine lactoferrin* pada plasmid pET 11-a. Gen *bovine lactoferrin* yang telah disisipkan dalam plasmid pET, selanjutnya ditransformasikan dan diekspresikan ke dalam sel inang *E. coli* BL21. Ekspresi protein *bovine lactoferrin* diinduksi dengan penambahan *chaperone* salah satu koekspresi, yang mendampingi sistem sintesis *E. coli* untuk mencapai ekspresi protein yang diinginkan. Ekspresi plasmid pET11a – Bovlacto dalam bakteri *E. coli* didukung oleh inducer L-arabinosa dan IPTG. Gen *bovine lactoferrin* yang tersisip di dalam plasmid rekombinan pET-11a telah mampu diekspresikan dengan baik di dalam bakteri *E. coli* BL21 dengan adanya sinyal hibridisasi pada uji metode *dot blot* dan pita spesifik target yaitu pada kisaran posisi 80-85 kDa hasil elektroforesis *SDS-PAGE*.

Kata-kata kunci: *Chaperone*, IPTG, L-arabinosa, pET11a-BovLacto, Rekombinan *bovine lactoferrin*

ABSTRACT

Lactoferrin is an 80 kDa glycoprotein which has advantages in biological activity as an antimicrobial, antibacterial, antiviral, antiparasitic, and immunomodulatory agent. Advances in recombinant technology have made it possible to produce lactoferrin proteins on a large scale, the production of recombinant lactoferrin can be carried out in various expression systems. *Escherichia coli* is one of the hosts in expression systems that are widely used in the production of recombinant proteins. The recombinant protein lactoferrin is produced by insertion of the bovine lactoferrin gene in the plasmid pET 11-a. The bovine lactoferrin gene that has been inserted into the plasmid pET, transformed and expressed in the cell host of *E. coli* BL21. The bovine lactoferrin protein expression was induced by the addition of a chaperone one of the coexpressions, which accompanied the *E. coli* synthesis system to achieve the desired protein expression. The expression of pET11a - Bovlacto plasmid in *E. coli* was supported by the inducer L-arabinose and IPTG. The bovine lactoferrin gene embedded in the recombinant plasmid pET-11a was able to be well expressed in *E. coli* BL21 with the hybridization signal in the *dot blot* method test and the target specific band, namely in the 80-85 kDa position range of SDS-PAGE electrophoresis results.

Keywords: *Chaperone*, IPTG, L-arabinose, pET11a-BovLacto, recombinant *bovine lactoferrin*

PENDAHULUAN

Lactoferrin merupakan keluarga protein *transferrin* yang berukuran 80 kDa dengan keunggulan mengikat dan mentransfer zat besi (Superti, 2020). Struktur protein *lactoferrin* terdiri atas dua lobus, yaitu lobus N (amino) dan C (karboksi) yang dapat mengikat Fe^{3+} dan dihubungkan oleh *3-turn-helix* (Anghel, 2014). Lobus N memiliki empat residu asam amino (Asp60, Tyr92, Tyr192 dan His253) yang dapat berikatan secara kovalen dengan Fe^{3+} . Mekanisme pengikatan Fe^{3+} yang sama pada lobus C yaitu berikatan dengan empat residu asam amino (Asp395, Tyr433, Tyr526 dan His595) (Moore *et al.*, 1997).

Tingkat konsentrasi *lactoferrin* yang tinggi ditemukan pada kolostrum, namun ditemukan juga pada saliva, sekresi vagina, sekresi hidung, air mata dan cairan rahim (Baker dan Baker, 2004). *Lactoferrin* terlibat dalam berbagai fungsi biologis antara lain antibakteri, antivirus, antiparasit, antiinflamasi, imunomodulator, proliferasi dan diferensiasi sel (Vogel, 2012).

