

**OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI
BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN
VARIASI WAKTU SONIKASI**

SKRIPSI

DARA SYLVIA ANGELLYNE

A 191 011



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

**OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI
BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN
VARIASI WAKTU SONIKASI**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

DARA SYLVIA ANGELLYNE

A 191 011



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN HAZANAH

BANDUNG

2023

**OPTIMASI ISOLASI PROTEIN NANOBODI DARI
BAKTERI *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN
VARIASI WAKTU SONIKASI**

DARA SYLVIA ANGELLYNE

A 191 011

Juli 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 Ibu, Ayah, Adik dan keluarga besar yang telah memberikan dukungan dan semangat hingga skripsi ini dapat diselesaikan dalam waktu tepat.

ABSTRAK

Nanobodi adalah antibodi yang ditemukan dengan ukuran lebih kecil serta mampu berikatan dengan kortisol, sehingga dapat diproduksi sebagai komponen kit diagnostik untuk pemantauan kadar kortisol dalam tubuh. Dalam produksi protein rekombinan pada bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3), dihasilkan protein intraseluler sehingga dibutuhkan proses pemecahan sel untuk mengisolasi protein nanobodi. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh variasi waktu sonikasi dalam pengoptimalan terhadap proses isolasi protein intraseluler dan mendapatkan waktu sonikasi yang optimum. Ekspresi protein nanobodi mutan dan natif diberi penginduksi IPTG 0,6 mM pada suhu 25°C selama 18 jam kemudian diisolasi menggunakan sonikasi pada frekuensi 37 khz dengan variasi waktu 20; 30 dan 40 menit. Validasi dilakukan dengan menggunakan SDS PAGE. Hasil sonikasi pada waktu 30 menit menunjukkan kadar protein bakteri mutan yaitu 82,4414 mg/dl dan natif 76,5855 mg/dl, serta tebal pita protein tertinggi pada nanobodi mutan dengan nilai AUC 28130.836 piksel dan nanobodi natif 27749.472 piksel. waktu isolasi protein yang optimum dengan metode sonikasi baik bakteri mutan maupun natif yaitu berada pada waktu 30 menit.

Kata kunci : Kortisol, nanobodi, Protein rekombinan, Isolasi sonikasi, SDS PAGE

ABSTRACT

Nanobodies are antibodies found in smaller sizes and able to bind to cortisol, so they can be produced as components of diagnostic kits for monitoring cortisol levels in the body. In the production of recombinant proteins in Escherichia coli BL21 (DE3) bacteria, intracellular proteins are produced so that a cell breakdown process is needed to isolate nanobody proteins. This study aims to determine the influence of sonication time variation in optimization of the intracellular protein isolation process and obtain the optimum sonication time. Expression of mutant and native nanobody proteins was given IPTG inducer 0.6 mM at 25°C for 18 h then isolated using sonication at a frequency of 37 kHz with a time variation of 20; 30 and 40 minutes. Validation is performed using SDS PAGE. The sonication results at 30 min showed mutant bacterial protein levels of 76,5855 mg/dl and native 82,4414 mg/dl, as well as the highest protein band thickness in mutant nanobodies with AUC values of 28130,836 pixels and native nanobodies of 27749,472 pixels. The optimum protein isolation time by sonication method of both mutant and native bacteria is within 30 min.

Keywords : *Cortisol, nanobodies, Recombinant proteins, Sonication isolation, SDS PAGE*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Alhamdulillah rabbil ‘alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala nikmat, rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Optimasi Isolasi Protein Nanobodi Dari Bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) Dengan Variasi Waktu Sonikasi”**.

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 terima kasih 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. Hesti Riasari, M.Si., selaku Dosen Wali yang selalu memberikan bimbingan, dukungan serta motivasi,
5. Seluruh staf dosen, staf administrasi, 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, Juli 2023

Penulis

DAFTAR ISI

PENGESAHAN	i
KUTIPAN	ii
PERSEBAHAN.....	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I	1
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.....	4
TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kortisol	4
2.2 Nanobodi	5
2.3 Protein rekombinan	6
2.4 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	7
2.5 Lisis	8
2.6 SDS-PAGE.....	9
BAB III	12
TATA KERJA.....	12
3.1 Alat	12
3.2 Bahan.....	12
3.3 Metode penelitian	12

