

KLONING GEN NANOBODI PENDETEKSI KORTISOL

SKRIPSI

ADIN PURNOMO ZENDRATO

A223009



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN HAZANAH

BANDUNG

2024

KLONING GEN NANOBOADI PENDETEKSI KORTISOL

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

ADIN PURNOMO ZENDRATO

A223009



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN HAZANAH

BANDUNG

2024

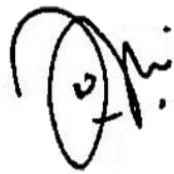
KLONING GEN NANOBODI PENDETEKSI KORTISOL

**ADIN PURNOMO ZENDRATO
A223009**

Oktober 2024

Disetujui oleh :

Pembimbing



Nur Asni Setiani, M.Si

Pembimbing



Irma Mardiah, M.Si

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia

*Terima kasih selalu menjadi langit yang menaungi di tengah badai hidupku, serta akar yang kokoh menopang setiap langkahku menuju masa depan. Bapakku, **Polala Zandrato**, dan ibuku, **Neni Yunita** yang luar biasa, kesabaran kalian selalu memberikan support yang tidak terkalahkan oleh siapapun sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini dengan baik.*

ABSTRAK

Nanobodi adalah antibodi domain tunggal yang berasal dari camelid (alpaka, llama, unta) dan hanya memiliki rantai berat. Gen nanobodi dapat diperbanyak melalui teknik PCR, kemudian disisipkan ke dalam vektor kloning untuk diperbanyak. Dalam PCR, beberapa aspek dapat dioptimalkan untuk meningkatkan efisiensi dan hasil amplifikasi DNA target. Penelitian ini bertujuan mengetahui desain primer dan suhu *annealing* yang optimal serta mengkloning gen nanobodi ke dalam vektor plasmid pGEM-T. Hasil penelitian mendapatkan dua pasang primer yaitu NbCor 1 dengan penambahan sisi restriksi *NcoI* pada primer *forward* (5'-GAT ATA CCA TGG GCC AGG-3') dan tanpa penambahan *NdeI* pada primer *reverse* (5'-CCA CCA GTC ATG CTA GCC A-3'), dan NbCor 2 dengan penambahan sisi restriksi *NcoI* pada primer *forward* (5'-GAT ATA CCA TGG GCC AGG TTC-3') dan primer *reverse* dengan penambahan *NdeI* (5'-CCA CCA GTC ATG CTA GCC ATA TG-3'), yang dimana pada kedua pasang primer memiliki nilai Tm dan persentase GC yang sesuai persyaratan. Setelah dilakukan optimasi variasi suhu *annealing* pada kedua primer, diketahui NbCor 2 dengan suhu 52°C terbukti paling optimal karena menghasilkan pita DNA yang tebal dan lebih jelas sekitar 400 bp, sesuai dengan target. *Amplicon* NbCor 2 pada suhu 52°C berhasil diligasikan ke dalam vektor pGEM-T dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* TOP 10. Keberhasilan kloning gen nanobodi dibuktikan dengan munculnya koloni putih pada hasil transformasi.

Kata kunci: kloning, kortisol, nanobodi, PCR, transformasi.

ABSTRACT

Nanobodies are single-domain antibodies derived from camelids (alpacas, llamas, camels) and consist only of a heavy chain. Nanobody genes can be amplified through PCR and then inserted into a cloning vector for further replication. In PCR, several aspects can be optimized to improve the efficiency and yield of the target DNA amplification. This study aimed to determine the optimal primer design and annealing temperature, as well as to clone the nanobody gene into the pGEM-T plasmid vector. The results yielded two pairs of primers: NbCor 1, with an NcoI restriction site added to the forward primer (5'-GAT ATA CCA TGG GCC AGG-3') but no NdeI site added to the reverse primer (5'-CCA CCA GTC ATG CTA GCC A-3'), and NbCor 2, with an NcoI site added to the forward primer (5'-GAT ATA CCA TGG GCC AGG TTC-3') and an NdeI site added to the reverse primer (5'-CCA CCA GTC ATG CTA GCC ATA TG-3'). Both primer pairs had melting temperature (T_m) and GC content that met the necessary requirements. After optimizing the annealing temperature for both primers, NbCor 2 with an annealing temperature of 52°C proved to be the most optimal, as it produced a clear and thick DNA band of approximately 400 bp, matching the target. The NbCor 2 amplicon at 52°C was successfully ligated into the pGEM-T vector and transformed into E. coli TOP 10. The success of the nanobody gene cloning was confirmed by the appearance of white colonies in the transformation results.

