



Biosintesis Antigen Permukaan Hepatitis B “HBsAg100” pada *Escherichia coli* dalam Rangka Produksi Protein Rekombinan sebagai Model Imunogen untuk Menghasilkan Antibodi

Biosynthesis of Hepatitis B Surface Antigen “HBsAg100” In Escherichia coli for Recombinant Protein Production as an Immunogen Model to Generate Antibody

Slamet Riyadi¹, Rarah RA Maheswari², Mirnawati Sudarwanto³, Fransiska RZ⁴, Muhamad Ali⁵

¹Student of Veterinary Science Study Program, School of Postgraduate Studies, Bogor Agricultural University

²Faculty of Animal Husbandry, Bogor Agricultural University

³Faculty of Veterinary Science, Bogor Agricultural University

⁴Faculty of Technology Agricultural, Bogor Agricultural University

⁵Chairman Laboratory of Microbiology & Biotechnology Faculty of Animal Husbandry, University of Mataram, Lombok

KATA KUNCI Ekspresi protein; protein rekombinan; purifikasi; HBsAg100
KEYWORDS Protein expression; recombinant protein; purification; HBsAg100

ABSTRAK Biosintesis protein rekombinan melalui *Escherichia coli* memberikan alternatif untuk menghasilkan protein antigen yang bermanfaat bagi kepentingan kesehatan yang bebas dari protein manusia. Penelitian ini menggabungkan fragmen DNA dari antigen permukaan virus Hepatitis B dengan gen penyandi enzim glutathione-S-transferase (GST) di dalam plasmid p GEX-4T-2 yang diekspresikan di dalam sel-sel *Escherichia coli*. Polipeptida dengan berat molekul sekitar 34,8 kDa telah diproduksi dan diidentifikasi sebagai protein gabungan GST-HB100. Protein gabungan tersebut kemudian dimurnikan menggunakan kolom GSTrap yang disambung dengan kolom HiTrap. Selanjutnya, protein hasil pemurnian tersebut diharapkan bisa digunakan sebagai bahan vaksin atau untuk menghasilkan antibodi.

ABSTRACT Biosynthesis of recombinant protein in *Escherichia coli* may offer an alternative procedure to generate therapeutic protein free from human protein. In this research, cloned DNA fragment of Hepatitis B surface antigen was placed downstream from the glutathione S-transferase (GST) protein-encoding gene in expression plasmid pGEX-4T-2 and expressed in *Escherichia coli* cells. A polypeptide of 34,8 kDa molecular weight was synthesized and identified as GST-HB100 fusion proteins. The recombinant proteins were then purified using GSTrap and HiTrap column and could be used for vaccine candidate or for antibody generation.

Virus hepatitis B merupakan penyebab utama hepatitis akut yang dapat berlanjut menjadi kronis, sirosis dan kanker hati. Hepatitis B ditemukan di seluruh dunia, terutama di negara-negara berkembang. Saat ini terdapat sekitar 400 juta orang terinfeksi kronis dan memiliki resiko untuk berlanjut menjadi sirosis dan kanker hati. Komplikasi akibat virus ini telah mengakibatkan sekitar 1 juta orang meninggal setiap tahun (Joshi and Kumar, 2001; Kimura *et al.*, 2005).

Prevalensi infeksi Virus Hepatitis B di Indonesia, seperti halnya Negara-negara berkembang pada umumnya, adalah termasuk sedang sampai tinggi (Soewignjo dan Mulyanto, 1984). WHO telah menghimbau segera melaksanakan usaha pencegahan. Pengobatan terhadap penderita penyakit hepatitis B yang sangat mahal (harga obat mencapai jutaan rupiah/tablet), menyebabkan tindakan pencegahan melalui vaksinasi merupakan tindakan yang lebih tepat. Vaksinasi secara besar-besaran dinilai efektif untuk mencegah terjadinya penyakit ini. Tahun 1987 pemerintah Indonesia menjadikan Pulau Lombok sebagai model immunisasi massal hepatitis B pertama di dunia. Hal ini disebabkan karena tingkat endemik penyakit tersebut di Pulau Lombok paling tinggi. Hasil proyek percontohan tersebut cukup menggembirakan sehingga pemerintah mulai memperluas program immunisasi ke 4 propinsi yang lain di tahun 1991 dan kemudian ke 6 propinsi yang lainnya lagi pada tahun 1992. Saat ini pemerintah Indonesia telah mengintegrasikan vaksinasi hepatitis B untuk balita ke dalam Program Pengembangan Immunisasi (*Extended Program of Immunization*).

