

OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI *Escherichia coli* BL21 (DE3) DENGAN VARIASI KONSENTRASI BUFFER LISIS

SKRIPSI

**NOVI OKTAVIANI
A191031**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2023**

OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI *Escherichia coli* BL21 (DE3) DENGAN VARIASI KONSENTRASI BUFFER LISIS

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**Novi Oktaviani
A191031**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2023**

OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI *Escherichia coli* BL21 (DE3) DENGAN VARIASI KONSENTRASI BUFFER LISIS

**NOVI OKTAVIANI
A191031**

Agustus 2023

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.

Skripsi ini penulis persembahkan kepada kedua orang tua (Enung Danyati dan Witarya), Adek-Adek (Nova dan Putri), Kakek, Emah dan Mpah, keluarga besar saya yang selalu memberi dukungan dan doa, tak lupa kepada Grup Umroh 2024 yang selalu mensupport dan kebersamai dalam suka maupun duka .

ABSTRAK

Nanobodi dapat diekspresikan oleh *Escherichia coli* sebagai protein intraseluler, sehingga untuk memperolehnya harus dengan pemecahan sel. Untuk menghasilkan protein nanobodi dari bakteri inang *E. coli*, dilakukan penentuan konsentrasi buffer Tris HCl yang optimal untuk membantu menstabilkan protein dan pH pada saat sel dipecah menggunakan sonikator, Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi buffer Tris HCl dalam pengoptimalan proses isolasi protein dan divalidasi dengan SDS PAGE. Sampel yang digunakan adalah plasmid pET-28a yang ditransformasikan ke dalam bakteri *Escherichia coli* dan diekspresikan pada kondisi suhu optimum 25°C dengan penambahan IPTG 0,6 mM hasil ekspresi diisolasi dengan penambahan buffer Tris HCl. Variasi konsentrasi buffer Tris HCl yang digunakan yaitu 5 mM, 10 mM, dan 20 mM menggunakan sonikasi selama 30 menit. Hasil penelitian menunjukkan pada konsentrasi 10 mM dihasilkan kadar protein total tertinggi pada mutan dan natif yaitu 19,6036 mg/dl dan 68,4324 mg/dl. Dengan validasi SDS PAGE terbukti pada ketebalan pita tertinggi tercatat pada nanobodi natif, dengan nilai AUC 31455,990 piksel, dan nanobodi mutan, dengan nilai AUC 36773,153 piksel. Dapat disimpulkan bahwa penambahan buffer Tris HCl pada konsentrasi 10 mM merupakan yang optimal baik untuk nanobodi mutan maupun natif.

Kata Kunci: Nanobodi, kortisol, isolasi protein, buffer Tris HCl, SDS-PAGE.

ABSTRACT

Nanobodies can be expressed by Escherichia coli as intracellular proteins, so to acquire them must be by cell breakdown. To produce protein nanobodies from the host bacterium E. coli, determination of the optimal concentration of Tris HCl buffer was carried out to help stabilize the protein and pH at the time of the cell being broken down using a sonicator; The aim of this study to determine the effect of variations in Tris HCl buffer concentration in optimization of the protein isolation process and validated with SDS PAGE. The sample used was a PET-28A plasmid transformed into the bacterium Escherichia coli and expressed at optimum temperature conditions of 25oC with the addition of 0.6 mM IPTG the expression result was isolated by addition of Tris HCl buffer. Variations in Tris HCl buffer concentrations used were 5 mM, 10 mM, and 20 mM using sonication for 30 min. The results showed that at a concentration of 10 mM the highest total protein levels in mutants and natives were 19,6036 mg/dl and 68.4324 mg/dl. With SDS validation PAGE proved at the highest band thickness recorded on native nanobodies, with AUC values of 31455,990 pixels, and mutant nanobodies, with an AUC value of 36773,153 pixels. It can be concluded that the addition of Tris HCl buffer at a concentration of 10 mM is optimal for both mutant and native nanobodies.