3.3.2 Proses lisis	13
3.3.3 SDS-PAGE.....	13
BAB IV	15
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Ekspresi Protein dan Variasi IPTG.....	15
4.2 SDS-PAGE Ekspresi Protein.....	16
4.3 Isolasi Protein	18
4.4 SDS-PAGE Isolasi Protein	20
BAB V.....	25
SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	25
5.1 kesimpulan.....	25
5.2 Alur penelitian selanjutnya.....	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN 1	29
LAMPIRAN 2.....	30
LAMPIRAN 3	31
LAMPIRAN 4.....	32
LAMPIRAN 5.....	33
LAMPIRAN 6.....	34

DAFTAR TABEL

4.1 Bobot pelet bakteri transforman hasil ekspresi.....	15
4.2 Bobot pelet sentrifugasi isolasi protein.....	19
4.3 Hasil Pengukuran kadar protein.....	19
4.5 Berat bobot molekul mutan dan natif	22
4.6 Tebal pita Protein Mutan dan Natif.....	22

DAFTAR GAMBAR

4.1 Visualisasi SDS PAGE Ekspresi protein.....	17
4.2 Hasil isolasi protein	18
4.3 Visualisasi SDS PAGE Isolasi protein.....	21

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Alur penelitian.....	29
2. Gambar alur penelitian.....	30
3. Pembuatan larutan.....	31
4. Prosedur pembuatan larutan SDS PAGE.....	32
5. Bobot pelet bakteri transforman setelah produksi.....	33
6. Bobot pelet hasil sentrifugasi isolasi protein.....	34
7. Perhitungan kadar protein.....	35
8. Perhitungan ukuran pita mutan.....	36
9. Perhitungan ukuran pita natif.....	37

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.
- Aini. N & Aridiana, L. M. (2016). “Asuhan Keperawatan Pada Sistem Endokrin dengan Pendekatan NANDA NIC-NOC”. Jakarta Selatan: *Salemba Medika*.
- 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)
- Anam, K. (2009).”SDS-PAGE dengan Silver Staining dan Zimogram” . *Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor*.
- Baroroh, U. Nur Asni Setiani¹ , Irma Mardiah¹ , Dewi Astriany , and Muhammad Yusuf .(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) pp.515-52
- Barret, K.E., Barman, S.M., Boitano.S., Brooks, H.L. (2012).” Ganong’s Review of Medical Physiology (24th edition)”. New York : *The McGraw-Hill Companies*.
- 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.
- Chakravarty, R., Goel, S., Cai, W., (2014) “Nanobody Technology: A New Paradigm for Radiopharmaceutical Development for Oncology”. *Drug Discov Today*. 19(9): 1252-1257
- Cempaka, R. (2011). “Pengaruh Berbagai Konsentrasi Isopropyl-B-DThiogalactopyranoside (IPTG) Terhadap Ekspresi Protein Rekombinan Jembrana Superficial Unit (Jsu) Pgex-6p1.” Skripsi. Depok: *Universitas Indonesia*.

- 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*.
- 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.
- Eqiel Navadz Akthar Alami, Erma Sulistyaningsih, Irawan Fajar Kusuma Sheilla Rachmania, (2022), "Optimasi Purifikasi Protein Rekombinan CIDR α PfEMP1 Plasmodium falciparum dengan Kromatografi Afinitas". Fakultas Kedokteran, *Universitas Jember*.
- 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 Escherichia 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 *Escherichia coli* biofilms." *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, 21(2).
- Garcia-Vaquero M, Rajauria G, O'Doherty JV, Sweeney T. 2017. "Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification". *Food research international* 99:1011-20
- Harmsen, M. M., and de Haard, H. J. (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Huang H, Ling W, Qiu T, Luo Y. (2018). "Ultrasonographic features of testicular metastasis from renal clear cell carcinoma that mimics a seminoma: A case report". *Medicine (Baltimore)* 97:e12728
- Jin Li, Jun Cai, Lihong Fan, (2008), "Effect of Sonolysis on Kinetics and Physicochemical properties of Treated Chitosan". *Journal of Applied Polymer Science*, 109:2417-2425.
- 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).