Keywords: cloning, cortisol, nanobodies, PCR, transformation.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**KLONING GEN NANOBODI PENDETEKSI KORTISOL**”. Penulisan skripsi ini ditujukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada program Studi Sarjana Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia. Penulis menyadari bahwa skripsi ini dapat selesai dengan baik atas dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah telah mendukung dan membantu dalam proses penyelesaian penelitian ini, khususnya kepada:

1. Dr. Apt. Adang Firmansyah, M.Si. selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. Apt. Diki Prayugo, M.Si. selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. Dr. Apt. Wiwin Winingsih, M.Si. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. Dr. Syarif Hamdani, M.Si. selaku Dosen Wali yang telah memberikan bimbingan serta arahan kepada penulis selama menempuh pendidikan,
5. Nur Asni Setiani, M.Si. selaku Dosen Pembimbing utama yang telah bersedia membimbing penulis serta memberikan ilmu dan wawasan terkait dengan keilmuan di Bidang Bioteknologi hingga tersusunnya skripsi ini,
6. Irma Mardiah, M.Si. selaku Dosen Pembimbing serta yang telah bersedia membimbing, memberikan ilmu dan wawasan kepada penulis serta menyempurnakan skripsi ini,
7. Seluruh dosen, asisten laboratorium, laboran dan civitas akademika kampus Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia beserta jajarannya yang telah membantu keberlangsungan penyusunan skripsi,
8. Kedua orang tua paling berjasa dalam hidup penulis, telah banyak memberi dukungan moral, materi dan doa, terimakasih atas kepercayaan yang telah diberikan untuk melanjutkan pendidikan sarjana sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi,
9. Teman-temanku Fadila Haya Dzuary, Nur Apni Fauziah, Alifa Brilian, Putri Wulandari, Nur Amalia Karepesina, Putri Talcha Oktaviany, Muhammad Shidiq Rukman, dan juga Silvana Marwani Buntu Saleko yang selalu menghadirkan tawa, serta senantiasa bersedia menjadi pendengar yang baik bagi penulis,
10. Teman-teman mahasiswa RPL 2022 yang dari awal perkuliahan sudah berjuang bersama hingga akhir masa studi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
11. Serta semua pihak yang terkait dan telah membantu selama penyusunan skripsi ini berlangsung, hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini,

12. Terakhir terimakasih untuk diri sendiri, karena telah mampu berusaha keras berjuang sampai sejauh ini tidak menyerah dan terus berusaha sampai akhirnya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan dari segi materi maupun teknik penulisan. Oleh karena itu, penulis menerima saran dan masukan yang membangun untuk menyempurnakan penelitian ini. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan dari berbagai pihak yang telah membantu dalam proses penyusunan skripsi ini.

Bandung, 22 Oktober 2024

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I PENDAHULUAN	Error! Bookmark not defined.
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Identifikasi Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.4 Kegunaan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
2.1 Nanobodi (Nb).....	Error! Bookmark not defined.
2.2 Kortisol.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Komponen PCR	Error! Bookmark not defined.
2.4 pGEM-T easy	Error! Bookmark not defined.
2.5 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Error! Bookmark not defined.
BAB III TATA KERJA	Error! Bookmark not defined.
3.1 Alat	Error! Bookmark not defined.
3.2 Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
3.3 Metode Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.3.1 Alur Penelitian	Error! Bookmark not defined.
3.3.2 Desain Primer.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.3 PCR	Error! Bookmark not defined.
3.3.4 Elektroforesis DNA	Error! Bookmark not defined.
3.3.5 Ligasi.....	Error! Bookmark not defined.
3.3.6 Transformasi	Error! Bookmark not defined.

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASANError! Bookmark not defined.

4.1 Desain PrimerError! Bookmark not defined.

4.2 PCR.....Error! Bookmark not defined.

4.3 Elektroforesis.....Error! Bookmark not defined.

4.4 LigasiError! Bookmark not defined.

4.5 Transformasi.....Error! Bookmark not defined.

BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYAError! Bookmark not defined.