Lactoferrin yang berlimpah pada susu sapi biasa disebut sebagai *bovine lactoferrin* (bLf), dengan rantai polipeptida tunggal sekitar 689 asam amino (Moore *et al.*, 1997). Wang *et al.* (2007), melaporkan bahwa *bovine lactoferrin* mampu meningkatkan kinerja pertumbuhan pada babi melalui aplikasi pakan aditif. Selain itu, bLf terbukti mampu meningkatkan bobot badan ayam pedaging (Aira *et al.*, 2015). European Food Safety Authority atau EFSA (2012), telah mengizinkan penggunaan bLf dalam bahan pakan dan telah dianggap aman, dengan kisaran yang disetujui 133 mg/100 g dalam produk susu, hingga 3.000 mg/100 g dalam susu formula bayi.

Produksi komersial rekombinan bLf mulai dikembangkan sebagai bahan tambahan pakan hingga bahan terapi obat yang aman dan efektif (Montoya *et al.*, 2013). Parachim *et al.* (2012), memaparkan bahwa produksi protein rekombinan dalam sistem ekspresi bakteri telah dikembangkan untuk menghasilkan protein bLf skala industri. Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) menjadi salah satu inang yang mampu memfasilitasi pengekspresian suatu protein dan mampu meningkatkan jumlah salinan vektor *kloning* dalam produksi protein rekombinan (Andersen dan Krummen, 2002).

Turner *et al.* (2005) melaporkan bahwa prinsip utama *kloning* DNA yaitu penyisipan fragmen DNA pada suatu vektor *kloning* atau

DNA plasmid. Penelitian ini menggunakan salah satu plasmid pET 11-a, dan gen target yang disisipkan adalah gen bLf yang berukuran 2357 bp. Gen bLf yang telah disisipkan dalam plasmid pET, selanjutnya ditransformasikan dan diekspresikan ke dalam sel inang *E. coli* BL21 – *chaperone* yang memiliki stabilitas dan kontrol tinggi dalam mengekspresikan protein (Stratagene, 2004).

Vektor ekspresi pET-11a menggunakan promotor T7, sehingga ekspresi protein rekombinan pada *E. coli* BL21 dapat dikontrol oleh promotor L-arabinosa dan *Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside* (IPTG) (Pratiwi, 2019). Seleksi hasil transformasi pada medium seleksi yang mengandung antibiotik berupa amfisilin dan kloramfenikol (Safirah *et al.*, 2016). Berdasarkan uraian tersebut dilakukan studi dengan tujuan untuk melihat hasil ekspresi protein rekombinan *bovine lactoferrin* dalam sistem ekspresi *E. coli*, sehingga data yang dihasilkan dapat digunakan sebagai acuan dalam produksi protein rekombinan *bovine lactoferrin* skala besar.

METODE PENELITIAN

Prosedur Pemesanan Plasmid Rekombinan

Pemesanan plasmid rekombinan dengan gen bLf dimulai dengan ditentukan sekuens DNA yang hendak disintesis dari *GenBank* (Akses No. L19981.1) (Seyfert *et al.*, 1994) (Gambar 1). Gen bLf dibuat secara sintetik dan disisipkan pada plasmid melalui penyedia *Internasional GenScript* (<https://www.genscript.com/>).

Pembuatan Sel Kompeten *E. coli* BL21 - *Chaperone*

Protokol pembuatan sel kompeten *E. coli* BL21- *Chaperone* sesuai metode Mahardika (1995). Plasmid *chaperone* disisipkan ke dalam bakteri kompeten *E. coli* BL21 (Invitrogen) diinkubasi selama 30 menit, selanjutnya diberi perlakuan *heat shock* selama 30 detik dengan suhu 42°C. Ditanam sebanyak 100 μ L *E. coli* BL21-*Chaperone* pada media *Terrific Broth* (TB) dengan kloramfenikol selama 24 jam, setelah itu dilakukan pemanenan dengan sentrifugasi (6.000 rpm). Supernatan dibuang dan endapan ditambahkan ditambahkan 500 μ L $CaCl_2$ dan bakteri kompeten dapat digunakan paling lama 72 jam.

