



# PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL MENGGUNAKAN PROTEIN REKOMBINAN RBD-SPIKE UNTUK DETEKSI SARS-COV-2 POLYCLONAL ANTIBODY PRODUCTION USING RBD-SPIKE RECOMBINANT PROTEIN FOR THE DETECTION OF SARS-COV-2

Iryani Endah Febrianti<sup>1,2</sup>, Yayuk Fatmawati<sup>1,2</sup>, Intan Ria Neliana<sup>1</sup>, Widhi Dyah Sawitri<sup>3</sup>,  
Erlia Narulita<sup>1,2</sup>, Bambang Sugiharto<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi - CDAST, Universitas Jember,  
Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Jember,  
Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

<sup>3</sup>Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281, Indonesia

<sup>4</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember,  
Jl. Kalimantan 37, Jember 68121

\*Corresponding author: [sugiharto.fmipa@unej.ac.id](mailto:sugiharto.fmipa@unej.ac.id)

Naskah Diterima: 14 April 2022; Direvisi: 28 Agustus 2022; Disetujui: 18 April 2023

## Abstrak

SARS-CoV-2 merupakan virus yang menyebabkan *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) di seluruh dunia dan sampai saat ini kasus terbaru masih terus dilaporkan. *Diagnostic test* merupakan hal yang krusial untuk dikembangkan. Prinsip *diagnostic test* COVID-19 berbasis antigen, yaitu mendeteksi virus SARS-CoV-2 melalui respon antibodi dari penderita. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal menggunakan protein rekombinan RBD-Spike untuk mendeteksi virus SARS-CoV-2 berbasis antibodi. Penelitian dimulai dengan penentuan domain RBD-Spike menggunakan pensejajaran asam amino, dan konstruksi DNA untuk RBD-Spike pada vektor ekspresi pET28a menggunakan sintetik nukleotida. Produksi protein rekombinan RBD-Spike diekspresikan pada sel bakteri *Escherichia coli*. Purifikasi dilakukan untuk memperoleh protein RBD-Spike dan selanjutnya digunakan sebagai antigen untuk induksi antibodi poliklonal pada kelinci. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi protein rekombinan RBD-Spike SARS-CoV-2 memerlukan induksi IPTG 0,1 mM dan terekspresi dalam bentuk *inclusion bodies* dengan ukuran 39 kDa. Purifikasi protein RBD-Spike dilakukan menggunakan resin afinitas NiNTA, elektroelusi, dan dialisis. Total protein RBD-Spike yang diperoleh sebanyak 4 mL dengan konsentrasi 10 mg/mL. Analisa Ouchterlony menunjukkan bahwa antibodi poliklonal terdeteksi pada minggu kedua setelah injeksi booster dan analisa spesifitas antibodi terhadap antigen menunjukkan bahwa antibodi poliklonal dapat mendeteksi protein RBD-Spike pada konsentrasi 0,1 µg. Selanjutnya diharapkan antibodi poliklonal dapat digunakan untuk deteksi keberadaan virus SARS-CoV-2 dan dapat dikembangkan untuk kit deteksi berbasis antibodi.

**Kata Kunci:** Antibodi poliklonal; Protein rekombinan; RBD-Spike; SARS-CoV-2

## Abstract

SARS-CoV-2 is the virus that causes *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) worldwide and the latest cases are still being reported until now. The diagnostic test is a crucial to be developed. The principle of the antigen-based COVID-19 diagnostic test is to detect the SARS-CoV-2 virus through antibody response from the patients. This study was conducted to produce polyclonal antibodies using recombinant protein RBD-Spike. The research was carried out by determining the RBD-Spike domain using amino acid alignment and constructing the DNA of RBD-Spike to the expression vector of pET28a using nucleotide synthesis. Production of RBD-Spike recombinant protein was expressed in *Escherichia coli*. Purification was carried out to obtain RBD-Spike protein and used to induce polyclonal antibody in a rabbit. The results showed that the expression of RBD-Spike recombinant protein required induction of IPTG 0.1 mM and was expressed in inclusion bodies with molecular size of 39 kDa. The purification of RBD-Spike protein was carried out using resin affinity, electroelution, and dialysis. The total protein of RBD-Spike obtained was 4 mL with a concentration of 10 mg/mL. Ouchterlony analysis revealed that polyclonal antibody was detected in the second week after booster injection and analysis of antibody specificity showed that polyclonal antibodies detected RBD-Spike protein at the concentration of 0.1 µg of RBD-Spike protein. Moreover, it is expected that our polyclonal antibody detect the SARS-CoV-2 virus and can be developed for antibody-based detection kits.

**Keywords:** Polyclonal antibody, Recombinant protein; RBD-Spike; SARS-CoV-2

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i2.25664>

## PENDAHULUAN

*Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2). Gejala yang ditimbulkan dari infeksi SARS-CoV-2, yaitu adanya gejala klinis ringan hingga berat pada sistem pernapasan, kehilangan kemampuan membaui dan merasa, serta gejala sistemik lainnya yang mengakibatkan kematian (Cleemput et al., 2021). SARS-CoV-2 termasuk ke dalam genus *Betacoronavirus*, dengan materi genetik berupa positif *sense single-stranded RNA* dengan ukuran sekitar 30.000 bp. *Genome* tersebut mengandung 2 *open reading frames* (ORFs) untuk mengkode 16 protein non struktural, 4 protein struktural dan 8 protein asesoris (Dearlove et al., 2020; Wang et al., 2021). Keempat protein struktural virus SARS-CoV-2 terdiri dari *Spike* (S) *glycoprotein*, *protein membrane* (M), *protein ion channel envelope* (E), dan *nukleocapsid phosphoprotein* (NP) (Wang et al., 2021).

*Spike* (S) *glycoprotein* diketahui berperan penting selama proses transmisi virus terhadap sel inang. S *glycoprotein* terbagi menjadi 2 subunit, yaitu subunit S1 dan subunit S2. Subunit S1 mengandung *receptor-binding domain* (RBD) yang berinteraksi dengan protein reseptor membran pada sel inang, sedangkan S2 berperan dalam proses fusi antara virus dengan sel inang (Dong et al., 2021). Studi struktur melalui *cryo-electron microscopy*, menunjukkan bahwa RBD-Spike protein berinteraksi dengan protein reseptor *Angiotensin converting enzyme 2* (ACE2). Residu asam amino penyusun RBD yang berikatan langsung dengan ACE2 selama proses transmisi virus disebut *receptor-binding motif* (RBM) (Lan et al., 2020).

