

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

**SKRIPSI**

**WIDIA OKTAPIANI  
A191090**



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

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

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**WIDIA OKTAPIANI  
A191090**



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

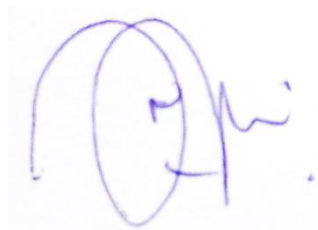
**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN NANOBODI KORTISOL PADA  
BAKTERI *Escherichia coli* BL21 (DE3) DENGAN VARIASI WAKTU  
INKUBASI**

**WIDIA OKTAPIANI  
A191090**

**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 dan Mamah. 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 dapat menyelesaikan skripsi.*

## ABSTRAK

Produksi protein rekombinan nanobodi kortisol sebanding dengan konsentrasi sel bakteri, yang dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Waktu inkubasi yang optimum menghasilkan konsentrasi sel yang tinggi, sebanding dengan jumlah protein rekombinan yang dihasilkan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu inkubasi optimum dan mengetahui pengaruh dari variasi waktu inkubasi terhadap produksi protein rekombinan nanobodi kortisol pada *Escherichia coli* BL21 (DE3). Plasmid pET-28a yang mengandung nanobodi natif dan mutan ditransformasikan kedalam inang bakteri dengan metode *heat shock*. Waktu inkubasi ekspresi protein digunakan dengan variasi 16 jam, 18 jam dan 24 jam pada suhu 25 °C serta konsentrasi IPTG (*Isoprophyl-β-D-thiogalactoside*) 0,6 mM. Validasi keberhasilan ekspresi protein dianalisis menggunakan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi sel pada waktu inkubasi 16 jam bakteri masih mengalami peningkatan, sedangkan pada waktu inkubasi 24 jam mengalami penurunan. Waktu inkubasi 18 jam didapatkan konsentrasi sel tertinggi yaitu pada natif 0,33 gram dan mutan 0,29 gram. Pada waktu inkubasi selama 16 jam dan 24 jam didapatkan ketebalan pita protein yang rendah, sedangkan pada waktu inkubasi 18 jam didapatkan ketebalan pita protein tinggi, pada natif 7.522,146 piksel dan mutan 8.796,167 piksel. Berdasarkan hasil tersebut waktu inkubasi 18 jam ditetapkan sebagai waktu inkubasi ekspresi protein yang optimum.

**Kata kunci:** nanobodi, waktu inkubasi, *E.coli* BL21(DE3).

## **ABSTRACT**

*The production of cortisol nanobody recombinant protein is proportional to the concentration of bacterial cells, which is affected by the incubation time. The optimum incubation time results in a high concentration of cells, proportional to the amount of recombinant protein produced. This study aims to determine the optimal incubation time and determine the effect of incubation time variations on the production of cortisol nanobody recombinant protein in Escherichia coli BL21 (DE3). The pET-28a plasmids containing native and mutant nanobodies were transformed into the bacterial host by heat shock method. Incubation time of protein expression was used with variations of 16 hours, 18 hours and 24 hours at a temperature of 25 °C and an IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) concentration of 0.6 mM. Validation of successful protein expression was analyzed using the SDS-PAGE method. The results showed that cell concentration at the 16-hour incubation time of bacteria still increased, while at the 24-hour incubation time decreased. The incubation time of 18 hours obtained the highest cell concentration, namely at native 0.33 grams and mutants 0.29 grams. At the incubation time of 16 hours and 24 hours, a low protein band thickness was obtained, while at an incubation time of 18 hours, a high protein band thickness was obtained, at native 7,522,146 pixels and mutant 8,796,167 pixels. Based on these results, an incubation time of 18 hours was determined as the optimal incubation time for protein expression.*

**Keywords :** nanobody, incubation time, 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 *Escherichia coli* BL21(DE3) Dengan Variasi Waktu Inkubasi”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh 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, pengarahan, nasihat, dukungan serta pengorbanan yang diberikan selama penelitian berlangsung hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya 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. Sri Gustini Husein, S.Si., M.Farm., selaku Dosen Wali yang telah membimbing dan memberi nasehat selama pelaksanaan kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
4. Seluruh dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia yang telah memberikan ilmu, pengalaman dan bantuan yang telah diberikan selama penulis berkuliah,
5. Rekan-rekan mahasiswa angkatan 2019 yang telah berjuang bersama hingga akhir program Sarjana Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia
6. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis ucapkan satu persatu yang telah memberikan perhatian dan dukungannya dalam menyelesaikan skripsi ini.