Transformasi Plasmid bLf pada Sel Inang *E. coli* BL21 - *Chaperone*

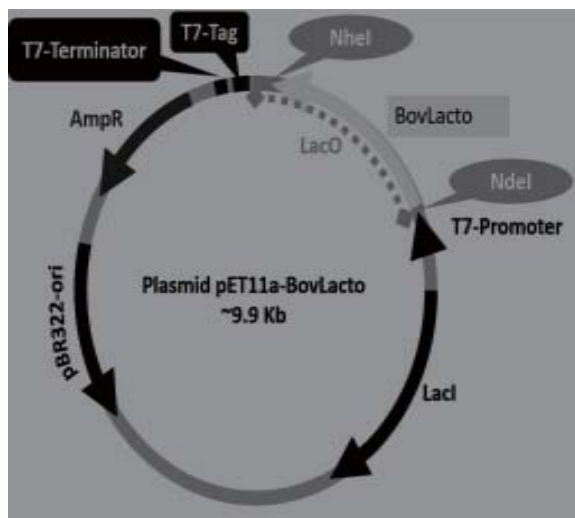
Plasmid pET11a – *Bovlacto* disisipkan dalam bakteri *E. coli* BL21 – *Chaperone* diinkubasi selama 30 menit, selanjutnya diberi perlakuan *heat shock* selama 2 menit dengan suhu 42°C. Ditanam pada medium *Super Optimal Broth* (S.O.C) selama 1 jam, kemudian ditanam pada media agar dengan antibiotik amfisilin (medium seleksi) selama 24 jam. *Pick up* koloni dilakukan pada 5-10 koloni yang tumbuh, ditanam pada media TB dengan amfisilin 2-5 mL media (Mahardika, 1995).

Uji PCR Hasil Transforman

Uji PCR hasil transforman sebanyak 25 µL dimulai dengan dilakukan isolasi DNA pada *chelex*, selanjutnya dimasukkan bahan-bahan PCR dalam tabung *epENDORF* yaitu *GoTaq Green Master Mix* (5 µL), *Nuclease Free Water* (3 µL), primer BovLacto-F (0,5 µL), primer BovLacto-R (0,5 µL) dan sampel (1 µL). Hasil PCR selanjutnya divisualisasi dengan proses elektroforesis gel agarosa.

Kultur Koloni Terpilih

Ditanam 1 mL kultur dengan koloni terpilih yang terkonfirmasi (PCR) pada media TB dengan antibiotik (volume 300-500 mL) dan diinkubasi selama 24 jam. Kultur selanjutnya diinduksi L-arabinosa dengan konsentrasi 0,5 mg/mL selama 1 jam, setelah itu diinduksi IPTG 1 mM dan diinkubasi selama 4-6 jam.



Gambar 1. Vektor pET-11a dengan gen *BovLacto*.

Uji *Dot Blot* Ekspresi Protein *Bovine Lactoferrin* Hasil Kultur

Kultur dengan koloni terpilih (setelah diultrasonikasi) diencerkan sebanyak 1:1 (50 µL TBS: 50 µL sampel) dan dipipet pada membran *Nitro Cellulose* (NC). Dilakukan *blocking* dengan ditambahkan 10 mL susu skim pada membran dan diinkubasi selama 1 jam. Pencucian dengan *Tris Buffer Saline* (TBS) dilakukan setelah 1 jam, kemudian membran diberi perlakuan antibodi primer (10 µL antibodi Lacto + 5 µL TBS). Pencucian kembali dengan TBS dilakukan setelah 1 jam, selanjutnya membran diberi perlakuan antibodi sekunder (10 µL *antigoat* Ig-G AP (Invitrogen) + 5 µL TBS). Pencucian kembali dengan TBS dilakukan setelah 1 jam, perlakuan terakhir pada membran dengan diberikan substrat kromogen (Bio-Rad).

Uji Ekspresi Protein *Bovine Lactoferrin* dengan *Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE)

Kultur dengan koloni terpilih (setelah diultrasonikasi) sebanyak 45 µL ditambahkan 15 µL *buffer* SDS-PAGE, kemudian dipanaskan dalam suhu 95°C selama 10 menit. Disiapkan penanda (2,5 µL), kontrol bakteri *E. coli* BL21 (10 µL), sampel (10 µL) dan *Bovine Serum Albumin* (BSA) konsentrasi 0,1; 1; 2; dan 4 µg/mL. Dipipet masing-masing bahan pada sumur gel yang berbeda, setelah itu *running* alat selama 1 jam (100 volt). Pencucian gel menggunakan *Blue Safe Protein Stain* (*Thermo Scientific*) selama 1 jam (Mahardika, 1995).