Insidensi kasus COVID-19 yang tinggi, tidak lepas dari keterlibatan *spike* protein. Data World Health Organization (WHO) per maret 2022, di Indonesia tercatat hampir enam juta kasus COVID-19 dengan kematian lebih dari 154.000 orang. Selain itu, data statistik juga menyebutkan terdapat lebih dari 7.000 kasus baru tiap harinya. Insidensi kasus yang tinggi, berkorelasi terhadap kebutuhan *diagnostic test* untuk deteksi SARS-CoV-2. Analisa standard untuk deteksi virus yaitu menggunakan *quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-qPCR). Namun, deteksi menggunakan RT-qPCR membutuhkan reagen mahal, alat, dan kondisi laboratorium khusus serta waktu yang lebih lama. Deteksi alternatif yang biasa digunakan, yaitu deteksi berbasis protein melalui *rapid diagnostic tests* (RDTs), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan immunoblot (Lau et al., 2004; Frew et al., 2021). Deteksi berbasis protein memiliki beberapa keuntungan di antaranya murah, relatif mudah dilakukan, tidak membutuhkan waktu yang lama, dan bebas dari kontaminasi (Lau et al., 2004). Namun, deteksi berbasis protein membutuhkan antibodi yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap antigen/protein target.

*Anti Spike* (S) *glycoprotein* merupakan salah satu kandidat antibodi (IgG/IgM) spesifik dan dapat dimanfaatkan untuk deteksi SARS-CoV-2. RBD-Spike protein diketahui memiliki *epitope* yang dapat menginduksi respon antibodi (Sikora et al., 2021; Jiang et al., 2021) sehingga induksi RBD-Spike protein pada hewan coba akan menimbulkan respon terbentuknya antibodi poliklonal. Beberapa penelitian sebelumnya memanfaatkan antigen untuk deteksi antibodi yang responsif terhadap infeksi SARS-CoV-2 (Freeman et al., 2020). Selain itu, antibodi spesifik terhadap protein SARS CoV-2 juga dapat digunakan untuk mendeteksi langsung keberadaan virus pada penderita dan dapat diaplikasikan menggunakan berbagai jenis metode. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memproduksi antibodi poliklonal terhadap RBD-Spike protein menggunakan teknik protein rekombinan. Pada penelitian ini, DNA pengkode RBD-Spike dikonstruksi pada vektor ekspresi menggunakan nukleotida sintetik. Protein RBD-Spike diproduksi pada sel bakteri *Escherichia coli* dan dipurifikasi untuk digunakan sebagai antigen pada produksi antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal yang dihasilkan diketahui mampu mendeteksi spesifik protein RBD-Spike hingga minimal konsentrasi 0,1 µg.

## MATERIAL DAN METODE

### Konstruksi pET28a-RBD dan Transformasi pada *Escherichia coli* BL21

*Full-length genome* SARS-CoV-2 di berbagai negara diperoleh dari *database Global Initiative on Sharing ALL Influenza Data* (GISAID, <https://www.gisaid.org/>). Nukleotida pengkode *Spike* (S) *glycoprotein* diterjemahkan urutan asam aminonya menggunakan *expasy*

(<https://web.expasy.org/translate/>) dan diurutkan menggunakan *software* Genetyx Ver8 (GENETYX, Tokyo, Japan). Nukleotida pengkode asam amino RBD-Spike yang lestari (*conserve*) dikonstruksi pada plasmid ekspresi pET28a. DNA untuk RBD-Spike didapat menggunakan teknik sintetik nukleotida dan disisipkan pada pET28a dengan sisi pemotongan *Bam*HI pada N-terminal dan *Hind*III pada C-terminal. Nukleotida RBD-Spike disintesis dan dikonstruksi oleh GenScript-USA. pET28a-RBD ditransformasikan pada sel bakteri *Escherichia coli* strain BL21 menggunakan metode kejutan panas (*heat-shock*) dan ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) mengandung antibiotik kanamisin 50 µg/mL. Keberhasilan transformasi ditentukan dengan analisa *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi.

Koloni bakteri hasil transformasi ditumbuhkan pada media LB cair dan dilakukan isolasi plasmid menggunakan kit TIANgen *mini plasmid* (Tiangen, Beijing). Reaksi PCR dilakukan sesuai Septian et al. (2021) dengan beberapa modifikasi yaitu menggunakan primer spesifik untuk *neomycin phosphotransferase (nptII)* (*Forward*: 5'-TGGAGAGGCTATTCGGCTATG-3'; *Reverse* 5'-ACTCGTCAAGAAGGCGATAGA -3') dan program *annealing* menggunakan 55 °C selama 30 detik. Selain itu, insersi RBD-Spike pada plasmid dikonfirmasi dengan pemotongan ganda plasmid pET28a-RBD menggunakan enzim restriksi *Hind*III dan *Bam*HI (New England Biolabs, UK). Produk PCR dan pemotongan DNA plasmid divisualisasikan menggunakan 1% gel agarosa mengandung *ethidium bromide* dan didokumentasikan menggunakan *gel doc* (Major Science, USA).

### Optimasi, Produksi, dan Purifikasi Protein Rekombinan RBD-Spike

Bakteri *E. coli* transforman pET28a-RBD dioptimasi kondisi pertumbuhannya untuk dapat mengekspresikan protein rekombinan RBD dalam jumlah besar. Optimasi dilakukan sesuai metode Darsono et al. (2018), yaitu 1 mL starter *E. coli* transforman ditransfer pada 50 mL media LB mengandung 50 µg/L kanamisin dan menambahkan inducer IPTG sesuai varian perlakuan yaitu 0; 0,1; 0,3; 0,5 mM. Kultur bakteri ditumbuhkan selama semalam pada *shaker* inkubator 37 °C, 150 rpm, dan dipanen dengan sentrifugasi 6.000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Pellet bakteri diekstraksi fraksi protein solubel (terlarut) dan fraksi insolubel (tidak larut) sesuai metode Septian et al. (2021). *Crude-extract* protein selanjutnya dipisahkan menggunakan *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan diwarnai menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB).

Produksi protein skala besar dilakukan sesuai prosedur optimasi produksi protein dan menggunakan IPTG 0,1 mM sebagai *inducer*. Sebanyak 10 g pellet bakteri transforman disuspensikan dengan 30 mL *buffer* ekstraksi protein (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8,0) dan sel bakteri dipecahkan menggunakan sonikator (Branson, USA). Protein terlarut diperoleh dengan sentrifugasi 12.000 rpm, 4 °C selama 10 menit pada fraksi supernatan. Sedangkan pellet bakteri mengandung protein yang terlokalisasi pada membran sel (insolubel protein) atau dalam bentuk *inclusion bodies* diekstraksi menggunakan *buffer* ekstraksi yang sama namun ditambahkan 8 M urea untuk melarutkan ikatan protein dan lipid. Setelah sentrifugasi 12.000 rpm, selama 10 menit pada suhu kamar, protein rekombinan dipurifikasi menggunakan resin NiNTA (Roche, USA).