Proyek immunisasi massal di Lombok menunjukkan penggunaan vaksin konvensional mampu menurunkan prevalensi hepatitis B hanya sampai 70% (Mulyanto *et al.*, 2002). Belum optimalnya hasil immunisasi hepatitis B ini antara lain disebabkan oleh

masih rendahnya antigenisitas dan immunogenisitas vaksin konvensional (*Korean Green Cross*) yang digunakan. Vaksin konvensional tersebut berasal dari plasma darah orang asing sehingga tidak mampu menstimulasi munculnya tanggap kebal (antibodi) spesifik yang mampu melawan virus hepatitis B yang terdapat di Indonesia (Joung *et al.*, 2004). Selain itu, keberhasilan program immunisasi menyebabkan pasien hepatitis B yang akan menjadi sumber vaksin tersebut semakin berkurang yang berakibat pada semakin terbatasnya darah yang dapat digunakan sebagai sumber vaksin. Sehingga produksi vaksin hepatitis B dengan menggunakan plasma semakin sulit dilakukan. Kekhawatiran terhadap adanya kontaminan pada darah terutama oleh virus berbahaya seperti HIV, menimbulkan kekhawatiran tersendiri untuk menggunakan vaksin yang bersumber dari plasma tersebut (Joung *et al.*, 2004).

Teknologi DNA rekombinan yang memungkinkan digunakan untuk menghasilkan protein rekombinan pada bakteri sangat penting untuk mengatasi permasalahan tersebut. Produksi vaksin dengan menggunakan bakteri akan dapat memenuhi semakin tingginya permintaan vaksin dengan membutuhkan waktu yang relatif singkat dan biaya yang lebih murah. Selain itu, teknologi DNA rekombinan dan teknologi produksi pada bakteri memungkinkan dilakukan berbagai upaya rekayasa epitop dalam rangka meningkatkan kualitas vaksin yang akan dihasilkan.

Escherichia coli merupakan bakteri yang menjadi pilihan utama diantara aneka bakteri yang telah digunakan sebagai inang dalam menghasilkan protein rekombinan, baik di bidang riset maupun industri.

Correspondence:

Ir. Slamet Riyadi, MP., Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Animal Science, University of Mataram, Jalan Majapahit No.62, Mataram 83125, Phone: 085217886729, E-mail: riyadi_unram@yahoo.com

Hal ini karena bakteri *Escherichia coli* membutuhkan biaya media yang murah, cepat berkembang biak, serta teknologinya sudah berkembang paling luas (Hu *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2005; Lombardi *et al.*, 2005). Berbagai protein rekombinan dari bakteri, *archaeobacteria*, maupun dari eukaryotik dapat diproduksi secara efisien pada *E. coli* (Kristensen *et al.*, 2005).