- Kandhalu, P. (2013). "Effects of Cortisol on Physical and Psychological Aspects of the Body and Effective Ways by Which One Can Reduce Stress." *Berkeley Scientific Journal, California Digital Library (CDL)*, 18(1).
- Kusuma, Sherlynda FA. 2020. "Eksresi Single Chain Fragment Variable AntiNS1 Virus Dengue Serotipe 2 Dengan Variasi Konsentrasi IPTG Dan Suhu Dalam Media Luria Bertani". *Skripsi*. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia
- Lisdiana. (2012). "Regulasi Kortisol Pada Kondisi Stres Dan Addiction." *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 4(1), 18–26.
- Maksum, I.P., Sriwidodo, & Yosua . (2019)." Strategi Peningkatan Ekspresi Protein Rekombinan Secara Intraselular pada Inang *Escherichia coli*". Sumedang: *Alqaprint*
- 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* 35 BL21(DE3)." *Jurnal Agripet, Agricultural Faculty, Syiah Kuala University*, 19(2), 149–158.
- Muyldermans, S. (2013). "Nanobodies: Natural single-domain antibodies." *Annual Review of Biochemistry*.
- Naeni, N.N. (2022) 'Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi kortisol Pada Bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan variasi konsentrasi Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG)', *skripsi*
- Oktaviani,E., (2019). "Analisis Protein Isolat Bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) Menggunakan SDS PAGE". *Jurnal Pendidikan Biologi Dan Sains*.
- Oliveira C & Domingues L. (2018). "Guidelines to Reach High-quality Purified Recombinant Proteins". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(1): 81-92.
- Ortsäter, H., Sjöholm, Å., & Rafacho, A. (2012). "Regulation of glucocorticoid receptor signaling and the diabetogenic effects of glucocorticoid excess". *Intech Open Science*, 1-28.
- Pratiwi, R. D. (2017). "Nanobodi, Fragmen Antibodi Terkecil Untuk Terapi Berbagai Penyakit." *BioTrends, Bogor*, 8(1), 17–23.
- 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.
- Promega. (2012). *Bacterial Strain for Protein Expression*. Promega Press, USA.
- Rosano G, Ceccarelli E (2014). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*": *advances and challenges*. *Front Microbiol* 5:172..

- 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.
- Russell, G. M. (2014). "Monitoring cortisol and cortisone in saliva: a noninvasive method for measuring adrenal activity". *Journal of Neuroscience Nursing*. 46(1), 19-25.
- Sahlan, M., Irdiani, R., Flamandita, D., Aditama, R., Alfarraj, S., Ansari, M.J., Khayrani, A.C., Pratami, D.K., Lischer, K., (2021). "Molecular interaction analysis of Sulawesipropolis compounds with SARS-CoV-2 main protease as preliminary study for COVID-19 drug discovery". *J. King Saud Univ. Sci.* 33 (1), 10123
- Saputra, Fahrur Rahman. (2014). "Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) Untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin Pada Kapsul Keras". *Skrripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Sherwood, L. (2014). "The Peripheral Endocrine glands." *Cengage Learning, United States*.
- Skiba, M. A., Maloney, F. P., Dan, Q., Fraley, A. E., Aldrich, C. C., Smith, J. L., & Brown, W. C. (2018). "PKS–NRPS enzymology and structural biology: considerations in protein production. *Methods in Enzymology*".
- Sugiharto. (2014). *Fisiologi Olahraga : "Teori dan aplikasi pembinaan olahraga"*. Malang: *Universitas Negeri Malang*
- 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.
- Uli julia nasution. (2018). "Pemurnian Enzim Sefalosporin-C Asilase dan Optimasi Proses Kromatografi afinitas". Tangerang Selatan : *Universitas Surya*
- Yuge, S., Akiyama, M., and Komatsu, T. (2014). "An Escherichia coli trap in human serum albumin microtubes." *Chemical Communications*, 50(68).
- Yusuf., et al. (2021). "Analisis Bioinformatika Dan Ekspresi Protein Rekombinan Hemagglutinin Damian Globular Dari Virus H5N1 Indonesia Pada Escherichia coli BL21(DE3) Sebagai Komponen Vaksin Subunit Influenza". *Al Kimiya: Jurnal Imu Kimia Dan Terapan*. 8(2).
- 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, 125-128.