Purifikasi protein menggunakan resin NiNTA dilakukan sesuai protokol produk (Roche, USA) dengan beberapa modifikasi. *Crude extract* protein insolubel dicampur dengan resin NiNTA selama 2 jam pada suhu 4 °C. Selanjutnya, protein kontaminan, yaitu protein yang tidak terikat resin dicuci sebanyak 3 kali dengan *buffer* ekstraksi mengandung serial konsentrasi *imidazole* bertingkat (0, 5, 10, 12 mM) untuk masing-masing pencucian. Protein rekombinan RBD-Spike dielusi dengan resin menggunakan *buffer* ekstraksi 250 mM *imidazole*.

Protein RBD-Spike hasil purifikasi NiNTA ditingkatkan kemurniannya menggunakan elektroelusi. Elektroelusi dilakukan dengan memisahkan protein menggunakan gel SDS-PAGE. Selanjutnya, protein target dipotong dan dipisahkan dari gel menggunakan elektroeluter (Bio-Rad, USA). Protein yang terelusi didialisis menggunakan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Kemurnian protein dikonfirmasi menggunakan SDS-PAGE dan konsentrasi protein diukur menggunakan metode Lowry (Lowry et al., 1951).

## Produksi Antibodi Poliklonal pada Kelinci *New Zealand White*

Produksi antibodi poliklonal dilakukan pada Kelinci betina *strain New Zealand White* berumur 8 minggu. Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik Universitas Gadjah Mada dengan Nomor: 00005/04/LPPT/IV/2021. Hewan coba diaklimatisasi selama satu minggu di laboratorium pengujian hewan pada suhu 23–25 °C dengan kelembapan udara  $60 \pm 5\%$ . Sebelum imunisasi dilakukan, serum darah diambil dari hewan coba sebagai kontrol preimun. Antigen protein RBD-Spike murni diinjeksi secara subkutan dengan dosis 1 mL suspensi mengandung protein RBD-Spike 500  $\mu\text{g}$  dan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1. Injeksi *booster* dilakukan setiap minggu dimulai pada minggu ke-3 sampai minggu ke-8 dengan dosis 1 mL suspensi yang mengandung protein RBD-Spike 250  $\mu\text{g}$  dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1. Pengambilan serum darah pertama setelah injeksi dilakukan melalui vena *marginalis* pada minggu ke-4 dan terus dilakukan setiap minggu secara berkala sampai serum ke-6 (Darsono et al., 2018).

## Analisa Ouchterlony dan Immunoblot

Reaksi antara antigen dan antibodi dianalisa menggunakan analisa Ouchterlony sesuai penelitian sebelumnya, Duong et al. (2021) dengan beberapa modifikasi. Satu persen gel agarosa dilarutkan dalam PBS mengandung 0,05%  $\text{NaN}_3$  dan dicetak pada *plate* berukuran 15 x 7 cm. Bagian tengah *plate* dibuat sumuran sentral berdiameter 2–3 mm dan ketebalan 2 mm dengan jarak antar sumuran 0,5 cm. Masing masing sebanyak 10  $\mu\text{L}$  serum darah kelinci dimasukkan ke sumuran sentral, dan antigen RBD-Spike dimasukkan ke sumuran tepi. *Plate* diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Garis presipitasi antigen antibodi diamati setelah pewarnaan menggunakan CBB.

Analisa immunoblot dilakukan untuk mengetahui sensitifitas antibodi terhadap antigen. Variasi konsentrasi protein antigen (0,01; 0,1; 1,0; 3,0; dan 5,0  $\mu\text{g}$ ) dipisahkan menggunakan SDS-PAGE dan ditransfer pada membran PVDF (Merck, Jerman) menggunakan *semi-dry trans-blotter* (Bio-rad, USA). Tahap selanjutnya menggunakan metode yang dilakukan Apriasti et al. (2018) dan Darsono et al. (2018), yaitu *membrane* PVDF dicuci menggunakan *Tris-Buffered Saline* (TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,6) sebanyak 3 kali dan diblokir menggunakan *skim milk* 1% dalam TBS selama 30 menit. Selanjutnya, protein antigen pada membran PVDF direaksikan dengan antibodi poliklonal dalam TBS (1:3000) selama semalam. Membran PVDF dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali dan direaksikan dengan antibodi sekunder *goat-anti-rabbit IgG alkaline phosphatase* (AP) *conjugate* (Roche, Germany) dalam TBS (1:1500) selama 60 menit. Keberadaan RBD-Spike dideteksi dengan pewarnaan menggunakan *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate* (BCIP) dan *nitro blue tetrazolium* (NBT).

## HASIL

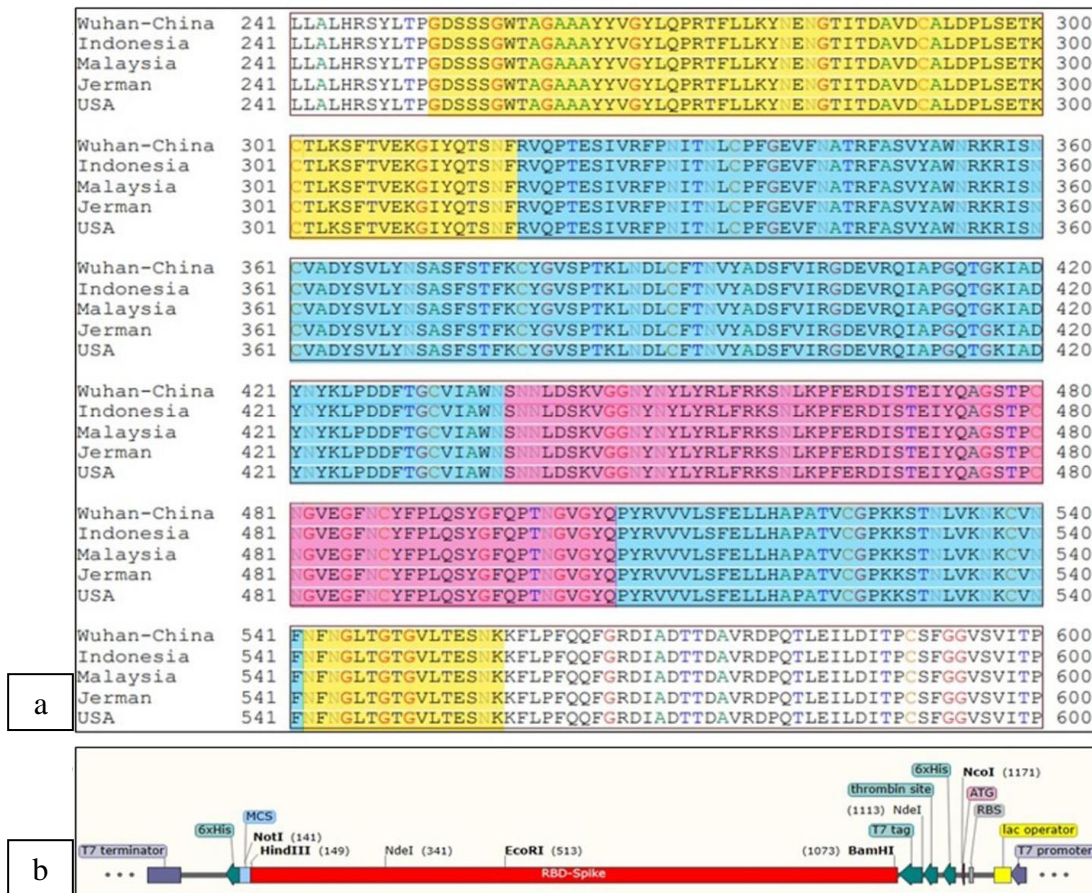
### Sintesis DNA untuk RBD-Spike dan Konstruksinya pada Plasmid pET28a