Biosintesis bagian *fragmen* dari antigen permukaan hepatitis B “HBsAg100” telah dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan *Escherichia coli* sebagai inang. Selain itu, gen penyandi antigen permukaan hepatitis B tersebut digabung (*fusi*) dengan gen penyandi enzim *gluthation-S-transferase* (GST) untuk meningkatkan ekspresi maupun kelarutan antigen yang sangat penting untuk aktifitas maupun proses pemurnian. Antigen ini diharapkan dapat menghasilkan kandidat vaksin rekombinan hepatitis B yang sesuai dengan genetik virus tersebut di Indonesia, karena gen penyandi antigen tersebut diisolasi dari virus Hepatitis B lokal yang terdapat di Indonesia. Antibodi yang dihasilkan juga diharapkan akan lebih efektif dalam melakukan proteksi terhadap virus hepatitis B yang terdapat di Indonesia.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Penelitian ini menggunakan dua jenis bakteri *E. coli* sebagai inang, yaitu *E. coli* DH5 α dan BL21. Sebagai media tumbuh digunakan media Luria Bertani yang mengandung 50 mg/ml ampisilin. Marker protein yang digunakan adalah Marker Nakalai (Nacalai TecQue., Inc., Kyoto, Japan) dengan berat molekul 6.500 sampai 200.000 Dalton. Pemurnian protein rekombinan menggunakan kolom GSTrap yang disambung dengan kolom HiTrap (Amersham) 1 ml. Sebagai *buffer* pengikatan menggunakan 140 mM

NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, dan 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3. Sedangkan *buffer* elusi menggunakan 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduced Gluthatione, pH 8,0. Enzim *protease inhibitor* yaitu *phenylmethyl sulfonyl floride* digunakan untuk mencegah degradasi protein rekombinan yang dihasilkan oleh protease.

Cara Kerja

Ekspresi protein rekombinan

E. coli DH5 α , dan BL21 yang membawa plasmid-plasmid rekombinan pengkode antigen dikultur pada media LB (4 ml) yang mengandung 50 mg/ml ampisilin. Kultur bakteri dilakukan pada suhu 37°C selama 14 jam dalam goyangan. Setelah OD nya mencapai 0,3, IPTG (*iso-propylthiogalactoside*) (0,1mM) ditambahkan pada biakan untuk merangsang produksi antigen. Setelah proses kultur selama 18 jam, biakan disentrifuse pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. *Buffer* PBS (1 ml) ditambahkan pada pelet untuk selanjutnya dilakukan pengujian kuantitas antigen yang dihasilkan dengan teknik SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*).

Uji kuantitas protein rekombinan yang dihasilkan dengan SDS-PAGE

Pelet biakan yang sudah diencerkan dengan *buffer* PBS (*Phosphate Buffer Saline*) tersebut ditambahkan 1 mg *lysozyme* dan 0,1 mg *Phenylmethyl sulfonyl floride* (PMSF), dilanjutkan dengan pemecahan dinding bakteri dengan teknik sonikasi berulang berdurasi satu menit. Sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit dilakukan untuk memisahkan protein rekombinan dan dinding sel bakteri. Supernatan yang diperoleh (5 μ l) ditambahkan dengan 5 μ l sampel *buffer* untuk SDS-PAGE (0,5mM Tris-HCl; 10% *glycerol*; 1,6% SDS; 0,1% *bromophenol blue*), dilanjutkan dengan proses denaturasi protein dengan

pemanasan pada suhu 80°-90°C selama 2-3 menit. Setelah itu, sampel siap di *loading* ke dalam agar *acrylamide* (37,82% larutan *acrylamide*; 22,6% *separation buffer*; 18,15% *glycerol*; 9,08% *ammonium persulfate*/APS dan 0,91% *tetra methyl ethylene diamine*/TEMED) untuk selanjutnya dilakukan elektroforesis selama 45 menit. Setelah melakukan pengecatan dengan *commassie brilliant blue* dan pencucian dengan larutan asam asetat dan methanol, pita antigen yang dihasilkan dapat dilihat langsung.

