

**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN NANOBODI KORTISOL
PADA BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN VARIASI MEDIA
PERTUMBUHAN**

SKRIPSI

**ELITA AMELIA APRIANTI
A 191 060**



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

**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN NANOBODI KORTISOL
PADA BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN VARIASI MEDIA
PERTUMBUHAN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**ELITA AMELIA APRIANTI
A 191 060**



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

**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN NANOBODI KORTISOL
PADA BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN VARIASI MEDIA
PERTUMBUHAN**

**ELITA AMELIA APRIANTI
A 191 060**

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 saya persembahkan untuk kedua orang tua saya Bapak (Garjito) dan Ibu (Kusdiyati) Segala perjuangan saya hingga titik ini saya persembahkan pada dua orang paling berharga dalam hidup saya. Terima kasih telah menjadi orang tua yang selalu ada. Terima kasih telah memberikan waktu, tenaga dan materi hingga saya bisa menyelesaikan skripsi. Untuk semua teman-teman yang telah berjuang dan orang terkasih terimakasih selalu mendengarkan keluh kesah selama penyusunan skripsi ini.

ABSTRAK

Nanobodi, sebagai fragmen antibodi, memiliki ukuran nanometer yang memungkinkannya menembus jaringan dan sel dengan mudah. Dalam penelitian ini, ekspresi protein nanobodi kortisol dieksplorasi pada bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan menggunakan media pertumbuhan. Penelitian ini bertujuan untuk memilih media pertumbuhan yang optimal untuk ekspresi nanobodi kortisol pada bakteri *E.coli* BL21 (DE3). Plasmid pET28a dengan nanobodi natif dan mutan dimasukkan ke dalam bakteri menggunakan kejutan panas. Dua jenis media, *Luria-Bertani* (LB) dan *Nutrient Broth* (NB) digunakan dengan waktu inkubasi 18 jam. Elektroforesis gel agarosa untuk memvalidasi DNA Plasmid sedangkan SDS-PAGE digunakan untuk menganalisis protein berdasarkan berat molekul. Hasil menunjukkan bahwa variasi media pertumbuhan LB dan NB tidak memiliki perbedaan terhadap berat sel bakteri transforman setelah produksi, baik pada natif (0,402 mg) maupun mutan (0,424 mg). Hasil juga menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan produksi protein pada nanobodi mutan dan nanobodi natif pada masing-masing media pertumbuhan, LB dan NB. Hasil SDS PAGE menunjukkan nanobodi natif menghasilkan pita protein lebih tebal daripada nanobodi mutan, yaitu *Area Under the Curve* (AUC) nanobodi natif (9270.4272 piksel) lebih tinggi dibandingkan AUC nanobodi mutan (74352.280 piksel) pada variasi media pertumbuhan. Disimpulkan bahwa variasi media yang digunakan tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap berat sel bakteri yang dihasilkan pada kondisi eksperimen yang diuji.

Kata Kunci: Nanobodi, Media Pertumbuhan, kortisol, *Luria Bertani* (LB) dan *Nutrient Broth* (NB) *E.coli* BL21(DE3).

ABSTRACT

Nanobodies, as antibody fragments, have a nanometer size that allows them to penetrate tissues and cells easily. In this study, the expression of the cortisol nanobody protein was explored in Escherichia coli BL21(DE3) using growth media. This study aims to select the optimal growth medium for the expression of cortisol nanobodies in E.coli BL21 (DE3) bacteria. Plasmid pET28a with native and mutant nanobodies was introduced into the bacteria using heat shock. Two types of media, Luria-Bertani (LB) and Nutrient Broth (NB) were used with an incubation time of 18 hours. Agarose gel electrophoresis to validate Plasmid DNA while SDS-PAGE was used to analyze proteins based on molecular weight. The results showed that the variation of LB and NB growth media had no difference in the cell weight of transformant bacteria after production, both in native (0.402 mg) and mutant (0.424 mg). The results also showed that there was no difference in protein production in the mutant and native nanobodies on each growth medium, LB and NB. SDS PAGE results showed that native nanobodies produced thicker protein bands than mutant nanobodies, namely the Area Under the Curve (AUC) of native nanobodies (9270,4272 pixels) was higher than AUC of mutant nanobodies (74,352,280 pixels) in various growth media. It was concluded that the variety of media used did not have a significant difference in the weight of the bacterial cells produced under the experimental conditions tested.