Kelima isolat SARS-CoV-2 hasil *sequencing* dari beberapa negara dipilih untuk analisa pensejajaran asam amino penyusun protein *spike*. Kelima isolat DNA terpilih, yaitu isolat Wuhan-China (Accession ID: EPI\_ISL\_529217), Indonesia (Accession ID: EPI\_ISL\_437188), Malaysia (Accession ID: EPI\_ISL\_501189), Jerman (Accession ID: EPI\_ISL\_7357435), dan USA (Accession ID: EPI\_ISL\_11413202) dikonversikan ke asam amino dan pensejajaran residu protein *spike* menunjukkan bahwa residu untuk RBD-Spike dan residu di sekitarnya lestari (*conserve*) (Gambar 1a). Residu RBD diketahui berada pada R319-F541 dan residu untuk RBM berada pada S438-Q506. Konstruksi RBD-Spike pada pET28a ditentukan dari urutan basa nukleotida pengkode residu asam amino ke-252 sampai residu ke-557. DNA untuk RBD-Spike didapat dengan menggunakan teknik sintetik nukleotida dan dikonstruksi pada plasmid pET28a di antara sisi pemotongan *Bam*HI dan *Hind*III (Gambar 1b).

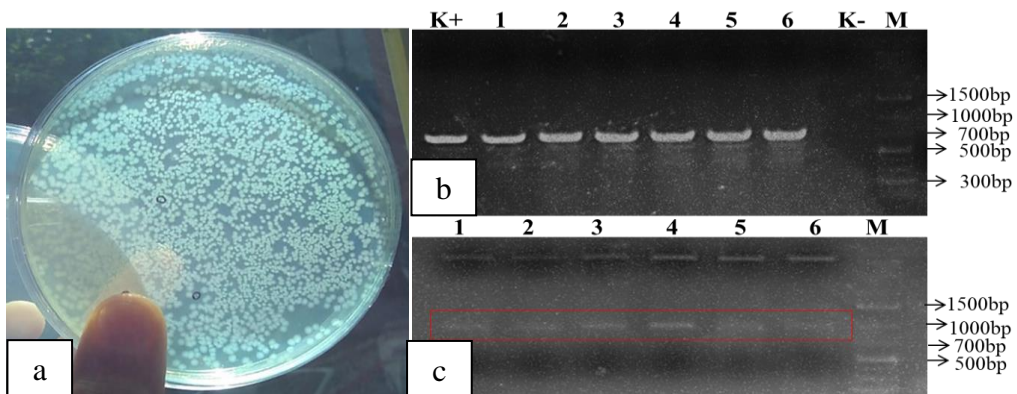
### Konfirmasi pET28a-RBD-Spike pada Bakteri *Escherichia coli* Strain BL21

Produksi protein rekombinan konstruk pET28a-RBD-Spike ditransformasikan pada bakteri *E. coli* BL21. Koloni bakteri *putative* transforman dapat tumbuh pada media LB mengandung antibiotik kanamisin (Gambar 2a). Hasil PCR dari koloni bakteri *putative* transforman diketahui

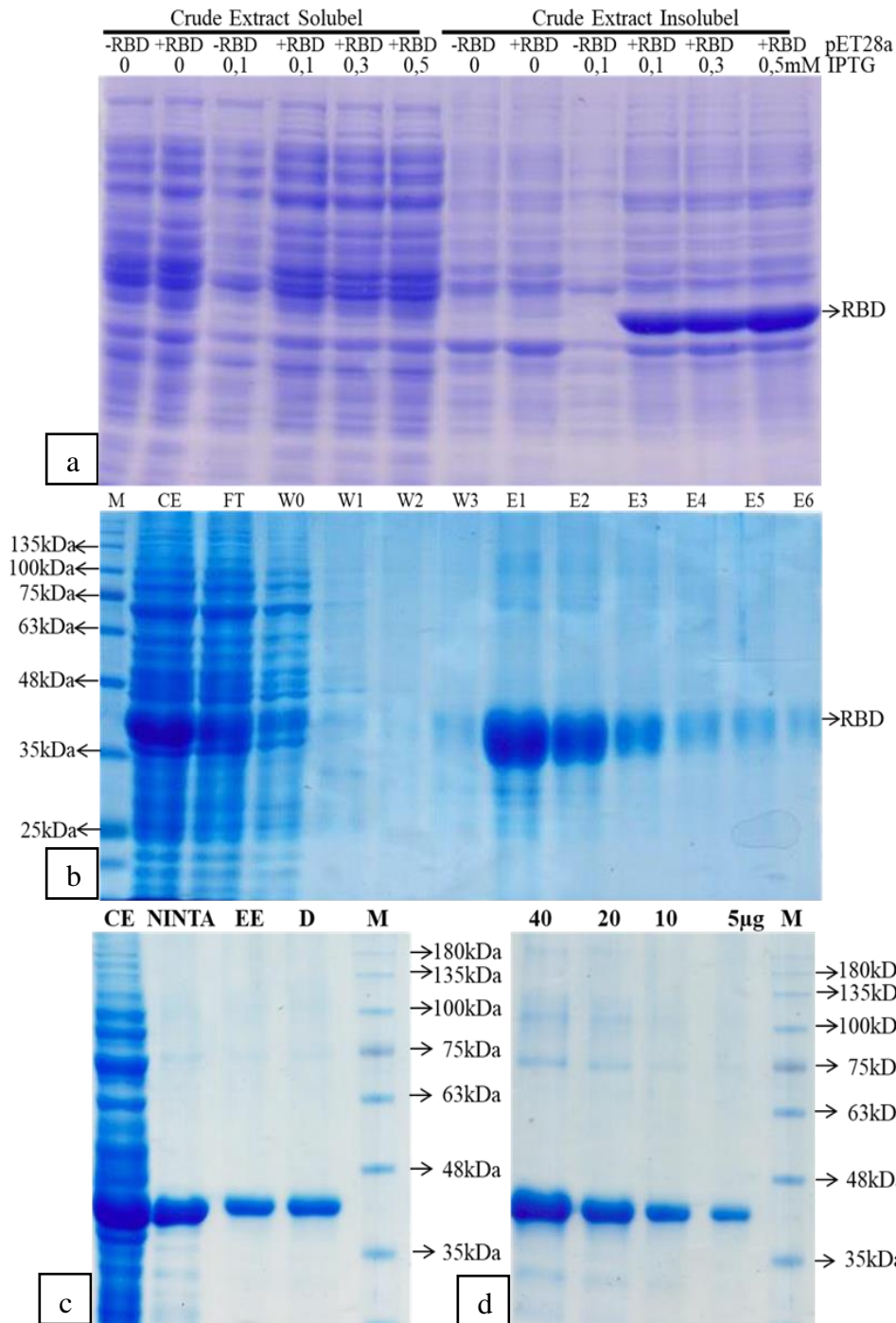
bahwa bakteri mengandung gen pengkode resistensi terhadap antibiotik kanamisin (*nptII*) berukuran 700 bp (Gambar 2b). Selain itu, hasil pemotongan plasmid menggunakan enzim *Bam*HI dan *Hind*III menunjukkan adanya pita DNA berukuran 930 bp (Gambar 2c). Pita tersebut merupakan fragmen DNA untuk protein RBD-Spike yang terinsersi pada plasmid pET28a.