Pemurnian protein rekombinan

Pemurnian protein rekombinan merupakan pemisahan protein rekombinan (antigen permukaan virus hepatitis B-GST) dengan protein-protein yang secara alami diproduksi di dalam tubuh bakteri. Pemurnian antigen rekombinan dilakukan dengan menggunakan kolom GSTrap yang disambung dengan kolom HiTrap (Amersham) 1 ml. Kolom tersebut dibilas 5 kali dengan *binding buffer* (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, dan 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7.3). Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam kolom dan kolom tersebut ditempatkan di tempat yang lebih tinggi pada suhu 4°C untuk memungkinkan menetesnya *buffer* maupun protein rekombinan dari dalam kolom. Kemudian, kolom dibilas dengan *elution buffer* (50 mM Tris-HCl, 10 mM *reduced glutathione*, pH 8.0) untuk melepas protein rekombinan. Protein rekombinan akan terlepas dari kolom dan terlarut bersama *elution buffer*. Pengecekan terhadap *supernatant* yang keluar dari kolom dengan SDS-PAGE dilakukan untuk memastikan bahwa hanya protein rekombinan tersebut yang berhasil diikat oleh kolom. Adanya pita tunggal menunjukkan bahwa antigen yang dihasilkan adalah protein rekombinan (antigen permukaan hepatitis B-GST).

HASIL

Ekspresi protein rekombinan

Hasil ekspresi protein dari *E. coli* inang dapat dilihat pada Gambar 1. Penampakan pita protein target diperjelas dengan melakukan pengenceran sampel 10x. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa protein rekombinan diproduksi paling banyak oleh *E. coli* BL21. Hal ini terlihat dari pita protein target pada penggunaan inang tersebut paling tebal.

Gambar 1 juga memperlihatkan bahwa *E. coli* BL21 yang tidak membawa plasmid rekombinan (sampel nomor 1) memiliki pola penampakan pita yang berbeda dengan *E. coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan pGEX-4T-2 (sampel nomor 2) maupun pGEX-HB100 (sampel nomor 3-4). *E. coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan pGEX-4T-2 menunjukkan pita yang tebal dengan ukuran protein sekitar 28 kDa sesuai dengan ukuran enzim GST (Glutathion-S-Transferase) yang dihasilkan. Sedangkan *E. coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan pGEX-HB100 (sampel nomor 3-4) memiliki protein dengan ukuran sekitar 34,8 kDa karena merupakan gabungan antara GST yang memiliki berat 28 kDa dengan antigen S dengan ukuran 6,8 kDa.

Pemisahan terhadap hasil sonikasi untuk mengetahui bahwa protein rekombinan yang dihasilkan dalam bentuk terlarut (*soluble*), menggunakan sentrifugasi dan filterisasi dengan filter ukuran 0,22 µm. Kelarutan protein rekombinan ini sangat penting untuk mempermudah proses pemurnian. Hasil yang diperoleh baik larutan maupun pelet dimasukkan ke dalam gel akrilamid. Kelarutan dari protein rekombinan yang dihasilkan diperlihatkan oleh adanya pita-pita protein target pada bagian supernatan. Sebaliknya dengan hasil SDS-PAGE dari pelet bakteri yang tidak memperlihatkan adanya pita-pita dari protein



Gambar 1. Hasil ekspresi plasmid rekombinan. Kolom 1 = *E.coli* BL21 (tanpa membawa plasmid rekombinan), Kolom 2 = *E.coli* BL21 pembawa plasmid pGEX-4T-2, Kolom 3 = *E. coli* BL21 pembawa plasmid pGEX-HB100 terlarut, Kolom 4 = *E. coli* BL21 pembawa plasmid pGEX-HB100 terlarut dengan pengenceran 10x, Kolom 5 = *E. coli* BL21 pembawa plasmid pGEX-HB100 (pelet), Kolom 6 = *E. coli* BL21 pembawa plasmid pGEX-HB100 pellet dengan pengenceran 10x, Kolom 7 = *E. coli* DH5 α pembawa plasmid pGEX-HB100 terlarut, Kolom 8 = *E. coli* DH5 α pembawa plasmid pGEX-HB100 terlarut dengan 10 x pengenceran. M = Marker. Tanda panah pada Kolom nomor 2 menunjukkan enzim GST, sedangkan tanda panah pada Kolom nomor 4 menunjukkan protein fusi antara GST dan antigen Hepatitis B S100.