Pemanenan dan Inaktivasi Kultur Terpilih dengan Ekspresi Protein Rekombinan

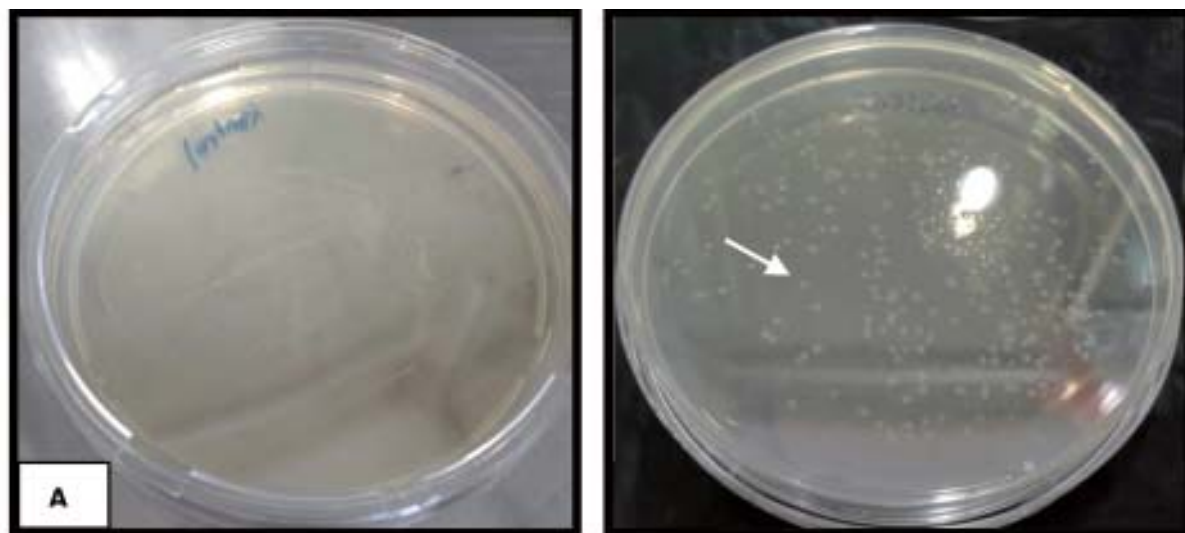
Kultur *E. coli* BL21 sudah terkonfirmasi membawa plasmid pET11a-bLf siap untuk dipanen dengan disentrifugasi selama 10 menit (6.000rpm). Supernatan dibuang, endapan disuspensi dengan NaCl fisiologis dan diberi perlakuan inaktivasi dengan ultrasonikasi selama 30 menit. Ditambahkan dengan 0,1% formaldehid dan diinkubasi selama 24 jam. Kultur hasil inaktivasi ditumbuhkan pada media agar dengan amfisilin. Koloni yang tumbuh, diberi perlakuan inaktivasi kembali sampai tidak ada lagi koloni yang tumbuh. Kultur dengan rekombinan protein bLf sudah siap digunakan (Mahardika, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Plasmid pET11a memiliki gen *ampR* yang dapat memberikan resistansi terhadap amfisilin, sehingga hanya koloni yang mengandung plasmid yang mampu tumbuh pada TB dengan amfisilin. Hasil transformasi plasmid rekombinan (pET11a-*BovLacto*) pada *E. coli* BL21 ditampikan pada Gambar 2. Kontrol negatif digunakan dalam transformasi untuk mengkonfirmasi bahwa TB dengan antibiotik amfisilin yang digunakan dalam keadaan baik tanpa adanya kontaminan (Gambar 2. A). Pada Gambar 2.B ditunjukkan koloni hasil tranformasi yang telah disisipi plasmid rekombinan (pET11a-*BovLacto*).

keunggulan pada membran *Nitro Cellulose* (NC) membuktikan adanya respons antigen-antibodi spesifik. Hal ini membuktikan bahwa gen *bovine lactoferrin* yang tersisip di dalam plasmid rekombinan pET-11a telah mampu diekspresikan dengan baik di dalam bakteri *E. coli* BL21.