**Gambar 1.** Pensejajaran residu *spike glycoprotein* dan konstruksi RBD-Spike pada pET28a, yaitu pensejajaran *spike* dari isolat SARS-CoV-2 di beberapa negara (a) dan konstruksi pET28a-RBD-Spike pada sisi pemotongan *Bam*HI dan *Hind*III (b). *Highlight* kuning menunjukkan asam amino penyusun *spike* protein nukleotida basa dikonstruksi ke plasmid pET28a; *highlight* biru menunjukkan asam amino *Receptor Binding Domain*; dan *highlight* merah menunjukkan asam amino penyusun *Receptor Binding Motif*



**Gambar 2.** Konfirmasi bakteri *putative transforman* pET28a-RBD-Spike, yaitu koloni bakteri *putative transforman* pada media LB mengandung kanamisin (a), visualisasi hasil PCR menggunakan primer spesifik *nptII* (b), dan visualisasi pemotongan plasmid menggunakan *Bam*HI dan *Hind*III (c). 1–6= plasmid dari koloni tunggal bakteri *putative transforman*; K+= plasmid pET28a-RBD-Spike dari sintetik nukleotida; K-= PCR *mixture* tanpa plasmid; M= marker 1 Kb DNA *ladder* (Thermo Scientific). Kotak merah menunjukkan pita DNA untuk protein RBD-Spike



**Gambar 3.** Pemisahan protein RBD-Spike dengan SDS-PAGE (12% *acrylamide*). Protein rekombinan RBD diekspresikan pada *E. coli*, diekstraksi dan dipurifikasi dengan resin NiNTA, yaitu optimasi ekspresi pada *E. coli* transforman pET28a dan pET28a-RBD dengan kombinasi IPTG (a), purifikasi *crude extract* fraksi insolubel menggunakan resin NiNTA (b), perbandingan profil protein dari berbagai tahap purifikasi (c), dan perbandingan konsentrasi protein hasil *dialysis* (d). M= Marker protein ladder (Jena Bioscience); CE= *crude extract*; FT= *flowthrough*; W0= *washing* 0 mM *imidazole*; W1= *washing* 5 mM *imidazole*; W2= *washing* 10 mM *imidazole*; W3= *washing* 12 mM *imidazole*; E1-E6= elusi 250 mM *imidazole*. NiNTA= hasil purifikasi NiNTA; EE= elektroelusi; D= dialisis

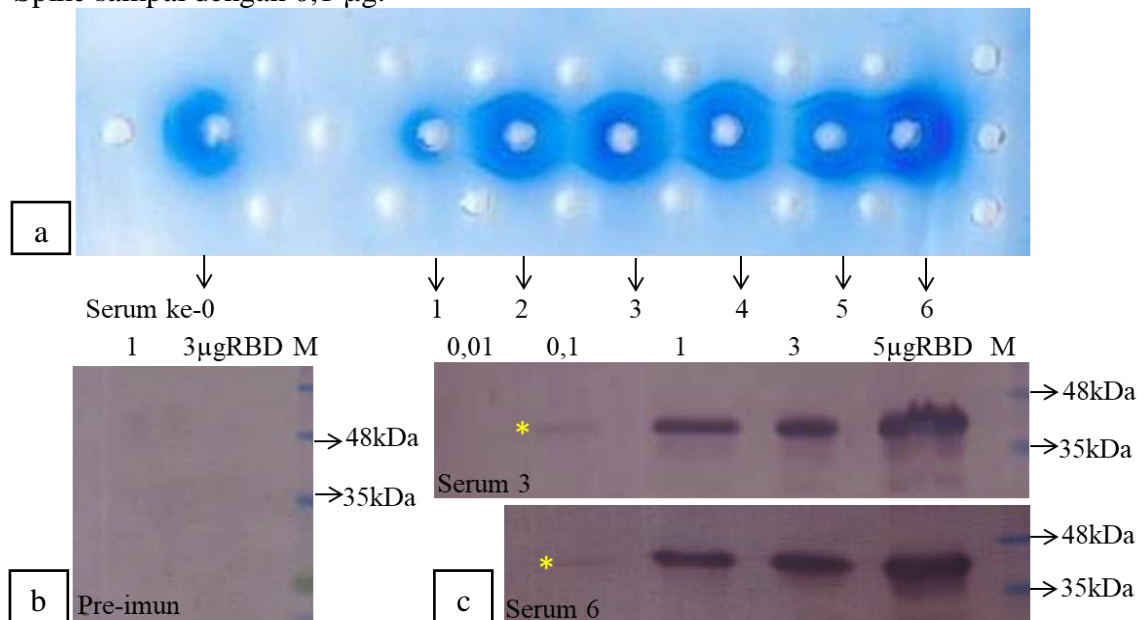
### Optimasi Ekspresi dan Purifikasi Protein Rekombinan RBD-Spike

Optimasi ekspresi konstruk pET28a-RBD-Spike dilakukan dengan menumbuhkan bakteri transforman menggunakan variasi IPTG. Hasil optimasi bakteri menunjukkan bahwa protein RBD-

Spike diekspresikan pada fraksi insolubel protein dengan ukuran berat molekul sekitar 39 kDa dan membutuhkan *inducer* IPTG. Pita protein RBD-Spike menunjukkan level ekspresi yang sama dengan penambahan IPTG yang berbeda baik pada konsentrasi 0,1; 0,3; maupun 0,5 mM (Gambar 3a). Oleh karena itu, konsentrasi IPTG yang digunakan untuk produksi protein pada skala besar menggunakan konsentrasi 0,1 mM. Pemurnian protein RBD-Spike menggunakan afinitas resin NiNTA, menunjukkan protein RBD-Spike terdeteksi pada fraksi elusi namun masih ada beberapa protein pengotor lainnya (Gambar 3b). Purifikasi protein lanjutan menggunakan elektroelusi dan dialisis menunjukkan fraksi protein yang lebih murni dibanding hanya menggunakan resin NiNTA (Gambar 3c). Hasil SDS PAGE pada hasil dialisis dengan variasi konsentrasi menunjukkan protein RBD-Spike dengan tingkat kemurnian di atas 80% (Gambar 3d). Protein RBD-Spike hasil purifikasi diperoleh sebanyak 4 mL dengan konsentrasi 10 mg/mL.