Keywords: Nanobodies, Growth Media, cortisol, Luria Bertani (LB) and Nutrient Broth (NB) E.coli BL21(DE3).

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunianya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “**Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi Kortisol Pada Bakteri *Eschericia coli* BI21(DE3) Dengan Variasi Media Pertumbuhan**”. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Farmasi di Sekolah Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Dalam menyelesaikan skripsi ini penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Nur Asni Setiani, M.Si dan Irma Mardiah, M.Si yang telah menyediakan waktu dan tenaga untuk memberikan pengarahan, dukungan, dan bimbingannya selama penelitian berlangsung hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
2. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si. selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi.
3. Apt. Seno Aulia Ardiansyah, M.Si selaku Dosen Wali yang telah membimbing dan memberi nasehat selama pelaksanaan kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
4. Kedua orang tua yang telah memberikan perhatian, semangat dan dukungan baik moral maupun material hingga skripsi ini dapat diselesaikan.
5. Kepada saudara penulis yaitu mas Adi Kusnanto, dan mba Diah Kusri yang telah memberikan dukungan, semangat serta perhatian kepada penulis, dan maafkan jika pada saat penulisan skripsi penulis selalu emosional.
6. Rekan-rekan mahasiswa angkatan 2019 yang telah berjuang bersama hingga akhir program Sarjana Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
7. Terima kasih kepada *K-pop Group* “NCT DREAM” (Mark Lee, Renjun Huang, Jeno Lee, Haechan Lee, Jaemin Na, Chenle Zhong, Jisung Park) yang telah menemani penulis melalui lagu-lagunya selama proses penulisan skripsi.
8. Sahabat-sahabat penulis Astri Dinda Melati, Natasya Della, Tita Dwi Lestari, Thesa Cintania Putri, dan Nabilatul Nurjannah. Terima kasih sudah menjadi teman terbaik selama perkuliahan ini dan mengajarkan banyak hal. Terima kasih juga untuk waktu kalian yang tidak pernah bosan dan menyerah untuk memberikan dukungan dan semangat kepada penulis, yang selalu memberikan nasehat kepada penulis. Ketika penulis merasa jenuh dan putus asa kalian selalu menyemangati penulis. Pengalaman yang luar biasa

bersama kalian akan jadi moment yang tidak terlupakan dan sangat dirindukan. Semoga persahabatan kita akan terus berlanjut sampai di hari tua dan sukses untuk kita semua.

9. *“For all of you who are striving for your dreams,I just want to tell you that you believe in yourself and don’t let anyone bring you down,you know negativity does not exist its all about positivity,alright? So keep that on mind. But anyways, have a good friends around you have good peers surround yourself with good people’because you’re a good person too.”* – Mark Lee. Dedikasi dan ucapan terimakasih kepada diri sendiri telah mampu menyelesaikan skripsi ini meskipun banyak rintangan, terimakasih telah bertahan.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga penelitian ini akan memberikan manfaat khususnya bagi penulis sendiri dan umumnya bagi pihak lain yang berkepentingan untuk mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya dibidang farmasi.

