

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CPP  
PADA *Escherichia coli***

**Skripsi**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran (S.Ked)



**Oleh:**

**Peksi Saphira Miradalita**

**04011381722213**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**2020**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CPP PADA *Escherichia coli***

Oleh:

**Peksi Saphira Miradalita**  
**04011381722213**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana kedokteran

Palembang, 13 Januari 2021  
Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya

**Pembimbing I**  
**dr. Ella Amalia, M.Kes**  
**NIP. 198410142010122007**

**Pembimbing II**  
**dr. Ziske Maritska, M.Si, Med**  
**NIP. 198403262010122004**

**Penguji I**  
**dr. Rima Zanaria, M.Biomed**  
**NIP. 199009042015104201**

**Penguji II**  
**Dra. Lusia Hayati, M.Sc**  
**NIP. 195706301985032001**

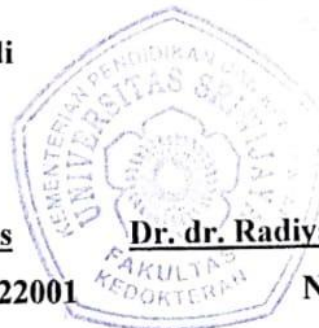
**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi**  
**Pendidikan Dokter**

**dr. Susilawati, M.Kes**  
**NIP. 197802272010122001**

**Wakil Dekan I**

**Dr. dr. Radiyati Umi Partan, Sp.PD-KR, M.Kes**  
**NIP. 197207172008012007**



## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda-tangan di bawah ini dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis saya, skripsi ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana, ~~magister dan/atau doktor~~), baik di Universitas Sriwijaya maupun di perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan dan penelitian Saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan verbal Tim Pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini Saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka Saya bersedia menerima sanksi akademik atau sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Palembang, 13 Januari 2021  
Yang membuat pernyataan



( Peksi Saphira Miradalita )

Mengetahui,

Pembimbing I



**dr. Ella Amalia, M.Kes**

**NIP. 198410142010122007**

Pembimbing II



**dr. Ziske Maritska, M.Si, Med**

**NIP.198403262010122004**

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

---

Sebagai civitas akademik Universitas Sriwijaya, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Peksi Saphira Miradalita  
NIM : 04011381722213  
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Skripsi

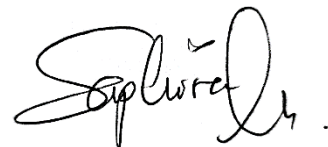
Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

### EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CPP PADA *Escherichia coli*

Beserta perangkatnya yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Palembang, 16 Januari 2020  
Yang membuat menyatakan,



Peksi Saphira Miradalita  
NIM. 04011381722213

## **EKSPRESI PROTEIN REKOMBINAN CPP PADA *Escherichia coli***

(Peksi Saphira Miradalita, Januari 2021, 33 halaman)

**Latar Belakang:** *Cell Penetrating Peptide* (CPP) merupakan salah satu sistem pembawa (*carrier*) yang biasanya terdiri dari 5-30 residu asam amino dan saat ini telah banyak dikaji sebagai vektor pengiriman untuk mengangkut RNA / DNA, plasmid, antibodi, dan nanopartikel ke dalam sel. Seiring dengan perkembangan pengetahuan, teknik analisis *in silico* protein sangat penting untuk memanfaatkan data untuk pengembangan untuk mendesain, mengoptimasi ekspresi protein rekombinan pada inang, serta memprediksi struktur bahkan aktivitas seluler. Dalam penelitian ini, penulis melakukan kajian terhadap CPP sebagai media penghantar (*carrier*) dan kemudian menggunakan teknik *in silico* untuk mengkonstruksi dan mengkarakterisasi gen penyandi protein rekombinan Penetratin serta memprediksi solubilitas protein yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan analisis bioinformatika agar mampu memprediksi struktur dan karakteristik CPP pada *Escherichia coli*.

**Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *in silico*. Data berupa sekuens asam amino diakses dari Pubmed dan *registry* iGEM. Penelitian ini menggunakan beberapa aplikasi berbasis *website* diantaranya, OptimumGene<sup>TM</sup>, *Predict Protein*, dan Protein-SOL.