### Produksi Antibodi Poliklonal menggunakan Protein Rekombinan RBD-Spike

Untuk melihat terbentuknya antibodi poliklonal, maka serum darah preimun dan serum darah setelah imunisasi direaksikan dengan protein RBD-Spike menggunakan analisa Ouchterlony. Hasil pengujian Ouchterlony menunjukkan bahwa antibodi terbentuk pada serum kedua sampai serum keenam yang ditandai dengan adanya garis presipitasi hasil reaksi pengikatan antara antibodi dan antigen protein recombinan RBD-Spike (Gambar 4a). Pada serum preimun (serum ke-0) dan serum pertama sesudah injeksi tidak terlihat adanya garis presipitasi, dan setelah dianalisa menggunakan immunoblot menunjukkan pita protein RBD-Spike tidak terdeteksi (Gambar 4a-b). Oleh karena itu, pada serum ke-0 dan pertama tidak terbentuk antibodi yang ditunjukkan dengan tidak terjadi reaksi antibodi terhadap antigen. Sementara itu, serum yang diperoleh setelah imunisasi (serum ke-3 dan serum ke-6) diketahui menghasilkan antibodi spesifik terhadap protein RBD-Spike dibuktikan dengan adanya pita protein RBD-Spike pada analisa immunoblot (Gambar 4c). Hasil immunoblot menunjukkan bahwa antibodi poliklonal mampu mendeteksi dengan konsentrasi protein RBD-Spike sampai dengan 0,1  $\mu$ g.



**Gambar 4.** Pengujian reaksi antibodi poliklonal dan antigen protein RBD-Spike, yaitu deteksi ikatan antibodi terhadap protein RBD-Spike menggunakan analisa Ouchterlony *double immunodiffusion* (a), immunoblot deteksi protein RBD-Spike menggunakan serum preimun (b), dan immunoblot deteksi RBD-Spike dengan variasi konsentrasi protein menggunakan antibodi poliklonal serum ketiga dan serum keenam (c)

### PEMBAHASAN

*Spike* (S) *Glycoprotein* merupakan salah satu protein penyusun permukaan terluar virus SARS-CoV-2 yang berperan dalam proses transmisi virus pada sel inang (Walls et al., 2020). *Spike*

sebagai protein yang berinteraksi langsung dengan sel inang tidak hanya menginisiasi fusi virus-sel inang, melainkan juga menjadi target utama terkait respon imun (*neutralizing antibodies*) (Duan et al., 2020). Oleh karena itu *spike* protein merupakan salah satu target utama untuk pengembangan vaksin ataupun deteksi infeksi virus. Pada penelitian ini protein RBD-Spike diproduksi menggunakan teknik protein rekombinan dan digunakan untuk memproduksi antibodi poliklonal.

Penyusun RBD-Spike ditentukan dengan mensejajarkan isolat SARS-CoV-2 dari kelima perwakilan negara yang diterbitkan pada tahun 2020 (sebelum mengalami mutasi) di *database* GISAID. Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein *spike* dari kelima negara memiliki susunan asam amino yang sama (*conserve*) pada bagian residu untuk RBD-Spike dan beberapa residu di sekitar RBD-Spike. Penentuan urutan RBD-Spike dan RBM mengacu pada Lan et al. (2020) dan Prahlad et al. (2021) yang menyebutkan bahwa RBD-Spike berada pada residu ke R319-F541 (*highlight* biru) sedangkan RBM berada pada residu S438-Q506 (*highlight* merah) (Gambar 1a). Nukleotida pengkode residu *spike* G252-K557 disintesis menggunakan reaksi kimia (*Oligo synthesis*) dan dikonstruksi pada pET28a. Pada penelitian ini, sintetik nukleotida dipilih untuk mengurangi resiko terinfeksi selama proses isolasi dari virus SARS-CoV-2 secara langsung di laboratorium. Selain itu, sintetik nukleotida juga digunakan pada beberapa penelitian, termasuk studi protein rekombinan virus pada tanaman seperti yang dilakukan oleh Mardanova et al. (2017).

pET28a merupakan vektor ekspresi gen yang biasa digunakan untuk produksi protein. pET28a mengandung T7 promoter, Lac operator untuk menekan ekspresi yang tidak diinduksi, memiliki *poly-histidine purification tag* (His6) dan *thrombin protease recognition site* (TPS) yang berguna untuk mempermudah proses purifikasi (Shilling et al., 2020). Selain itu, plasmid pET28a juga memiliki gen ketahanan untuk kanamisin, yaitu *Neomycin phosphotransferase II* (*nptII*). Gen ketahanan antibiotik digunakan sebagai *selectable marker* (penanda) plasmid pada sel inang. RBD-Spike dikonstruksi pada sisi pemotongan *BamHI* dan *HindIII*, serta memiliki *histidine-tag* pada bagian N-terminal dan C-terminalnya (Gambar 1b).

Plasmid pET28a-RBD-Spike ditransformasikan pada bakteri *Escherichia coli* strain BL21. *E. coli* BL21 dipilih sebagai host dengan mempertimbangkan pertumbuhan yang cepat dan non-motil, memiliki T7 RNA *polymerase* yang berperan untuk mengekspresikan protein rekombinan dibawah regulasi T7 promoter (Zhang et al., 2015). Hasil transformasi menunjukkan koloni bakteri BL21 tumbuh pada media LB mengandung antibiotik kanamisin (Gambar 2a). Hal tersebut membuktikan bahwa bakteri mengekspresikan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (*nptII*). Keberadaan *nptII* mengindikasikan bahwa bakteri mengandung pET28a. Hasil pemotongan plasmid juga membuktikan bahwa pET28a terinsersi gen pengkode RBD-Spike (ukuran 930 bp) setelah dipotong menggunakan enzim *BamHI* dan *HindIII* (Gambar 2b-c).