Keywords: Nanobody, cortisol, protein isolation, Tris HCl buffer, SDS-PAGE.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah rabbil'alamini, puji dan syukur dipanjatkan kepada Allah SWT yang mana atas segala nikmat, rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Optimasi Isolasi Protein Nanobodi dari *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan Variasi Konsentrasi Buffer Lisis”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat mendapatkan gelar sarjana pada Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada dosen pembimbing Nur Asni Setiani M. Si. dan Irma Mardiah, M.Si. atas bimbingan nasihat, dukungan serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si, selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo Wibowo, M.Si, selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si, selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
4. Dr. apt. Sani Nurlaela Fitriansyah M.Si ,selaku Dosen Wali yang selalu memberikan bimbingan, dukungan serta motivasi,
5. Seluruh staf dosen, staf administasi, asisten laboratorium serta seluruh karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Orangtua yang sudah memberikan do'a dan selalu mendukung baik secara material maupun moril selama perkuliahan,
7. Serta kepada teman-teman terdekat dan mahasiswa/i angkatan 2019 yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang sangat membantu dalam menyelesaikan skripsi ini, memberikan semangat dan kegembiraan selama kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Agustus 2023
Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR KUTIPAN	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kortisol	4
2.2 Nanobodi.....	4
2.3 Protein Rekombinan	5
2.4 <i>Escherichia coli</i>	6
2.5 Lisis.....	7
2.6 SDS PAGE	8
BAB III TATA KERJA.....	10
3.1 Alat.....	10
3.2 Bahan	10
3.3 Metode Penelitian	10
3.3.1. Ekspresi Protein.....	10
3.3.2. Isolasi Protein	11
3.3.3. SDS-Page.....	11
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
4.1 Ekspresi Protein	13
4.2 SDS PAGE	14
4.3 Isolasi Protein	15
4.4 SDS-PAGE.....	17
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....	21
5.1 Simpulan	21
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	21
DAFTAR PUSTAKA	22
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

Tabel		halaman
4.1	Hasil bobot sel bakteri transforman setelah produksi	13
4.2	Bobot pelet hasil sentrifugasi isolasi protein	17
4.3	Hasil pengukuran kadar protein.....	17
4.4	Berat Molekul Natif dan Mutan (kDa)	19
4.5	Tebal Pita Protein Natif dan Mutan	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
2.1 Struktur Molekul Kortisol.....	4
4.1 Visualisasi SDS PAGE Natif dan Mutan.	15
4.2 Hasil sentrifugasi setelah di sonikator	16
4.3 Visualisasi hasil SDS PAGE mutan dan natif	18

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Alur Penelitian	24
2. Pembuatan Larutan	25
3. Gambar Kegiatan Penelitian.....	26
4. Prosedur Pembuatan Larutan Larutan Sds Page	27
5. Berat Pelet Sel Bakteri Setelah Ekspresi	28
6. Bobot Pelet Isolasi Protein	29
7. Perhitungan Kadar Protein.....	30
8. Perhitungan Ukuran Pita Protein Mutan.....	31
9. Perhitungan Ukuran Pita Protein Natif.....	33

DAFTAR PUSTAKA

- Agus, R., and I. (2017) “‘Ligasi Gen Rv 1980c Pengkode Protein MPT 64 KE pGEM-T Mycobacterium tuberculosis Sebagai Antigen untuk Immunodiagnostik Tuberkulosis Laten.’”, *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, pp. 8(15), 42–48.
- Babaeipour, V., Abbas, H. P. M., Sahebazar, Z., dan Alizadeh, R. (2010) ‘Enhancement of human granulocyte colony stimulating factor production in recombinant E. coli using batch cultivation.’, *Bioprocess Biosyst England*, Vol.33, pp. 591–598.
- Ding, L., Wang, Z., Zhong, P., Jiang, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Ren, Z., and D. and Y. (2019) “‘Structural insights into the mechanism of single domain VHH antibody binding to cortisol’”, *FEBS Letters*, Wiley Blackwell, pp. 593(11), 1248–1256.
- Frank, C. (2011) ‘SDS-PAGE (polyacrilamid gel electrophoresis)’.
- Gomes, L., Monteiro, G., and Mergulhão, F. (2020) ‘The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by Escherichia coli biofilms.’”, *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, p. 21(2).
- Huang H, Ling W, Qiu T, L.Y. (2018) ‘Ultrasonographic features of testicular metastasis from renal clear cell carcinoma that mimics a seminoma: A case report’, *Medicin (Baltimore)*, p. 97:e12728.
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S.K., P. and S.K., Bhansali, S. (2014) ‘Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application.’, *Biosens. Bioelectron.*, pp. 53, 499–512.
- Kusuma, S.F. (2020) ‘Ekspresi Single Chain Fragment Variable Anti_NS1 Virus Dengue Serotipe 2 Dengan Variasi Konsentrasi IPTG Dan Suhu Dalam Media Luria Bertani’, *Skripsi*, p. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
- Lisdiana (2012) ‘Regulasi Kortisol Pada Kondisi Stres Dan Addiction’, *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, pp. 18–26.
- Ma X, Su E, Deng S, Xie Y, W.D. (2014) ‘An efficient method for recovering recombinant Cephalosporin C deacetylase from the cytoplasm of E. coli cells’, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* [Preprint].
- Mega, O., Sumantri, C., Arief, I. I., and Budiman, C. (2019) ‘Expression of Lon-like Protease Gene from Lactobacillus plantarum IIA-1A5 in Escherichia coli BL21(DE3).’, *Jurnal Agripet, Agricultural Faculty, Syiah Kuala University*, 19(2), pp. 149–158.
- Michailidis, Y. (2014) ‘Stress hormonal analysis in elite soccer players during a season.’, *Journal of Sport and Health Science*, pp. 3(4), 279–283.
- Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono, dan N.K. (2016a) ‘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), pp. 515–525. Available at: <https://doi.org/10.22146/ijc.71480>.
- Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono, dan N.K. (2016b) ‘Ekstraksi Protein dari Escherichia coli BL21 Rekombinan Gen Mycobacterium tuberculosis dengan Variasi Waktu Inkubasi Induksi Isopropyl-β-D-Thiogalactosidase (IPTG) dan Metode Lisis Sel’, *Jurnal Biologi*, 4 No 2,