**Hasil:** Analisis *in silico* menggunakan *Predict Protein* didapatkan komposisi struktur sekunder CPP (*Penetratin*) adalah 24% *beta-strand*, 48% *alpha-helix*, dan 28% *loop* dan persentase aksesibilitas pelarut adalah 96% *exposed*, 4% *buried*. Sedangkan, melalui analisis menggunakan Protein-SOL didapatkan solubilitas protein *Penetratin* sebesar 0.751.

**Kesimpulan:** Protein Rekombinan *Penetratin* memiliki struktur dominan *alpha helix*, dengan memiliki sifat hidrofilik dan juga mempunyai solubilitas protein yang tinggi.

**Kata kunci:** *CPP, protein rekombinan, uji in silico*

## **EXPRESSION OF RECOMBINANT CPP PROTEIN IN *Escherichia coli***

*(Peksi Saphira Miradalita, January 2021, 33 pages)*

**Background:** *Cell Penetrating Peptide* (CPP) is a carrier system which usually consists of 5-30 amino acid residues and has been widely studied as a delivery vector for transporting RNA / DNA, plasmids, antibodies, and nanoparticles into cells. With the development of knowledge, analysis techniques *in silico* are very important to design, optimize recombinant protein expression in the host, and predict structure and even cellular activity of proteins. In this study, author conducted a literature study of CPP as a carrier medium and then by using *in silico* techniques construct and characterize the recombinant protein coding gene CPP (Penetratin) and predict the solubility of the resulting protein. This study aims to provide a bioinformatics analysis in order to predict the structure and relationship of CPP in *Escherichia coli*.

**Methods:** This study is an experimental study with *in silico* approach. Data in the form of amino acid sequences were accessed from Pubmed and the iGEM registry. This study uses several website-based applications including OptimumGene™, Predict Protein, and Protein-SOL.

**Results:** It was found that the secondary structure composition of CPP (Penetratin) was 24% beta-strand, 48% alpha-helix, and 28% loops predicted by using Predict Protein and the percentage of solvent accessibility was consists of 96% exposed proteins, 4% buried proteins. From Protein-SOL, it was found that the solubility of Penetratin protein was 0.751.

**Conclusion:** From *in silico* analysis, it was concluded that recombinant protein penetratin has a dominant alpha-helix structure, has hydrophilic-dominant properties and also has a high protein solubility.

**Keywords:** *CPP, recombinant protein, in silico analysis*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan karya tulis yang berjudul “Ekspresi Protein Rekombinan CPP pada *Escherichia coli*” dengan baik. Karya tulis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini masih jauh dari sempurna, maka dari itu penulis menerima saran dan kritik demi pembuatan karya yang lebih baik kedepannya. Dalam proses penyusunan karya tulis ini, penulis menerima bantuan, petunjuk, kritik dan saran dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT karena telah memberi nikmat kesehatan dan kelancaran dalam penyusunan skripsi ini.
2. Ibu penulis, Mira Intan Sari yang selalu memberikan dukungan serta cinta kepada penulis beserta ketiga adik perempuan penulis yang selalu penulis banggakan dan sayangi, Pramesti Devi Angelita, Gayatri Alexandra Taylor, dan Janitra Isabella Aurora.
3. Dosen pembimbing penulis yang penulis sayangi dan hormati, dr. Ella Amalia M.Kes dan dr. Ziske Maritska, M.Si, Med, yang telah memberikan waktu, ilmu, motivasi dan bimbingannya selama masa perkuliahan, awal penulisan skripsi hingga saat ini.
4. Dosen penguji dr. Rima Zanaira, M.Biomed, dan Dra. Lusia Hayati, M.Sc atas saran, kritik, dan masukan yang membangun bagi kelancaran penulisan skripsi ini.
5. Sahabat – sahabat penulis, Kashaya, Safira, Zahra, Nada, Tasya, Junoretta, Novena, Mia, Ros, Michelle, Owen, Kavita, Finda, Abdullah dan Apritzal atas dukungan dan motivasinya untuk menyelesaikan penulisan ini.
6. Serta pihak lainnya yang penulis tidak dapat sebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis berharap karya ilmiah ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu kedokteran yang lebih luas, dan sekiranya mampu bermanfaat bagi para pembaca.