Optimasi ekspresi protein rekombinan RBD-Spike pada bakteri transforman menunjukkan bahwa penambahan *inducer* IPTG merupakan hal yang perlu dilakukan untuk menginduksi protein rekombinan terekspresi pada *E. coli* (Gambar 3a). IPTG merupakan senyawa yang strukturnya mirip *lactose*, dan dapat masuk ke sel bakteri melalui *lac permease* atau secara difusi. Keberadaan IPTG pada sel bakteri dapat berikatan dengan *lac repressor* yang memungkinkan T7 RNA polimerase berikatan dengan promoter dan mengekspresikan gen target (Tan et al., 2012). Penelitian yang sama oleh Prahlad et al. (2021) juga menunjukkan protein RBD-Spike memerlukan induksi 0,5 mM IPTG. Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa ekspresi protein rekombinan memerlukan induksi IPTG di antaranya rekombinan *sucrose-phosphate synthase* (Sawitri et al., 2016); dan rekombinan *cholesterol oxidase* (Fazaeli et al., 2019).

Selain ekspresinya yang diinduksi oleh IPTG, RBD-Spike pada *E. coli* juga diketahui diekspresikan dalam bentuk insolubel (protein tidak terlarut) (Gambar 3a). Hasil analisa prediksi sinyal protein dan lokalisasi seluler menggunakan PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>), menunjukkan bahwa protein RBD-Spike terekspresi di membran bagian dalam bakteri. Conzentino et al. (2021) juga menyebutkan bahwa protein *spike* memiliki karakteristik mudah terglykosilasi, sedangkan *E. coli* memiliki sistem glykosilasi yang rendah sehingga protein terekspresi dalam bentuk *inclusion bodies* (insolubel protein). Selain itu RBD-Spike memiliki 4 ikatan disulfida dan



ekspresinya pada *E. coli* membatasi terbentuknya ikatan disulfida tersebut sehingga menghasilkan protein dalam bentuk *inclusion bodies* (Brindha & Kuroda, 2022).

Protein RBD-Spike merupakan protein yang secara umum digunakan sebagai antigen untuk uji serologi (Mehalko et al., 2021). Syarat protein menjadi antigen yaitu protein yang digunakan bersifat aman, memiliki immunogenitas tinggi yang dapat menimbulkan terbentuknya reaksi sistem imun (antibodi) spesifik (Conzentino et al., 2021). RBD-Spike juga diketahui memiliki *epitope* untuk menginduksi terbentuknya antibodi (Sikora et al., 2021; Jiang et al., 2021). Kemurnian antigen memengaruhi spesifitas dari antibodi yang dihasilkan, oleh karena itu RBD-Spike dimurnikan dengan purifikasi bertingkat yaitu menggunakan resin NiNTA, elektroelusi, dan dialisis seperti yang dilakukan oleh Darsono et al. (2018) (Gambar 3b-d). Protein hasil purifikasi diketahui masih memiliki sedikit protein kontaminan, namun konsentrasi RBD-Spike dalam sampel jauh lebih tinggi sehingga masih bisa digunakan sebagai antigen untuk produksi antibodi poliklonal (Gambar 3d). Menurut Duong et al. (2021), *His-tag* tidak perlu dihilangkan dari protein rekombinan karena memiliki ukuran yang kecil dan bersifat lemah immunogenik, sehingga keberadaan protein *His-tag* tidak memengaruhi antibodi poliklonal yang akan dihasilkan.

Pengujian Ouchterlony bertujuan untuk mendeteksi interaksi spesifik antara protein antigen dan antibodi poliklonal dengan memanfaatkan proses difusi pada gel agarosa. Pembentukan antibodi ditandai dengan adanya garis presipitasi (Hornbeck, 2017). Pada hasil penelitian garis presipitasi mulai terlihat pada serum darah ke-2, yaitu minggu ke-5 dari injeksi pertama atau setelah injeksi booster kedua (Gambar 4a). Penelitian yang dilakukan oleh Darsono et al. (2018) juga menunjukkan bahwa antibodi poliklonal untuk CP-SCMV terbentuk pada minggu yang sama. Selain itu, uji sensitifitas menunjukkan bahwa antibodi poliklonal dapat mendeteksi RBD-Spike spesifik dengan konsentrasi 0,1 µg (Gambar 4c). Penelitian yang dilakukan oleh George et al. (2021) menunjukkan bahwa antibodi poliklonal untuk *spike* S1 SARS-CoV-2 dapat mendeteksi minimal konsentrasi 0,5 µg protein rekombinan *spike* S1. Sender et al. (2021) menyebutkan bahwa estimasi rata-rata orang yang terinfeksi SARS-CoV-2 membawa virus  $10^9$ – $10^{11}$  selama puncak infeksi, dengan total massa sekitar 1–100 µg. Dengan demikian melalui pengujian lanjutan diharapkan sensitifitas dari antibodi poliklonal untuk protein RBD-Spike dapat mendeteksi keberadaan virus SARS-CoV-2 dan dapat dikembangkan untuk kit deteksi alternatif berbasis antibodi.

## SIMPULAN DAN SARAN

Eksresi protein rekombinan RBD-Spike SARS-CoV-2 memerlukan induksi IPTG 0,1 mM dan terekspresi dalam bentuk *inclusion bodies* (insolubel protein). Protein RBD-Spike selanjutnya dimurnikan dari *crude extract* protein insolubel menggunakan resin afinitas NiNTA, elektroelusi dan dialisis yang menghasilkan protein RBD-Spike dengan kemurnian baik dan digunakan sebagai antigen. Antibodi poliklonal terhadap RBD-Spike dideteksi pada pengambilan serum kedua (setelah *booster* kedua) menggunakan uji Ouchterlony. Hasil analisa sensitifitas antibodi terhadap antigen menunjukkan bahwa antibodi poliklonal dapat mendeteksi protein RBD-Spike hingga konsentrasi 0,1 µg. Saran untuk penelitian sejenis, diharapkan menggunakan purifikasi protein yang lebih bertingkat dan variatif untuk menghasilkan protein yang lebih murni.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Universitas Jember melalui Hibah COVID-19 tahun anggaran 2020 yang telah mendukung sebagian biaya demi pelaksanaan penelitian ini.