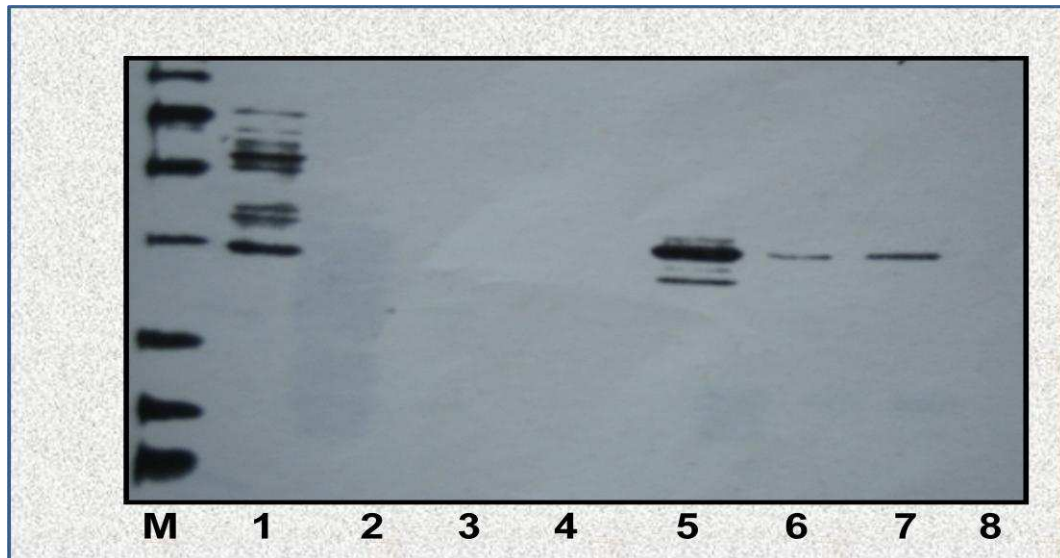
target menjadi indikator bahwa protein rekombinan tersebut berada dalam bentuk tak larut (*insoluble*).

Pemurnian protein rekombinan

Berdasarkan hasil di atas, maka untuk produksi antigen permukaan virus Hepatitis B digunakan strain *E. coli* BL21 dengan konsentrasi IPTG 0,1 mM. Pre-pemurnian antigen rekombinan dilakukan dengan menggunakan kolom GSTrap yang disambung dengan kolom HiTrap (Amersham) volume 1 ml. Fraksi-fraksi hasil pemurnian kemudian dielektroforesis (SDS-PAGE) untuk memastikan ada tidaknya protein target dan kemurnian protein rekombinan yang dihasilkan.

Hasil SDS-PAGE dari protein rekombinan hasil pemurnian ditampilkan

pada Gambar 2. Pita pada kolom nomor 1 merupakan pita dari protein bakteri hasil pencucian dengan PBS. Demikian pula dengan sampel nomor 2-4 yang merupakan pengenceran, namun pita tidak terlihat. Fraksi ini merupakan protein yang tidak dapat berikatan dengan dinding kolom karena tidak mengandung protein rekombinan. Pita pada kolom nomor 5 merupakan protein rekombinan fusi GST-HB100, sedangkan pita pada kolom nomor 6 merupakan hasil pengenceran (10x) protein rekombinan GST-HB100. Demikian pula dengan pita pada kolom nomor 7 yang merupakan cairan hasil penampungan dari protein rekombinan yang melalui pemecahan bakteri dengan sonikasi.