Palembang, Desember 2020

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penulisan .....	3
1.4. Manfaat Penulisan .....	3
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	3
1.4.2. Manfaat Praktis .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Cell-Penetrating Peptide (CPP) .....	4
2.1.1. Definisi CPP .....	4
2.1.2. Kelas CPP .....	5
2.1.3. Properti Fisika dan Kimia CPP .....	5
2.1.4 Mekanisme Kerja CPP.....	6
2.1.5 Kelebihan CPP sebagai Sistem Penghantar .....	9
2.2. Penetratin .....	9
2.3 Teknologi DNA Rekombinan.....	10
2.4. Protein Rekombinan .....	12



2.5 Kerangka Teori .....	19
 <b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1. Jenis Penelitian .....	20
3.2. Waktu Penelitian.....	20
3.3. Variabel Penelitian .....	20
3.3.1 Variabel Independen .....	20
3.3.2 Variabel Dependen .....	20
3.4. Definisi Operasional.....	21
3.5. Alat dan Bahan .....	23
3.5.1. Alat .....	23
3.5.2. Bahan .....	23
3.6. Cara Kerja	
3.6.1. Sekuens Penetratin.....	23
3.6.2. Konstruksi Protein Rekombinan.....	23
3.6.3. Optimisasi Gen Penyandi Penetratin .....	24
3.6.4. Prediksi Karakteristik dengan Predict Protein.....	24
3.6.5. Prediksi Solubilitas Protein dengan Protein-SOL.....	24
3.7. Kerangka Operasional .....	25
 <b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1. Optimisasi Gen Penyandi Penetratin .....	26
4.2. Analisis Karakteristik Penetratin dengan Predict Protein.....	29
4.2.1 Prediksi Struktur Sekunder Protein .....	29
4.2.1 Prediksi Solubilitas Pelarut Penetratin .....	29
4.3. Analisis Solubilitas Protein Rekombinan Penetratin.....	32
 <b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	33

5.2 Saran .....	33
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>34</b>
<b>BIODATA .....</b>	<b>43</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Contoh CPP, Struktur dan Mekanisme Internalisasinya .....	6
2. Definisi Operasional .....	21

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Teknologi Pengiriman Obat .....	7
2. Teknologi DNA Rekombinan .....	11
3. Diagram Transkripsi dan Translasi .....	15
4. <i>Workflow</i> dari Ekspresi Protein secara Umum.....	16
5. Vektor Kloning.....	17
6. Konstruksi Hexahistidine-tagged Penetratin .....	23
7. Posisi Relatif Kodon.....	27
8. Persentase Distribusi Kodon Penetratin .....	27
9. Rasio GC dari Gen Penetratin .....	28
10. Hasil Analisis Karakteristik dengan Predict Protein .....	30
11. Analisa Komposisi Struktur Sekunder Penetratin .....	31
12. Analisa Aksesibilitas Pelarut Penetratin .....	31
13. Grafik Protein-SOL .....	32

## DAFTAR SINGKATAN

cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CPP	<i>Cell Penetrating Peptide</i>
DNA	<i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
GAG	<i>Glycosaminoglycan</i>
GOI	<i>Gene of Interest</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
ORI	<i>Origin of Replication</i>
PTMs	<i>Post Translational Modifications</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SiRNAs	<i>Small Interfering RNAs</i>
CAI	<i>Codon Adaptation Index</i>
FOP	<i>Frequency of Optimal Codons</i>

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Terapi bioteknologi merupakan salah satu pendekatan terapeutik berbasis teknologi dengan menggunakan organisme tertentu secara utuh maupun hanya bagian-bagiannya saja dengan tujuan untuk menghasilkan produk yang menimbulkan efek terapi pada manusia maupun target makhluk hidup lainnya (Widyastuti, 2017). Beberapa penerapan terapi bioteknologi dapat ditemukan pada pengembangan terapi peptida, protein, antibodi, *small interfering RNAs* sebagai agen *gene silencing*, serta terapi makromolekul lainnya. Saat ini, terapi bioteknologi kerap diteliti lantaran memiliki efektivitas dan selektivitas yang jauh lebih baik jika dibandingkan dengan terapi konvensional. Salah satu terapi yang sering diteliti saat ini di bidang kedokteran adalah terapi peptida.

