

**DESAIN DNA REKOMBINAN NANOBODI DENGAN
MENGUNAKAN PLASMID pET-28a**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

ADE PIA HANDAYANI

A171001



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG**

2021

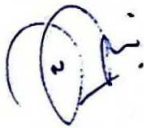
**DESAIN DNA REKOMBINAN NANOBODI DENGAN
MENGUNAKAN PLASMID pET-28a**

**ADE PIA HANDAYANI
A171001**

Oktober 2021

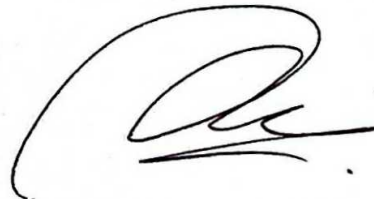
Disetujui oleh:

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 Allah SWT sebagai rasa syukur atas karunia-Nya serta kepada kedua orang tua, kakak, saudara, sahabat dan teman yang telah memberikan dukungan, kasih sayang, doa dan semangat tiada batas.

ABSTRAK

Nanobodi merupakan molekul immunoglobulin yang memiliki ukuran kecil, dapat berpenetrasi kedalam jaringan, mudah diproduksi dan larut dalam air. Nanobodi dapat digunakan sebagai komponen dalam kit diagnostik, salah satunya yaitu untuk mendeteksi kortisol. Penelitian ini bertujuan untuk membuat desain plasmid rekombinan yang membawa gen nanobodi. Urutan asam amino nanobodi diambil dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan kode 6ITP kemudian diubah menjadi DNA. Pengecekan kodon dilakukan dengan menggunakan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA), sedangkan peta restriksi dianalisis menggunakan NEBCutter. Primer dibuat untuk memperbanyak gen nanobodi dengan menambahkan sisi restriksi enzim yang sesuai dengan plasmid pET-28a dan dilakukan pengecekan *inframe*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen nanobodi terdiri dari 381 basa dan dapat diperbanyak dengan primer *forward* yang ditambahkan sisi restriksi enzim EcoR1 5'-CTTAAGATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' dan primer *reverse* yang ditambahkan sisi restriksi enzim Xho1 5'-GAGCTCATGAGCTGCTAACTGGAACCTG - 3'. Gen nanobodi dapat menyisip kedalam plasmid pET-28a tanpa mengubah pembacaan.

Kata kunci: Nanobodi, plasmid pET-28a, Primer *forward* dan *reverse*

ABSTRACT

Nanobodies are immunoglobulin molecules that have small sizes, can penetrate into tissues, are easily produced and are soluble in water. Nanobodies can be used as components in diagnostic kits, one of which is to detect cortisol. This study aims to design a recombinant plasmid that carries nanobody genes. The amino acid sequence of the nanobody was taken from the Protein Data Bank (PDB) with the code 6ITP then converted into DNA. Codon checking was done using the Graphical Codon Usage Analyzer (GCUA), while the restriction map was analyzed using NEBCutter. Primers were made to multiply the nanobody gene by adding the enzyme restriction site corresponding to the pET-28a plasmid and checking the inframe. The results showed that the nanobody gene consisted of 381 bases and could be propagated by the forward primer added with restriction site EcoRI 5'-CTTAAGATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' and reverse primer added restriction site XhoI 5'-GAGCTCATGAGCTGCTAACTGGAACCTG - 3'. The nanobody gene was able to insert into the pET-28a plasmid without changing the reading.

Keywords: *Nanobody, pET-28a plasmid, Forward and reverse primer*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala berkah rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “**Desain DNA Rekombinan Nanobodi Dengan Menggunakan Plasmid pET-28a**”. Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada jurusan 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 dan dukungan serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si, selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
2. Dr. apt. Dewi Astriany, M.Farm, selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik
3. apt. Revika Rachmaniar, M.Farm, selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi.
4. Dr. apt. Diah Lia Aulifa, M.Si, selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis.
5. Seluruh staf dan dosen, staf administrasi serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
6. Serta saudara dan sahabat-sahabat yang telah memberikan inspirasi serta kegembiraan selama penulis 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 segala 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, Oktober 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I	1
PENDAHULUAN	2
1.1 Latar Belakang	2
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II	4
TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Nanobodi	4
2.2 Kortisol	6
2.3 DNA Rekombinan	7
2.4 Plasmid	8
2.5 Desain Primer	9
BAB III	11
TATA KERJA	11
3.1 Alat	11
3.2 Bahan	11
3.3 Metode Penelitian	11
3.3.1 Penyiapan DNA Target	11

3.3.2	Penyiapan Vektor Ekspresi.....	12
3.3.3	Desain Primer	12
3.3.4	Konstruksi Plasmid.....	12
BAB IV	14
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	14
4.1	Penyiapan DNA target	14
4.2	Penyiapan Vektor Ekspresi	18
4.3	Desain Primer	19
4.4	Konstruksi Plasmid	23
BAB V	24
SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA	24
5.1	Simpulan.....	24
5.2	Alur Penelitian Selanjutnya.....	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN	27