Uji ekspresi protein *bovine lactoferrin* dengan elektroforesis SDS-PAGE diperoleh keberadaan pita spesifik yang hanya timbul pada protein *bovine lactoferrin* (sumur 3 dan 4) dengan bobot molekul yang cukup jelas terutama pada posisi antara 80-85 kDa (Gambar 5). Konsentrasi protein total *bovine lactoferrin* dalam sampel bakteri *E. coli* ditentukan dengan mengasumsikan perbandingan antara tebal pita



Gambar 2. Hasil transformasi plasmid rekombinan (pET11a-*BovLacto*) dengan bakteri *Escherichia coli* BL21 pada media selektif amfisilin dan kloramfenikol. (A) Kontrol negatif, dan (B) Hasil transformasi (koloni tunggal ditunjukkan oleh tanda panah).

Hasil amplifikasi PCR (Gambar 3) menunjukkan dari tujuh koloni tunggal (sumur 1-7) yang di *pick up* hasil transformasi plasmid rekombinan (pET11a-*BovLacto*) dengan bakteri *E. coli* BL21 menunjukkan semua koloni positif membawa fragmen gen *bovine lactoferrin* pada posisi 2000 pb. Pita-pita yang dihasilkan dari tujuh koloni tunggal tersebut merupakan pita DNA gen *bovine lactoferrin* yang ukurannya sudah mendekati gen *bovine lactoferrin* yang terdapat pada *GenBank*.



Gambar 3. Hasil analisis *Polymerase Chain Reaction* koloni transformasi plasmid pada *Escherichia coli* BL21 menggunakan pasangan primer *BovLacto-F* dan *BovLacto-R*.

Hasil validasi keberadaan protein *bovine lactoferrin* dengan metode *dot blot* menunjukkan respons positif di semua klon yang dianalisis dari kemunculan warna pada membran (Gambar 4). Hasil positif yaitu warna

target dengan pita BSA yang disiapkan dalam beberapa variasi bobot protein yang berbeda. Protein *bovine lactoferrin* hasil rekombinan belum dilakukan purifikasi, sehingga diasumsikan yang didapatkan dari hasil amplifikasi elektroforesis SDS-PAGE yaitu kuantitas rekombinan protein *bovine lactoferrin* 40 µg/10 µL.

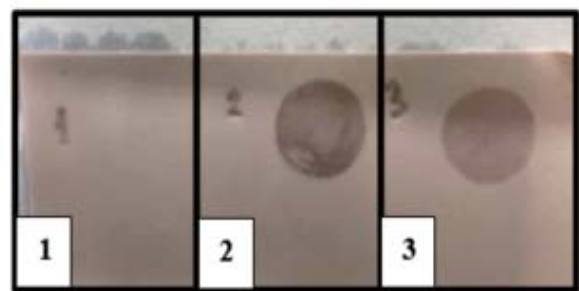
Penelitian ini merupakan percobaan pertama rekombinan protein *bovine lactoferrin* di Indonesia yang berhasil diekspresikan oleh sistem ekspresi bakteri *E. coli* BL21 yang dibuktikan dengan uji PCR, elektroforesis SDS-PAGE dan uji *dot blot*. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa plasmid rekombinan sudah berhasil disintesis. Amplifikasi dengan primer spesifik *bovine lactoferrin* (*BovLacto-F* dan *BovLacto-R*) mendeteksi pita DNA dengan panjang 2000 bp. Hasil deteksi pita DNA dalam penelitian ini sudah mendekati panjang sekuen *bovine lactoferrin* yang terdapat pada *GenBank* yaitu 2351 bp (Goodman dan Schanbacher, 1991). Keberhasilan produksi protein rekombinan ditunjang oleh koekspresi *chaperone* dengan beberapa set molekul pendamping untuk membantu proses pelipatan protein pada *E. coli* yaitu DnaK, DnaJ/ GrpE dan GroEL, GroES (Terada dan Shigeyuki, 2015).