Seiring dengan perkembangan penelitian di bidang Bioteknologi Kedokteran, uji klinis terapi peptida sudah dilakukan dan sejauh ini diberikan melalui rute parenteral. Namun, jika dikaji dari segi kenyamanan dan penerimaan pasien, rute oral merupakan rute pemberian obat yang paling bisa diterima karena bersifat non-invasif. Namun, ada beberapa hal yang mempengaruhi penurunan efektivitas terapi jika diberikan secara oral yaitu ketersediaan hayati terapi peptida cenderung rendah jika dikonsumsi secara oral. Rendahnya ketersediaan hayati ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: berat molekul peptida yang tinggi, sifat hidrofilik peptida, serta kerentanannya yang tinggi terhadap degradasi enzimatik didalam saluran cerna (Khafagy and Morishita, 2012).

Sehingga, untuk meningkatkan efektivitas pemberian terapi peptida secara oral, peptida harus bisa diserap secara efisien di lumen usus menuju sirkulasi tanpa di metabolisme secara ekstensif di dalam usus (Khafagy and Morishita, 2012).

Salah satu solusi dalam menjawab keterbatasan ini adalah melalui penggunaan vektor atau sistem pembawa (*carrier*) yang dapat menghindari degradasi enzimatik dan barrier lainnya untuk kemudian dapat secara efektif menghantarkan kargo ke dalam sel. Sampai saat ini, penelitian mengenai sistem penghantaran obat (*drug delivery system*) terus dikembangkan. Beberapa contoh inovasi sistem penghantaran obat dengan hasil

penghantaran yang efektif adalah melalui struktur lipid, nanopartikel, serta peptida. *Cell-Penetrating Peptide*, merupakan salah satu contoh dari sistem penghantaran obat yang telah terbukti efektif sebagai *carrier* beberapa kargo terapi untuk berbagai penyakit (Dinca, Chien and Chin, 2016). Sampai saat ini, CPP dikaji untuk menjadi sistem pembawa RNA/DNA, plasmid, antibodi, hingga nanopartikel untuk dihantarkan ke intrasel (De Figueiredo *et al.*, 2014).

Istilah *in silico* berasal dari komponen komputer silicium. Uji *in silico* adalah suatu percobaan yang dilakukan dengan metode simulasi computer (studi komputasional). Metode *in silico* memiliki keuntungan karena dapat membuat prediksi cepat untuk sekumpulan besar senyawa dalam mode penghasilan yang tinggi.

Seiring dengan perkembangan pengetahuan, teknik analisis *in silico* protein sangat penting untuk memanfaatkan data untuk pengembangan untuk mendesain, mengoptimasi ekspresi protein rekombinan pada inang, serta memprediksi struktur bahkan aktivitas seluler. Analisis *in silico* protein sangat penting dan dapat mempermudah dan mempercepat proses evaluasi penelitian untuk melakukan proses ekspresi yang maksimal (Terol *et al.*, 2019).

Dalam penelitian ini, penulis melakukan kajian terhadap CPP sebagai media penghantar (*carrier*) dan kemudian menggunakan teknik *in silico* untuk mengkonstruksi dan mengkarakterisasi gen penyandi protein rekombinan Penetratin serta memprediksi solubilitas protein yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan analisis bioinformatika agar mampu memprediksi struktur dan karakteristik CPP pada *Escherichia coli*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

- a. Bagaimana karakteristik protein rekombinan CPP pada *E.coli* secara *in silico*?
- b. Bagaimana solubilitas protein rekombinan CPP pada *E.coli* secara *in silico*?