5.1 SimpulanError! Bookmark not defined.

5.2 Alur Penelitian Selanjutnya.....Error! Bookmark not defined.

DAFTAR PUSTAKA..... 9

LAMPIRAN.....Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hasil analisis primer NbCor 1.....	Error! Bookmark not defined.
4.1 Hasil analisis primer NbCor 2.....	Error! Bookmark not defined.
4.2 Hasil penentuan suhu annealing.....	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Skema Generasi Nanobodi	Error! Bookmark not defined.
2.2 Struktur Hormon Kortisol.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Komponen PCR.....	Error! Bookmark not defined.
2.4 Peta Plasmid pGEM-T easy.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Escherichia coli.....	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi kegiatan penelitian	Error! Bookmark not defined.
2. Perhitungan transformasi	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, A., Rahim, R.A., Arshad, M., Nabilah, M., Voon, C., Tang, T. dan Citartan, M. (2017) 'Current and Potential Developments of Cortisol Aptasensing towards Point-of-Care Diagnostics (POTC)', *Sensors* 2017, Vol. 17, Page 1180, 17(5), p. 1180. <https://doi.org/10.3390/S17051180>
- Baroroh, U., Setiani, N. A., Mardiah, I., Astriany, D., & Yusuf, M. (2022). *Computational Design of Nanobody Binding to Cortisol to Improve Their Binding Affinity Using Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. Indonesian Journal of Chemistry*, 22(2), 515-525.
- Bernadus, Z., Fatimawati, F., dan Kolondam, B. 2019. Transformasi Plasmid Yang Mengandung Gen Merb Pada Escherichia Coli B121(DE3), *PHARMACON*, 8(1): 196-202.
- Borah, P. 2011. —Primer Designing for PCR. || Colloquium faculty Science Vision 11: 134-136.
- Choiriyah, U., Nurjayadi, M., dan Dewi, F. 2013. Subkloning dan Ekspresi Gen fim-C S. typhimurium. *Jurnal Riset Sains dan Kimia Terapan*, 3(2): 280-291
- Fatchiyah, A. E., Widyarti, S., & Rahayu, S. (2011). Biologi molekular. *Prinsip dasar analisis. Penerbit Erlangga. Jakarta*, 22-57.
- Harahap, M. 2018. Elektroforesis: Analisis Elektronika Terhadap Biokimia Genetika. *CIRCUIT Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*, 2(1): 21-26
- Hasibuan, E. 2015. *Peranan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) Terhadap Perkembangan Ilmu Pengetahuan*. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Hidayati, S. N. (2016). 7. Pertumbuhan *Escherichia coli* yang diisolasi dari feses anak ayam broiler terhadap ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 10(2).
- Kaushik, A., Yndart, A., Jayant, R.D., Sagar, V., Atluri, V., Bhansali, S. dan Nair, M. (2015) 'Electrochemical sensing method for point-of-care cortisol detection in human immunodeficiency virus-infected patients', *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp. 677–685. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75514>.
- Manning SD. (2010). *Deadly Diseases and Epidemics: Escherichia coli Infection*, Ed ke-2. New York: Chelsea Publishers.
- Murtiyaningsih, H. 2017. Isolasi DNA Genom dan Identifikasi Kekerbatan Genetik Nanas menggunakan RAPD (Random Amplified Polimorfic DNA). *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 15(1): 83-93.
- Pleiner, T., Bates, M., Trakhanov, S., Lee, C. T., Schliep, J. E., Chug, H., & Görlich, D. (2015). Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging,

- rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *elife*, 4, e11349.
- Pratiwi, R. D. 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*, Universitas Padjadjaran, 7(2), 91.
- Ramos, C. R. R., Abreu, P. A. E., Nascimento, A. L. T. O., and Ho, P. L. 2004. "A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8).
- Sanjaya, E. H. (2016). Inseri gen pncA ke dalam plasmid pGEM-T. *Jurnal Kimia Riset*, 1(2), 135-144.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., Muhimmah, I. 2014. Karakteristik primer pada polymerase chain raction (PCR) untuk sekuensing DNA. *Mini Review SNIMed* 93-102.
- Septiari, I.G.A., Yustiantara, P.S., Yowani, S.C. 2015. Analisis Primer Untuk Amplifikasi Promoter Inha Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Kimia* 9 (1): 117- 123
- Setyawati, R., & Zubaidah, S. (2021). Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu Annealing dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 36-40.
- Shahzad, S., Afzal, M., Sikandar, S., & Afzal, I. (2020). *Polymerase chain reaction*. In *Genetic Engineering-A Glimpse of Techniques and Applications*. IntechOpen.
- Siallagan, C. S., Syafi'i, M., Samaullah, M. Y., Susanto, U., Pramudyawardani, E. F., & Prastika, D. (2022). VISUALISASI GEL AKRILAMIDA SIDIK JARI DNA 49 GENOTIPE PADI (*Oryza sativa* L) MENGGUNAKAN MARKA SSR (Simple Sequence Repeat). *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 8(8), 32-37.
- Susilowati, T. 2019. Deteksi Kontaminan DNA Babi pada Sampel Penggilingan Daging di Pasar Surya Kota Surabaya Menggunakan *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Skripsi. UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya.
- Tadesse, F., Negessu, D., Bilata, T., Muluneh, A., & Shegu, D. (2020). Cloning Nanobody cDNA into pHEN6c Plasmid Vector. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 24(2), 18013-18018.
- Tamami, N (2022), 'Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi Kortisol pada bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan Variasi Suhu 'Skripsi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., and Case, C. L. 2010. *Microbiology: an introduction*. San Francisco: Benjamin Cummings.

Yang X, Wang H. 2014. *Pathogenic E. coli*. Lacombe Research Centre, Lacombe, Canada.

Yusuf, Z. K. 2010. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Saintek. 5(6): 1–6.