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Perubahan Kodon Asam Amino.....	17
4.2 Hasil Parameter Desain Primer	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Proses Terbentuknya Nanobodi	5
2.2 Struktur Kortisol	6
2.3 Plasmid pET-28a.....	10
4.1 Analisis GCUA Relatif Kurang dari 100%.....	16
4.2 Analisis dari NEBCutter	18
4.3 Peta Plasmid pET-28a.....	19
4.4 Hasil Konstruksi Plasmid pET-28a.....	23
4.5 Hasil Cek <i>Inframe</i> pada Plasmid pET-28a.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Translate Asam Amino Nanobodi	27
2. GCUA Memenuhi <i>Preferens</i> 100%	28
3. Hasil <i>Hairpin</i> , <i>Self dimer</i> dan <i>Cross Dimer</i> pada Primer <i>Forward</i>	29
4. Lanjutan.....	30
5. Lanjutan.....	31
6. Hasil <i>Hairpin</i> , <i>Self Dimer</i> dan <i>Cross Dimer</i> pada Primer <i>Reverse</i>	32
7. Lanjutan.....	33
8. Lanjutan.....	34

DAFTAR PUSTAKA

- Bishop KEHaMD. 2012. *Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. Halitosis: the multidisciplinary approach*. Int J Oral Sci;4(2):55-63
- Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K. and Schildkraut, I. 1998. *FokI dimerization is required for DNA cleavage*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95, 10570–10575.
- Broceta, U., Castillo, D., Soriano, M., Salcedo, G. 2013. *Novel therapy based on camelid Nanobodies*, Therapeutic Delivery, 4(10), 1321-1336
- Brown TA, 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. An Introduction Iley-Blackell. Hal: 35-36.
- Borah, P. 2011. *Primer Designing for PCR*. Science Vision 11(3): P. 134 -136.
- Cuevas-Ramos D and Fleseriu M. 2014. *Treatment of Cushing's disease: a mechanistic update*. J Endocrinol; 223: R19-R39.
- Davies, J. and Riechmann, L. 1994. *Camelising human antibody fragments: NMR studies on VH domains*. FEES Lett. 339: 285–290.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Bajyana Songa, E., Bendahman, N. and Hamers, R. 1993. *Naturally occurring antibodies devoid of light chains*. Nature 363: 446–448.
- Handoyo, D. dan Rudiretna, A. 2000. *Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Umitas, 9(1): P. 17-29.
- Heinze KL, Ashleigh; Reniers, Renate; Wood, Stephen. 2015. *Longer-term increased cortisol levels in young people with mental health problems*. Psychiatry Research;236
- Hudson Tori and Bush Bradley. 2010. *The Role of Cortisol in Sleep*. Natural Medicine Journal 2(6).
- Jesica, F., & Friadi, A. (2019). *Hubungan Kadar Kortisol dan Prostaglandin Maternal Dengan Persalinan Preterm dan aterm*. Jurnal Ilmu Keperawatan Dan Kebidanan, 10(1), 21–29
- Judelson, H. 2006. *Guidelines For Designing Primers*. Primer Guidelines, 10 (6): 1-5.
- Kandhalu, P. 2013. *Effects of Cortisol on Hysical and Psychological Aspects of the Body and Effective Ways by Which One can Reduce Stress*. Berkelet Scientific Journal (5): 11-15
- Koes Irianto. 2017. *Biologi Molekular (Teori-Praktikum-Glosarium)*. Alfabeta. Jakarta

- Muladno. *Teknologi Rekayasa Genetika*. Ed 2. Bogor: IPB Press; 2010. h.61-66
- Muyldermans S. 2013. *Nanobodies: natural singledomain antibodies*. *Annu Rev Biochem* (82), 775–797
- Neary J, Malbon L, McKenzie D. 2002. *Relationship between serum, saliva and urinary cortisol and its implication during recovery from training*. *J Sci Med Sport*. (2):108-14
- Nugroho, Rudy A. 2016. *Dasar – Dasar Endokrinologi*. Mulawarman University press. Samarinda
- Pedersen Kasper. 2013. *Cloning and Expression of Fusion Protein Human Beta-Defensin 2 Green Fluorescent Protein in Escherichia coli*. Aalborg University in Denmark.
- Popp, J. and M. Bauer. 2015. *Modern Techniques for Pathogen Detection*. Pp. 60-62
- Priharto, A.A dan Jaziri, A.A. 2019. *Bioteknologi Perikanan dan Kelautan*. Malang: UB press.
- Ramos, C. R. R., P. A. E. Abreu, A. L. T. O. Nascimento dan P. L. Ho. 2004. *A High Copy T7 escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal m-terminal his tagged fusion peptide*. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. 37: 1103-1109
- Rodrigo Gomes, Guilherme Rosa, Rudy José, Estélio Henrique MD. 2012. *Cortisol and Physical Exercise*. Available at: 70 <https://www.researchgate.net/publication/228160384>. Diakses: 27 Oktober 2016.
- Rosano, G. L., Morales, E. S. & Ceccarelli, E. A. 2019. *New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: a 5-year update*. *Protein Sci*. 28, 1412–1422.
- Salimetrics. 2012. *Saliva collection and handling advice*. rd 3 ed. London
- Sasmito DEK, Kurniawan R, Muhimmah I. 2014. *Karakteristik primer pada polymerase chain raction (PCR) untuk sekuensing DNA*. *SNIMed V*: 93-102
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L., 2010, *Microbiology an introduction 10th edition*, Pearson edition, Inc., Publishing as Pearson Benjamins Cummings, San Francisco, 1301 Sansome.
- Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S and Conrath K, General strategy FEBS Letters, Federation of European Biochemical Societies 1255 L. Ding et al. 2019. *Crystal structure of nanobody binding to cortisol to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold*. *J Biol Chem* 284, 3273–3284.
- Yuwono, T. 2006. *Bioteknologi Pertanian*. Yogyakarta: universitas Gajah Mada Press