Bandung, Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I	Error! Bookmark not defined.
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	Error! Bookmark not defined.
TINJAUAN PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.
2.1 Kortisol	Error! Bookmark not defined.
2.2 Medium.....	Error! Bookmark not defined.
2.3 Nanobodi	Error! Bookmark not defined.
2.4 Protein Rekombinan	Error! Bookmark not defined.
2.5 Plasmid pET-28a	Error! Bookmark not defined.
2.6 <i>Eschericia coli</i> B121(DE3).....	Error! Bookmark not defined.
2.7 Media Kultivassi <i>Eschericia coli</i>	Error! Bookmark not defined.
2.8 SDS-PAGE	Error! Bookmark not defined.
BAB III	Error! Bookmark not defined.
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.
BAB IV	Error! Bookmark not defined.
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	Error! Bookmark not defined.
4.1 Transformasi Plasmid dan Seleksi Transforman	Error! Bookmark not defined.
4.2 Elektroforesis Gel Agarosa 1%	Error! Bookmark not defined.
4.3 Ekspresi Protein dan Variasi Media Pertumbuhan	Error! Bookmark not defined.
4.4 SDS PAGE	Error! Bookmark not defined.
BAB V.....	Error! Bookmark not defined.
SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	Error! Bookmark not defined.
not defined.	
5.1 Simpulan.....	Error! Bookmark not defined.
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Angka lempeng total klon transforman..	Error! Bookmark not defined.
Tabel 4.2 Berat Sel Bakteri Transforman Setelah Produksi .	Error! Bookmark not defined.
Tabel 4.3 Pengukuran Konsentrasi Protein Nanobodi Kortisol pada Media Pertumbuhan LB (Luria Bertani) dan NB (Nutrient Broth).....	25
Tabel 4.4 Tebal Pita Protein Natif dan Mutan	Error! Bookmark not defined.

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 2.1 Struktur Molekul Kortisol**Error! Bookmark not defined.**
- Gambar 2.2 Perbandingan Antibodi dan Nanobodi **Error! Bookmark not defined.**
- Gambar 2.3 Peta Vektor Plasmid pET-28a (Genscript)..... **Error! Bookmark not defined.**
- Gambar 2.4 Prinsip Penggunaan SDS PAGE**Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1 1 Alur Penelitian.....	38
Lampiran 1.2 Pembuatan Larutan.....	Error!
Bookmark not defined.	
Lampiran 1.3 Hasil Seleksi Bakteri Transforman.....	35
Lampiran 1.4 Prosedur Pembuatan Larutan SDS PAGE.	Error!
Bookmark not defined.	
Lampiran 1.5 Berat Sel Bakteri Setelah Ekspresi.....	Error!
Bookmark not defined.	
Lampiran 1.6 Perhitungan Protein Ukuuran Pita Protein Mutan.....	Error!
Bookmark not defined.	
Lampiran1.7 Perhitungan Protein Ukuran Pita Protein Natif.....	Error!
Bookmark not defined.	
Lampiran 1.8 Tebal Pita Protein.....	42

PUSTAKA

- Al-Muhanna, S.G., and Al-Muhanna, A.S. (2018). Construction and transformation of recombinant PET-28A expression vector in BL21 (DE3) cells with basic bioinformatics analysis. *Biochemical and Cellular Archives*, 18(1).
- 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*.
- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneuric, R., and Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in Escherichia coli. *Scientific Reports*, 6.
- Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R., and Casal, M. (2013). Batch production of a silk-elastin-like protein in E. coli BL21(DE3): Key parameters for optimisation. *Microbial Cell Factories*, 12(1).
- D'Aurizio, F., and Cantù, M. (2018). Clinical endocrinology and hormones quantitation: The increasing role of mass spectrometry. *Minerva Endocrinologica*.
- de Meyer, T., Muyldermans, S., and Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 1–8.
- Ding, L., Wang, Z., Zhong, P., Jiang, H., Zhao, Z., Zhang, Y., Ren, Z., and Ding, Y. (2019). Structural insights into the mechanism of single domain VHH antibody binding to cortisol. *FEBS Letters, Wiley Blackwell*, 593(11), 1248–1256.
- Gaffar, S., Aji, S.M.N., Hartati, Y.W., Ishmayana, S., and Subroto, T. (2017). Ekspresi Fragmen Antibodi Rekombinan, Anti BNP-Scfv Dalam Periplasma Inang E. coli Untuk Deteksi Gagal Jantung. *Molekul*, 12(1), 30–36.
- Gatti, R., Antonelli, G., Prearo, M., Spinella, P., Cappellin, E., and de Palo, E.F. (2009). Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clinical Biochemistry*.
- Gomes, L., Monteiro, G., and Mergulhão, F. (2020). The impact of IPTG induction on plasmid stability and heterologous protein expression by E. coli biofilms. *International Journal of Molecular Sciences, MDPI AG*, 21(2).
- Harmsen, M.M., and de Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Harti, A.S. (2015). *Mikrobiologi Kesehatan Peran Mikrobiologi dalam Kesehatan*. CV Andi Offset.