Gambar 2. Protein rekombinan hasil pemurnian. M = marker (ukuran berat molekul pada masing-masing pita dari atas ke bawah: 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21,5 kDa, 14,4 kDa, 6,5 kDa), Kolom 1 = protein bakteri (*unbound* protein), Kolom 2 = protein bakteri (*unbound* protein) diencerkan 10x, Kolom 3 = protein bakteri (*unbound* protein) 2, Kolom 4 = protein bakteri (*unbound* protein) 2 yang diencerkan 10x, Kolom 5 = protein rekombinan (*bound* protein), Kolom 6 = protein rekombinan (*bound* protein) dengan pengenceran 10x, Kolom 7 = protein rekombinan (*bound* protein) 2, Kolom 8 = protein rekombinan (*bound* protein) 2 dengan pengenceran 10x.

PEMBAHASAN

Virus hepatitis B merupakan virus DNA untai ganda dengan panjang genom mencapai 3,2-3,3 kilo pasangan basa. Virus yang termasuk famili *hepadnaviridae* tersebut memiliki genom yang terbungkus oleh *glycoprotein*. Siklus replikasi virus ini dimulai dengan melekatnya protein selubung tersebut pada sel hati. Di dalam inti sel hati, sintesis DNA virus disempurnakan, genom virus tersebut diubah menjadi cccDNA (*covalently closed circular DNA*). cccDNA inilah yang akan menjadi cetakan untuk sintesis RNA yang akan kemudian diubah menjadi DNA virus (Lok dan McMahan, 2001).

Penelitian ini telah menguji ekspresi plasmid rekombinan dengan menggunakan *E. coli* DH5 α serta *E. coli* BL21. *E. coli* DH5 α merupakan bakteri inang yang umum dipergunakan untuk tujuan kloning dan memperbanyak plasmid, sedangkan *E. coli* BL21 merupakan inang yang umum

digunakan untuk tujuan ekspresi. Perbedaan kedua strain bakteri *E. coli* tersebut adalah *E. coli* DH5 α memiliki banyak enzim protease baik di periplasma maupun sitoplasma, yang dapat mendegradasi protein rekombinan yang dihasilkan pada bakteri tersebut. Gengen penyandi enzim protease pada *E. coli* BL21 sudah dimutasi sehingga ekspresi protein rekombinan tidak akan mengalami degradasi yang intensif. Hal ini terlihat pada hasil SDS-PAGE pada Gambar 1 yang menunjukkan intensitas pita protein rekombinan ketika menggunakan *E. coli* BL21 sebagai inang lebih tebal dibandingkan dengan ketika menggunakan *E. coli* DH5 α . Tebalnya pita protein target masih terlihat walaupun dilakukan pengenceran sampai 10x. Sedangkan pengenceran 10 x pada protein yang diekspresi pada *E. coli* DH5 α sudah tidak terlihat.

Walaupun jumlah ekspresi protein rekombinan pada *E. coli* BL21 lebih tinggi dibandingkan pada *E. coli* DH5 α , secara

umum terlihat intensitas pita protein cukup tinggi. Hal ini antara lain disebabkan oleh fusi dengan glutathion-S-transferase (GST). Maeng *et al.* (2001) yang melakukan ekspresi gen virus hepatitis B secara parsial diikuti dengan menggabungkan gen tersebut (*fusi*) dengan gen penyandi enzim *glutathion-S-transferase* (GST) untuk meningkatkan ekspresi dan kelarutan antigen permukaan hepatitis B pre-S2 pada *E. coli* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan tingkat ekspresi antigen pre-S1 yang digabung dengan GST.