Koekspresi *chaperone* mengekspresikan dua kelompok *chaperone* (*dnaJ*, *dnaK* dan *grpE*) dengan induksi L-arabinosa, yang mengontrol ekspresi protein secara ketat terekspresi hanya saat tersedianya L-arabinosa (Maksum *et al.*, 2019). Plasmid pET11a – Bovlacto menggunakan induser molekuler yaitu IPTG dalam regulasi transkripsi dengan sistem promotor lac yang dapat menunjang ekspresi protein rekombinan dengan *E. coli* (Briand *et al.*, 2016). Khlebnikov *et al.* (2000), melaporkan bahwa induksi IPTG menyebabkan peningkatan dalam transportasi arabinosa, sehingga jumlah arabinosa cukup untuk promotor yang bergantung pada arabinosa.

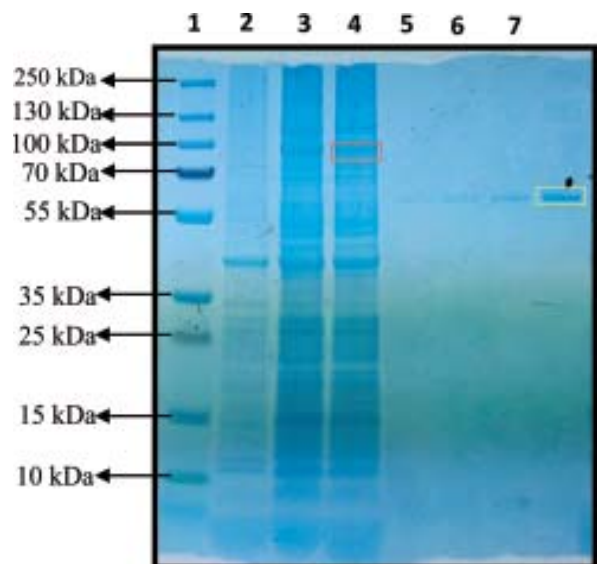
Hasil ekspresi *bovine lactoferrin* dengan uji *dot blot* pada penelitian ini didapatkan signal hibridisasi bahwa protein *bovine lactoferrin* (antigen) yang berukuran 80-85 kDa diikat oleh antibodi spesifik antibodi poliklonal *bovine lactoferrin*. Hasil elektroforesis protein rekombinan *bovine lactoferrin* menggunakan elektroforesis SDS-PAGE pada penelitian ini menghasilkan satu pita protein spesifik yaitu pita protein gen target, karena tidak ditemukan pada kontrol. Sesuai dengan bobot asli protein *lactoferrin* menurut Gonzales-Chaves *et al.*

(2009) yaitu 80 kDa, bobot molekul protein *bovine lactoferrin* dalam analisis elektroforesis SDS-PAGE didapatkan sudah sesuai target yaitu pada kisaran posisi 80-85 kDa. Penelitian Ebrahim *et al.* (2014), melaporkan bahwa protein *bovine lactoferrin* tersusun atas monomer asam amino yang memiliki masa molekul 77-80 kDa.

Hasil penelitian Weiner dan Szuchet (1975), memaparkan bahwa terdapat perbedaan bobot molekul protein *bovine lactoferrin* di setiap penelitian tidak disebabkan oleh perbedaan kondisi eksperimental. Menurut hasil penelitiannya, perbedaan bobot molekul protein



Gambar 4. Hasil deteksi protein *bovine lactoferrin* dengan *dot blot*. Keterangan : (1) bakteri *Escherichia coli* BL21 sebagai kontrol negatif; (2) dan (3) sampel protein *bovine lactoferrin*.