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 bagi penulis sendiri dan bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, Agustus 2023  
Penulis



## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN .....	i
KUTIPAN .....	ii
PERSEMBAHAN .....	iii
ABSTRAK .....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
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 .....	5
2.3 Plasmid pET-28a.....	6
2.4 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	7
2.5 Pertumbuhan Bakteri.....	8
2.6 Ekspresi Protein .....	10
2.7 SDS- PAGE.....	11
BAB III TATA KERJA .....	13
3.1 Alat.....	13
3.2 Bahan .....	13
3.3 Metode Penelitian.....	13
3.3.1 Pembuatan Kultur Bakteri <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) .....	13
3.3.2 Pembuatan Sel Kompeten <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	13
3.3.3 Transformasi Plasmid pET 28a dan Seleksi Transforman.....	14
3.3.4 Isolasi Plasmid.....	14
3.3.5 Elektroforesis Gel Agarosa .....	15
3.3.6 Ekspresi Protein Bakteri Transforman dengan Variasi Waktu Inkubasi.....	16
3.3.7 Analisis SDS-PAGE .....	16
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	18
4.1 Transformasi Plasmid pET-28a dan Seleksi Transforman.....	18
4.2 Isolasi Plasmid .....	19
4.3 Elektroforesis Gel Agarosa .....	20

4.4 Ekspresi Protein Bakteri Transforman dengan Variasi Waktu Inkubasi .....	21
4.5 Analisis SDS-PAGE .....	23
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....	27
5.1 Simpulan .....	27
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya.....	27
DAFTAR PUSTAKA .....	28
LAMPIRAN.....	32

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4. 1 Jumlah Koloni Klon Transforman .....	19
4. 3 Berat Molekul Natif dan Mutan (kDa).....	25

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Struktur molekul kortisol .....	4
2. 2 Perbandingan antibodi dan nanobodi .....	5
2. 3 Plasmid pET-28a.....	6
2. 4 Mikroskopis <i>Escherichia coli</i> .....	7
2. 5 Fase pertumbuhan bakteri .....	9
2. 6 Analisis SDS-PAGE.....	11
4. 1 Seleksi klon bakteri transforman.....	18
4. 2 Hasil visualisasi elektroforesis agarosa.....	21
4. 3 Konsentrasi sel bakteri dengan variasi waktu .....	22
4. 4 Visualisasi SDS-PAGE sampel natif, mutan dan kontrol (-) .....	25
4. 5 Ketebalan pita protein natif dan mutan .....	26

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alur Penelitian.....	31
2. Pembuatan Media Pertumbuhan dan Larutan .....	32
3. Prosedur Pembuatan Larutan SDS-PAGE .....	33
4. Konsentrasi Sel Bakteri Setelah Ekspresi .....	34
5. Perhitungan Ukuran Pita Protein Natif.....	35
6. Perhitungan Ukuran Pita Protein Mutan .....	37

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, L., Diarti, M. W., & Tatontos, E. Y. (2020) 'Pengaruh Lama Waktu Inkubasi Terhadap Morfologi Bakteri Neisseria Gonorrhoeae', *Jurnal Kesehatan. Poltekkes Kemenkes RI Pangkalpinang*, 7(2), 36.
- 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., Nur Asni, S., Irma, M., Dewi, A., & Muhammad, Y. (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.
- 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).
- 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.
- Fajar, I., Ima Yudha., & Ni Made Ernawati. (2022) 'Pengaruh Derajat Keasaman (pH) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Toleran Kromium Heksavalen Dari Sedimen Mangrove Di Muara Tukad Mati Bali', *Current Trends in Aquatic Science* 5(1), 1-6.
- Gaffar, S., Aji, S. M. N., Hartati, Y. W., Ishmayana, S., and Subroto, T. (2017) 'Eksresi Fragmen Antibodi Rekombinan, Anti BNP-Scfv Dalam Periplasma Inang Escherichia coli Untuk Deteksi Gagal Jantung', *Molekul*, 12(1), 30– 36.
- 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)
- Hermana, N. S. P., Kusdiyantini, E., Suprihadi, A., & Nuraini, N. (2015) '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(2), 60–68.
- Indriyani, A., Anggraeni, N.I., Sriwidodo, & Maksum, I.P. (2019) 'Optimization extracellular secretion of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (hEGF) in Escherichia coli BL21 (DE3) pD881-OmpA-hEGF by using Response Surface Method (RSM)', *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 10(3), 1824– 1831.