## REFERENSI

- Apriasti, R., Widyaningrum, S., Hidayati, W.N., Sawitri, W.D., Darsono, N., Hase, T., & Sugiharto, B. (2018). Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2749-2758. doi: 10.1007/s11033-018-4326-1.
- Brindha, S., & Kuroda, Y. (2022). A multi-disulfide receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein expressed in *E. coli* using a SEP-Tag produces antisera interacting with

- the mammalian cell expressed spike (S1) protein. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1703. doi: 10.3390/ijms23031703.
- Conzentino, M. S., Paul, N. M., Rego, F. G. M., Dalila, L., Aoki, M. N., Nardin, J. M., & Huergo, L. F. (2021). A magnetic bead immunoassay to detect human IgG reactive to SARS-CoV-2 spike S1 RBD produced in *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-12. doi: 10.1101/2021.12.22.2126828.
- Cleemput, J. V., Snippenberg, W. V., Lambrechts, L., Dendooven, A., D'Onofrio, V., Couck, L., ... Vandekerckhove, L. (2021). Organ-specific genome diversity of replication-competent SARS-CoV-2. *Nature communications*, 12(6612), 1-11. doi: 10.1038/s41467-021-26884-7.
- Darsono, N., Azizah, N. N., Putranty, K. M., Astuti, N. T., Addy, H. S., Darmanto, W., & Sugiharto, B. (2018). Production of a polyclonal antibody against the recombinant coat protein of the sugarcane mosaic virus and its application in the immunodiagnostic of sugarcane. *Agronomy*, 8(6), 1-13. doi: 10.3390/agronomy8060093.
- Dearlove, B., Lewitus, E., Bai, H., Li, Y., Reeves, D. B., Joyce, M. G., ... Rolland, M. (2020). A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(38), 23652-23662. doi: 10.1073/pnas.2008281117.
- Dong, Y., Dai, T., Wang, B., Zhang, L., Zeng, L., Yan, H., ... Zhou, F. (2021). The way of SARS-CoV-2 vaccine development: Success and challenges. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(387), 1-14. doi: 10.1038/s41392-021-00796-w.
- Duan, L., Zheng, Q., Zhang, H., Niu, Y., Lou, Y., & Wang, H. (2020). The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: Implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Frontiers in Immunology*, 11(576622), 1-12. doi: 10.3389/fimmu.2020.576622.
- Duong, N. D., Nguyen-Phuoc, K. H., Do, K. Y. T., Nguyen, N. T. T., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Production of polyclonal antibody against the recombinant PirBvp protein of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(70), 1-8. doi: 10.1186/s43141-021-00172-9.
- Fazaeli, A., Golestani, A., Lakzaei, M., Rasi, V.S.S., & Aminian, M. (2019) Expression optimization, purification, and functional characterization of cholesterol oxidase from *Chromobacterium* sp. DS1. *PLOS ONE*, 14(2), 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0212217.
- Freeman, B., Lester, S., Mills, L., Rasheed, M., Moye, S., Abiona, O., ... Thornburg, N. J. (2020). Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and serosurveillance. *Biorxiv: The Preprint Server for Biology*, 04.24.057323. doi: 10.1101/2020.04.24.057323.
- Frew, E., Roberts, D., Barry, S., Holden, M., Mand, A. R., Mitsock, E., ... Skog. (2021). A SARS-CoV-2 antigen rapid diagnostic test for resource limited settings. *Scientific reports*, 11(23009), 1-10. doi: 10.1038/s41598-021-02128-y.
- George, S., Pal, A. C., Gagnon, J., Timalisina, S., Singh, P., Vydyam, P., ... the Yale Impact Team. (2021). Evidence for SARS-CoV-2 spike protein in the urine of COVID-19 patients. *Kidney*, 360, 2(6), 924-936. doi: 10.34067/KID.0002172021.
- Hornbeck, P. (2017). Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (ouchterlony). *Current Protocols in Immunology*, 116, 2.3.1-2.3.4. doi: 10.1002/cpim.18.
- Jiang, M., Zhang, G., Liu, H., Ding, P., Liu, Y., Tian, Y., ... Wang, A. (2021). Epitope profiling reveals the critical antigenic determinants in SARS-CoV-2 RBD-based antigen. *Frontiers in Immunology*, 12, 707977, 1-14.
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., ... Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215-220. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Wong, B. H., Tsoi, H. W., Woo, G. K., Poon, R. W., ... Yuen, K. Y. (2004). Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in

- sars patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 2884-2889. doi: 10.1128/JCM.42.7.2884-2889.2004.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mardanov, E. S., Blokhina, E. A., Tsybalova, L. M., Peyret, H., Lomonossoff, G. P., & Ravin, N. V. (2017). Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus x. *Frontier in Plant Science*, 8(247), 1-8. doi: 10.3389/fpls.2017.0024.
- Mehalko, J., Drew, M., Snead, K., Denson, J. P., Wall, V., Taylor, T., ... Esposito, D. (2021). Improved production of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD) for serology assays. *Protein Expression and Purification*, 179(105802), 1-7. doi: 10.1016/j.pep.2020.105802.
- Prahlad, J., Struble, L. R., Lutz, W. E., Wallin, S. A., Khurana, S., Schnaubelt, A., ... Borgstah, G. (2021). CyDisCo production of functional recombinant SARS-CoV-2 spike receptor binding domain. *Protein Science: A publication of the Protein Society*, 30(9), 1983-1990. doi: 10.1002/pro.4152.
- Sawitri, W. D., Narita, H., Ishizaka-Ikeda, E., Sugiharto, B., Hase, T., & Nakagawa, A. (2016). Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E. coli* and insect Sf9 cells: An importance of the N-terminal domain for an allosteric regulatory property. *Journal of Biochemistry*, 159(6), 599-607. doi: 10.1093/jb/mvw004.
- Sender, R., Bar-On, Y. M., Gleizer, S., Bernsthein, B., Flamholz, A., Phillips, R., & Milo, R. (2021). The total number and mass of SARS-CoV-2 virions. *MedRxiv: The Preprint Server for Health Sciences*, 2020.11.16.20232009. doi: 10.1101/2020.11.16.20232009.
- Septian, A. F., Neliana, I. R., Kusumawardani, B., & Sugiharto, B. (2021). Pengujian potensi alergenitas coat protein sugarcane mozaic virus pada tanaman tebu transgenik. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*, 8, 208-219.
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Kock, Z., & Deley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(214), 1-8. doi: 10.1038/s42003-020-0939-8.
- Sikora, M., von Bülow, S., Blanc, F. E. C., Gecht, M., Covino, R., & Hummer, G. (2021). Computational epitope map of SARS-CoV-2 spike protein. *PLOS Computational Biology*, 17(4), 1-16. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008790.
- Tan, J. S., Ramanan, R. N., Ling, T. C., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2012). The role of lac operon and lac repressor in the induction using lactose for the expression of periplasmic human interferon- $\alpha$ 2b by *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 62, 1427-1435. doi: 10.1007/s13213-011-0394-3.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- Wang, S., Dai, T., Qin, Z., Pan, T., Chu, F., Lou, L., ... Zhou, F. (2021). Targeting liquid-liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes innate antiviral immunity by elevating MAVS activity. *Nature Cell Biology*, (23), 718-732. doi: 10.1038/s41556-021-00710-0.
- Zhang, Z., Kuipers, G., Niemiec, Ł., Baumgarten, T., Slotboom, D. J., de Gier, J. W., & Hjelm, A. (2015). High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microbial Cell Factories*, 14(142), 1-11. doi: 10.1186/s12934-015-0328-z