- pp. 60–68.
- Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono, dan N.K. (2016c) ‘Nanobodi, Fragmen Antibodi Terkecil Untuk Terapi Berbagai Penyakit’, *BioTrends, Bogor*, pp. 8(1), 17–23.
- Muhammad Iqbal, Ibnu Dwi Buwono, dan N.K. (2016d) ‘Pemurnian protein...’, Pauline Leon Artha, FT UI, 2012’, 3(1).
- Muyldermans, S. (2013) ‘Nanobodies: Natural singledomain antibodies’, *Annu. Rev. Biochem*, pp. 82 (1), 775–797.
- Naeni, N.N. (2022) ‘Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi Kortisol pada Bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan Variasi Konsentrasi Isopropyl- β -D_Thiogalactopyranoside (IPTG)’, *skripsi*.
- Nasution1, U.J. *et al.* (2018) ‘Pemurnian Enzim Sefalosporin-C Asilase dan Optimasi Proses Kromatografi afinitas’, *Bioteknologi & Biosains Indonesia*.
- Oktaviani1, E. and Maya Ekaningtias (2018) ‘ANALISIS PROTEIN ISOLAT BAKTERI *Escherichia coli* BL 21 MENGGUNAKAN Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Elektrophoresis (SDS-PAGE)’, *Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains (PENBIOS)*, 4(1).
- Roy, S., dan Kumar, V. (2014) ‘A Practical Approach On SDS PAGE For Separation Of Protein’, *Internasional Jurnal Of Science And Research*, pp. 3(8): 2319-7064.
- Samban, M. (2018) ‘PEMURNIAN PROTEIN REKOMBINAN pQE30- MPT 64 DARI *Mycobacterium tuberculosis* SEBAGAI IMUNODIAGNOSTIK TUBERKULOSIS LATEN’, *skripsi Departemen biologi Fakultas matematika Dan ilmu Pengetahuan Alam Universitas HasanuddinMakasar*.
- Saputra, F.R. (2014) ‘Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) Untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin Pada Kapsul Keras’, *Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*. [Preprint].
- Satwika, respatiphala ardha (2010) ‘kombinasi metode sonikator, pemanasan dan fraksinasi amonium sulfat untuk ekstraksi enzim fosfolipase-A2 dari *acanthaster planci*’, *skripsi*.
- Silaban, S., Maksum, I. P., Hasan, K., Enus, S., Subroto, T., Soemitro, S., N. and M., Sakit, R., and Cicendo, M. (2015) ‘Pemurnian Pretrombin-2 Manusia Rekombinan di *Escherichia coli* untuk Produksi Trombin sebagai Komponen Lem Fibrin.’, *PROSIDING SNIJA*.
- de Vos, J., Devoogdt, N., Lahoutte, T., Muyldermans, S., and Muyldermans, S. (2013) ‘“Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical in vivo molecular imaging applications: Adjusting the bullet to its target.”’, *Expert Opinion on Biological Therapy*.
- Zhang, Y., Wang, Q., Fang, Y., Xu, J., & Li, Y. (2014) ‘Sonication-assisted transformation of *Bacillus subtilis* with plasmid DNA’, *Journal of microbiological methods*, 107, pp. 125-128.