- Koiriyah, Hanimatul. (2014) 'Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* sp', *JKK*,3 (4), 52-56.
- Lin, Hsiu., Chien, Chung., Jen Lin, Yi and Chen Lin, Hsiu. (2010) 'Revising With a Relative-Density Calibration Approach the Determination of Growth Rates of Microorganisms by use of Optical Density Data from Liquid Cultures', *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 76(5).
- Maksum, I., Padjadjaran, U., Sriwidodo, S., Padjadjaran, U., Indriyani, A., & Padjadjaran, U. (2019) 'Sistem Ekspresi Protein Rekombinan di *Escherichia coli* secara Ekstraselular', *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(4), 3319–3324.
- 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.
- Mujayana & Nurjanna. (2015) 'Teknik Isolasi DNA Plasmid Dai Bakteri Terkonstruksi Gen Antivirus pmAV', *Bul. Tek. Lit. Akuakultur*, 13(1), 67-71.
- Muyldermans, S. (2013) 'Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies', *Annual Review of Biochemistry*.
- Naeni, Novita Nur. (2022) 'Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi Kortisol Pada Bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan Variasi Konsentrasi Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside (IPTG)', *Skripsi*, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Bandung.
- Nurbayanti, S. H. (2020) 'Strategi Penggunaan IPTG Untuk Ekspresi Protein', *Research Gate.*, Universitas Padjadjaran.
- Ode, W., Muliani, A., Adam, M. A., & Tahir, H. (2019) 'Hubungan Antara Stres, Depresi, Kortisol dan Periodontitis Kronis: Tinjauan Sistematis', *Makassar Dental Journal*, 8(2), 73–78.
- Oktaviani, E., (2019) 'Analisis Protein Isolat Bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3) Menggunakan SDS PAGE', *Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*. 4(1).
- Prasetya, A., Yulianto, Khoirun Nisya, and R Amanda. (2019) 'Aktivitas Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia Galanga* [L] Willd) Dalam Menghambat Bakteri *Escherichia coli* Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs)', *Seminar Nasional Pendidikan Biologi Dan Saintek (SNPBS) Ke-IV*, 301–9.
- Pratiwi, R. D. (2017) 'Nanobodi, Fragmen Antibodi Terkecil Untuk Terapi Berbagai Penyakit', *BioTrends*, 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.

- Rajer, Fredrika and Linus. (2022) 'The Role of Antibiotic Resistance Gene in the Fitness Cost of Multiresistance Plasmids', *Journal Research Antimicrobial Chemotherap.*, 10(11).
- Risna, Y. K., Sri-Harimurti, S.-H., Wihandoyo, W., & Widodo, W. (2022) 'Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh', *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 24(1), 1.
- Roy, S., and Kumar, V. (2014) 'A Practical Approach On SDS PAGE For Separation Of Protein', *Internasional Jurnal Of Science And Research*. 3(8), 2319-7064.
- Saputra, Fahrur Rahman. (2014) 'Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) Untuk Mengidentifikasi Sumber Gelatin Pada Kapsul Keras', *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Silaban, S., Gaffar, S., Simorangkir, M., Maksum, I. P., & Subroto, T. (2019) 'Effect of IPTG Concentration on Recombinant Human Prethrombin-2 Expression in Escherichia coli BL21 (DE3)', *Express. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 217(1).
- Sinaga *et al.* (2017) 'Analisis Pola Pita Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* D.C) Berdasarkan Primer OPD 03, OPD 20, OPC 07, OPM 20, OPN 09', *Jurnal Agroekoteknologi FP USU*, 5(1).
- Siregar *et al.* (2020) 'Penentuan Lokalisasi Subseluler, Optimasi Induksi Ekspresi, Purifikasi Protein, Serta Karakterisasi Aktivitas Emgfp Dari E. coli BL21(DE3) Transforman', *Jurnal Genetika & Rekayasa Genetika Mikroba Research Gate*.
- Sulistiyarsi *et al.* (2016) 'Pengaruh Konsentrasi Dan Lama Inkubasi Terhadap Kadar Protein Crude Enzim Selulase Dari Kapang *Aspergillus Niger*', *Proceeding Biology Education Conference*. Vol 12(1)
- Sumiati, S. (2017) 'Optimasi Produksi Protein Rekombinan HBcAg (Hepatitis B core Antigen) Oleh Escherichia coli Sebagai Bahan Vaksin Hepatitis B Terapeutik', *Skripsi*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Tamami, Nisrina Arden. (2022) 'Optimasi Ekspresi Protein Nanobodi Kortisol Oleh Bakteri Escherichia coli BL21 (DE3) dengan Variasi Suhu', *Skripsi*. Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Bandung.
- Yuge, S.,akiyama, M.,& komatsu. T. (2014) 'An Escherichia coli Trap in Human Serum Albumin Microtubes', *Chemical Communications*, 50(68).
- Zhao, M., Tao, X. Y., Wang, F. Q., Ren, Y. H., & Wei, D. Z. (2018) 'Establishment of a Low-Dosage-IPTG Inducible Expression System Construction Method in Escherichia coli', *Journal of Basic Microbiology*, 58(9), 806–810.