- Jayadilaga, Y. (2020). Perbandingan Respon Hormon Kortisol terhadap Aktivitas Futsal Malam dan Pagi Hari pada Komunitas Futsal Ikami Malang. Bachelor's thesis, *Universitas Negeri Yogyakarta*.
- Joseph, B.C., Pichaimuthu, S., and Srimeenakshi, S. (2015). An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*, 06(05).
- Katsu, Y., and Iguchi, T. (2016). Subchapter 95D - Cortisol. *Handbook of Hormones*. Hal: 533534.
- Lisdiana. (2012). Regulasi Kortisol Pada Kondisi Stres Dan Addiction. Biosaintifika: *Journal of Biology & Biology Education*, 4(1), 18–26.
- Mega, O., Sumantri, C., Arief, I.I., and Budiman, C. (2019). Expression of Lon-like Protease Gene from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 in *E. coli* BL21(DE3). *Jurnal Agripet, Agricultural Faculty, Syiah Kuala University*, 19(2), 149–158.
- MN Editors. (2022a). Lysogeny broth (LB) Preparation. Retrieved from on 10th February 2023.
- Möstl, E., and Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*.
- Mura, G., Cossu, G., Migliaccio, G.M., Atzori, C., Nardi, A.E., Machado, S., & Carta, M.G. (2014). Quality of life, cortisol blood levels and exercise in older adults: results of a randomized controlled trial. *Clinical practice and epidemiology in mental health: CP & EMH*, 10, 67.
- Perogamvros, I., Ray, D.W., and Trainer, P.J. (2012). Regulation of cortisol bioavailability - Effects on hormone measurement and action. *Nature Reviews Endocrinology*.
- Pratiwi, R.D. (2019). Optimasi ekspresi human Epidermal Growth Factor (h-EGF) rekombinan dalam *E. coli* BL21 (DE3) dengan variasi media dan konsentrasi penginduksi. *Chimica et Natura Acta*, 7(2), 91-97.
- Probosari, E. (2019). Pengaruh protein diet terhadap indeks glikemik. *JNH (Journal of Nutrition and Health)*, 7(1), 33-39.
- Roy, S., dan Kumar, V. (2014). A Practical Approach On SDS PAGE For Separation Of Protein. *Internasional Jurnal Of Science And Research*. 3(8): 2319-7064.
- Setiani, N.A., Baroroh, U., Handayani, A.P., Chairunnisa, N., & Mardiah, I. (2022). Konstruksi Plasmid Rekombinan pET-28a-Nanobodi Secara In Silico. In *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi Penelitian Dosen* (Vol. 2, No. 1).
- Silverthorn, D.U. (2007). Human physiology: an integrated approach. San Francisco: *Pearson Cummings*.
- Sumiati, S. (2017). Optimasi Produksi Protein Rekombinan HBcAg (Hepatitis B core Antigen) oleh *E. coli* sebagai Bahan Vaksin Hepatitis B Terapeutik. Bachelor's thesis, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.

- Susmiarsih, T.P. (2018). Kajian DNA rekombinan pada vaksin DNA dan vaksin subunit protein. *Majalah Kesehatan Pharma Medika*, 10(2), 108-128.
- Thenawidjaja, M., Ismaya, W.T., and Retnoningrum, D.S. (2017). *Protein: Serial Biokimia Mudah dan Menggugah*. E-book, Jakarta: Grasindo.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L. (2010). *Microbiology: an introduction*. San Francisco: *Benjamin Cummings*.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., and Chrousos, G.P. (2020). Stress: Endocrine Physiology and Pathophysiology. *Endotext, MDText.com, Inc*.
- Umam, F. (2013). Uji Aktivitas Inhibisi Fraksi-Fraksi Hasil Kolom Kromatografi dari Ekstrak Biji Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap Enzim RNA Helikase Virus Hepatitis C. *Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah*.
- Roy, S., dan Kumar, V. (2014). A Practical Approach On SDS PAGE For Separation Of Protein. *Internasional Jurnal Of Science And Research*. 3(8): 2319-7064.
- Yuge, S., Akiyama, M., and Komatsu, T. (2014). An E. colitrap in human serum albumin microtubes. *Chemical Communications*, 50(68).