Gambar 5. Hasil analisis protein *bovine lactoferrin* dengan *Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) yang menunjukkan pita-pita protein dengan bobot molekul yang berbeda.

bovine lactoferrin dapat terjadi karena indikasi ketidakseimbangan beberapa bahan agregat dengan monomer *bovine lactoferrin*. Menurut Tomita *et al.* (2009), sekarang ini protein *bovine lactoferrin* sudah diproduksi dalam skala komersial, dengan bobot molekul 78-80 kDa yang diisolasi dari susu skim atau *bovine colostrum*.

Montoya *et al.* (2013), melakukan kloning gen *bovine lactoferrin* ke dalam vektor ekspresi pET-32a, dan mengekspresikannya dalam bakteri *E. coli*. Penelitiannya berhasil mengekspresikan rekombinan *bovine lactoferrin* dalam bakteri *E. coli*, dan protein rekombinan *bovine lactoferrin* yang divisualisasikan sebagai pita protein gen target didapatkan pada posisi 96 kDa.

Rekombinan *human lactoferrin* dan *bovine lactoferrine* sudah banyak dikembangkan untuk produk-produk farmasi. Pada manusia, bLf dan hLf sangat efektif dalam mencegah infeksi virus hepatitis C (HCV). Efektivitas bLf dalam menghambat masuknya HCV ke dalam sel inang yaitu melalui pengikatan dengan protein selubung virus hepatitis C, sehingga menghambat infeksi virus (Nozaki *et al.*, 2003). Wei *et al.* (2012) melaporkan bahwa *lactoferrin* banyak digunakan sebagai terapi hepatoprotektif pada pasien dengan HCV. Penelitian Groot *et al.* (2005) mendapatkan efektivitas *lactoferrin* dalam menghambat replikasi HIV-1, selain itu bLf menjadi inhibitor kuat dalam penularan HIV-1 yang dimediasi oleh sel dendritik.

SIMPULAN

Penelitian ini berhasil mentransformasikan dan mengekspresikan pET11a – Bovlacto dalam sistem ekspresi bakteri *E. coli*. Hasil PCR mendeteksi pita DNA sesuai panjang sekuen *bovine lactoferrin* yang terdapat pada GenBank. Signal hibridisasi muncul dalam uji *dot blot* dan elektroforesis SDS-PAGE mendeteksi satu pita protein target yaitu pada kisaran posisi 80-85 kDa.

SARAN

Diharapkan pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan purifikasi protein hasil rekombinan, sehingga dapat dihitung konsentrasi total protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh staf pegawai yang bertugas di Laboratorium Biomedika, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana atas bantuan, ijin dan kesempatan yang diberikan dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Aira T AA, Sonia PA, Amado AA, Maria CRO, Florinia EM, Florante AC. 2015. Effect of Bovine Lactoferrin on Growth Performance and Intestinal Histologic Features of Broilers. 2015. *Philippine Journal of Veterinary and Animal Sciences* 41(1): 12-20.
- Andersen DC, Krummen L. 2002. Recombinant Protein Expression for Therapeutic Applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117–123.
- Anghel L. 2014. Lactoferrin: Analysis of the Structure Profile. *Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry* 9(2): 99-106.
- Baker HM, Baker EN. 2004. Lactoferrin and Iron: Structural and Dynamic Aspects of Binding and Release. *Biometals* 17: 209-216.
- Briand L, Marcion G, Kriznik A, Heydel JM, Artur Y, Garrido C, Seigneuric R, Neiers F. 2016. A Self-Inducible Heterologous Protein Expression System in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 6: 1–11.
- Ebrahim F, Shankaranarayanan JS, Kanwar JR, Gurudevan S, Krishnan UM, Kanwar RK. 2014. Identification of Unprecedented Anticancer Properties of High Molecular Weight Biomacromolecular Complex Containing Bovine Lactoferrin (HMW-bLf). *Plos ONE*. 9 (9).
- European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Scientific Opinion on Bovine Lactoferrin. *Journal European Food Safety Authority* 10 (5): 2701.
- Goodman RE, Schanbacher FL. 1991. Bovine Lactoferrin mRNA: Sequence, Analysis and Expression in the Mammary Gland. *Journal Biochemical and Biophysical Research Communications* 180 (1): 75-84.

- Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. 2009. Lactoferrin: Structure, Function and Applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33(4): 301-308.
- Groot F, Geijtenbeek TB, Sanders RW, Baldwin CE, Sanchez-Hernandez M, Floris R, Van Kooyk Y, De Jong EC, Berkhout B. 2005. Lactoferrin Prevents Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission by Blocking The DC-SIGN—Gp120 Interaction. *Journal of Virology* 79: 3009-3015.
- Khlebnikov A, Skaug T, Keasling JD. 2002. Modulation of Gene Expression from the Arabinose-Inducible araBAD promoter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29(1): 34–37.
- Mahardika IGN. 1995. Untersuchungen Ueber Die Genetische Grundlage der Antigenverwandtschaft Zwischen dan Beiden Serotypen des Virus der Infektoesen Bursitis. (*Disertasi*). Gießen. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Maksum I, Sriwidodo, Indriyani A. 2019. *Sistem Ekspresi Protein Rekombinan di Escherichia coli secara Ekstraselular*. Bandung. Alqaprint Jatinangor.
- Montoya IG, Martinez JS, Gallegos SA, Garcia SS, Cruz QR. 2013. Expression and Characterization of Recombinant Bovine Lactoferrin in *E. coli*. *Biomaterials* 26: 113-122.
- Moore SA, Anderson BF, Groom CR, Haridas M, Baker EN. 1997. Three-Dimensional Structure of Diferric Bovine Lf at 2.8 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 274: 222-236.
- Nozaki A, Ikeda M, Naganuma A, Nakamura T, Inudoh M, Tanaka K, Kato N. 2003. Identification of a Lactoferrin – Derived Peptide Possessing Binding Activity to Hepatitis C Virus E2 Envelope Protein. *Journal of Biological Chemistry* 278: 10162-10173.
- Parachim NS, Mulder KC, Viana AAB, Dias SC, Octavio LFOL. 2012. Expression Systems for Heterologous Production of Antimicrobial Peptides. *Peptides* 38: 446–456.
- Pratiwi RD. 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.
- Safirah D, Helianti I, Kusumaningrum HP, Budiharjo A. 2016. Kloning dan Sekuensing Gen Xilanase dengan Produk Gen Berukuran 30 kDa dari *Bacillus halodurans* CM1 pada *Escherichia coli* DH5α. *Bioteknologi* 18 (2): 167-172.
- Seyfert HM, Tuckoricz A, Interthal H, Koczan D, Hobom G. 1994. Structure of The Bovine Lactoferrin-encoding Gene and its Promoter. *Gene* 143(2): 265-269.
- Superti F. 2020. Lactoferrin from Bovine Milk: A Protective Companion for Life. *Nutrients* 12(2562): 1-25.
- Stratagene. 2004. *BL21 (DE3) competent cells, BL21 (DE3) pLysS competent cells*. Stratagene. California.
- Terada T, Shigeyuki Y. 2015. *Escherichia coli* Cell-Free Protein Synthesis and Isotope Labeling of Mammalian Proteins. *Methods in Enzymology* 565: 311-345.
- Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. 2009. Twenty-five Years of Research on Bovine Lactoferrin Application. *Biochimie* 91: 52–57.
- Turner P, McLennan A, Bates A, White M. 2005. *Instant Notes Molecular Biology*. 3rd Edition. Liverpool. Taylor and Francis group.
- Vogel HJ. 2012. Lactoferrin, A Bird's Eye View. *Biochemistry and Cell Biology*. 90(37): 233-244.
- Wang YZ, Shan TZ, Xu ZR, Feng J, Wang ZQ. 2007. Effects of the Lactoferrin (LF) on the Growth Performance, Intestinal Microflora and Morphology of Weanling Pigs. *Animal Feed Science and Technology* 135(3): 263-272.
- Wei M, Xu Y, Zou Q, Tu L, Tang C, Xu T. 2012. Hepatocellular Carcinoma Targeting Effect of PEGylated Liposomes Modified with Lactoferrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 46(3): 131-141.
- Weiner RE, Szuchet S. 1975. The Molecular Weight of Bovine Lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta* 393: 143-147.