## **1.3 Tujuan Penulisan**

- a. Untuk mengetahui karakteristik protein rekombinan CPP pada *E.coli* secara *in silico*
- b. Untuk mengetahui solubilitas protein rekombinan CPP pada *E.coli* secara *in silico*

## **1.4 Manfaat Penulisan**

### **1.4.1 Manfaat Teoritis**

- a. Penelitian ini bermanfaat sebagai sumber referensi di kedokteran dan teknologi mengenai karakteristik protein rekombinan CPP sebagai sistem penghantaran obat dari kargo peptida.
- b. Penelitian ini bermanfaat sebagai sumber referensi di bidang kesehatan khususnya yang berkaitan dengan teknologi rekombinan DNA dalam menghasilkan CPP sebagai sistem pembawa dari kargo peptide.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

- a. Penelitian ini mampu menambah pemahaman dan pengetahuan terhadap karakteristik CPP sebagai *carrier* secara *in silico*
- b. Penelitian ini mampu menambah wawasan peneliti dalam melakukan penulisan laporan penelitian.



## DAFTAR PUSTAKA

Basi, A. *et al.* (2018) 'Protein expression handbook Recombinant protein expression and purification technologies', p. 118. Available at: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/protein-expression-handbook.pdf>.

Dinca, A., Chien, W. M. and Chin, M. T. (2016) 'Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). doi: 10.3390/ijms17020263.

De Figueiredo, I. R. *et al.* (2014) 'Cell-penetrating peptides: A tool for effective delivery in gene-targeted therapies', *IUBMB Life*, 66(3), pp. 182–194. doi: 10.1002/iub.1257.

Hacker, D. L. and Wurm, F. M. (2011) *Recombinant Technology*. Second Edi, *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. Second Edi. Elsevier B.V. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00120-3.

Jones, S. W. *et al.* (2005) 'Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery', *British Journal of Pharmacology*, 145(8), pp. 1093–1102. doi: 10.1038/sj.bjp.0706279.

Kamionka, M. (2011) 'Engineering of Therapeutic Proteins Production in Escherichia coli', *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2), pp. 268–274. doi: 10.2174/138920111794295693.

Khafagy, E. S. and Morishita, M. (2012) 'Oral biodrug delivery using cell-penetrating peptide', *Advanced Drug Delivery Reviews*. doi: 10.1016/j.addr.2011.12.014.

Khan, S. *et al.* (2016) 'Role of recombinant DNA technology to improve life', *International Journal of Genomics*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/2405954.

Kristensen, M., Birch, D. and Nielsen, H. M. (2016) 'Applications and challenges for use of cell-penetrating peptides as delivery vectors for peptide and protein cargos', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). doi: 10.3390/ijms17020185.

Lafferty, R. A. *et al.* (2019) 'Effects of 2 Novel PYY(1-36) Analogues, (P3L31P34)PYY(1-36) and PYY(1-36)(Lys12PAL), on Pancreatic Beta-Cell Function, Growth, and Survival', *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 12. doi:

10.1177/1179551419855626.

P, A. R. (2017) 'Role of Recombinant DNA Technology in Medicine', *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 6(6), pp. 792–793. Available at: <https://www.ijsr.net/archive/v6i6/ART20174124.pdf>.

Patel, S. G. *et al.* (2019) 'Cell-penetrating peptide sequence and modification dependent uptake and subcellular distribution of green florescent protein in different cell lines', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-42456-8.

Pham, P. V. (2018) 'Medical biotechnology: Techniques and applications', *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, pp. 449–469. doi: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1.

Satayu Pattarakijkusol, A. M. (no date) 'Title of Thesis'.

Terol, G. L. *et al.* (2019) 'Engineering protein production by rationally choosing a carbon and nitrogen source using E . coli BL21 acetate metabolism knockout strains', *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, pp. 1–19. doi: 10.1186/s12934-019-1202-1.

Widyastuti, D. A. (2017) 'Terapi Gen: Dari Bioteknologi Untuk Kesehatan', *Al-Kauniah: Jurnal Biologi*, 10(1), pp. 49–62. doi: 10.15408/kauniah.v10i1.4864.

Zieliński, M. *et al.* (2019) 'Expression and purification of recombinant human insulin from E. coli 20 strain', *Protein Expression and Purification*, 157(February), pp. 63–69. doi: 10.1016/j.pep.2019.02.002.