Berbagai macam *affinity tag*, seperti GST dan *polyhistidin*, dapat digunakan untuk meningkatkan ekspresi dan memfasilitasi pemurnian antigen rekombinan. Hasil pemurnian *fusi* HB-100 dan GST dalam penelitian ini menunjukkan bahwa antigen rekombinan yang diperoleh setelah pemurnian relatif murni dan dalam jumlah yang cukup untuk dapat digunakan dalam aplikasi (*assay*) selanjutnya (Gambar 2 pita nomor 5-7). Keberhasilan isolasi ini tidak terlepas dari sifat meningkatnya kelarutan protein rekombinan karena *fusi* dengan GST. Hal ini sesuai dengan pendapat Koschorreck *et al.*, (2005) yang melaporkan terjadi peningkatan solubilitas protein rekombinan yang digabung dengan GST.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Plasmid pGEX-HB100 berhasil diekspresi baik pada bakteri *E. coli* BL21 maupun *E. coli* DH5 α . Namun ekspresi pada bakteri *E. coli* BL21 menghasilkan protein rekombinan lebih tinggi. Protein rekombinan GST-HB100 yang telah diekspresikan oleh *E. coli* tersebut berhasil dipurifikasi.

Saran

Saran yang diajukan berdasarkan hasil penelitian ini adalah diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui tingkat imunogenisitas antigen yang dihasilkan. Oleh karena itu, penelitian *in vivo* dengan menggunakan mencit sebagai binatang percobaan sangat perlu dilakukan untuk melanjutkan penelitian ini.

Ucapan Terimakasih

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. dr. Mulyanto (Direktur Laboratorium Hepatitis Mataram) yang telah menyediakan bakteri *E. coli* DH5 α pembawa plasmid pGEMT-HB. Juga kepada Dr. Sulaiman N Depamede dan I Gusti Ayu Sri Andayani, S.Si. (Laboratorium Imunologi Universitas Mataram) atas bantuannya selama penelitian serta drh. Made Sriasih, M.Sc., Ph.D (Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Mataram) yang telah memberikan masukan berharga selama penelitian maupun penulisan artikel.

KEPUSTAKAAN

- Hu WG, Wei J, Yang XX, Xia HC, Li F, and Zhang ZC 2004. Expression of overlapping Pre-S1 Fragment Recombinant Proteins for the determination of immunogenic domains in HBsAg PreS1 region. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36 (6): 397-404.
- Joshi N, and Kumar A 2001. Immunoprophylaxis of hepatitis B virus infection. *Indian J. Med. Microbiol.* 19: 172-183.
- Joung YH, Youm JW, Jeon JH, Lee BC, Ryu JC, Hong HJ *et al.*, 2004. Expression of the hepatitis B surface S and preS2 antigens in tubulars of *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Rep.* 22: 925-930.
- Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S *et al.*, 2005. Hepatitis B virus DNA-negative Dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain. *J. Biol. Biochem.* 280: 21713-21719.

- Koschorreck M, Fischer M, Barth S, and Pleiss J 2005. How to find *soluble* proteins: a comprehensive analysis of alfa/beta hydrolases for recombinant expression in *E. coli*. *BMC Genomics* 6: 1-10.
- Kristensen J, Petersen HUS, Mortensen KK, Sorensen HP 2005. Generation of monoclonal antibodies for the assesment of protein purification by recombinant ribosomal coupling. *Int. J. Biol. Macromolecules* 37: 212-217.
- Lok ASF, and McMahon BJ 2001. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 34, 1225-1241.
- Lombardi A, Sperandei M, Cantale C, Giacomini P, Galeffi P 2005. Fungtional expression of a single-chain antibody specific or the HER2 human oncogene in a bacterial reducing environment. *Protein Expr. Purif.* 44: 10-15.
- Maeng CY, Oh MS, Park IH, Hong HJ 2001. Purification and structural analysis of the hepatitis B virus preS1 expressed from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 282: 787-792.
- Mulyanto, Soewignjo S, Gunawan S, Sumarsidi D, Kadir S, and Wiryo H 2002. Hepatitis B seroprevalence among children in Mataram, Indonesia: following a seven-year mass immunization program. Report meeting of the US-Japan cooperative medical science program asian region collaboration research project 2001, Shanghai.
- Soewignjo S, dan Mulyanto 1984. Epidemiologi infeksi virus Hepatitis B di Indonesia. *Acta Medica Indonesiana* 15: 215-230.