

**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN
SPIKE MUTAN SARS-CoV-2 TERFUSI
DENGAN *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* (GST)**

SKRIPSI



RISA YUNITA

**PROGRAM STUDI S1 KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2022**

**OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN *SPIKE* MUTAN SARS-CoV-2
TERFUSI DENGAN *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE* (GST)**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh
Gelara Sarjana Sains Bidang Kimia
pada Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga**

Oleh:

Risa Yunita

081811533017

Disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.

NIP. 196306151987012001

Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.

NIP. 199008012019032012

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Optimasi Ekspresi Protein Spike Mutan SARS-CoV-2
Terfusi dengan *Glutathione S-Transferase* (GST)
Penyusun : Risa Yunita
NIM : 081811533017
Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
Pembimbing 2 : Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.
Tanggal Sidang : 22 Juli 2022

Disetujui oleh:

Pembimbing I,



Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si.
NIP. 196306151987012001

Pembimbing II,



Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si.
NIP. 199008012019032012

Mengetahui,
Ketua Departemen Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga



Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 198307022009121005

PEDOMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘alamin atas segala rahmat dan hidayah Allah SWT, sehingga penyusun dapat menyelesaikan naskah skripsi dengan judul ‘Optimasi Ekspresi Protein *Spike* Mutan SARS-CoV-2 Terfusi dengan *Glutathione S-Transferase* (GST)’. Penyusun menyadari bahwa penulisan naskah skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, saran dan dukungan, sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Ibu Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si. selaku pembimbing II yang telah memberikan saran, bimbingan dan dukungan, sehingga naskah skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Mochamad Zakki Fahmi, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku ketua departemen kimia fakultas sains dan teknologi universitas airlangga
4. Drs. A. Budi Prasetyo, M.T. selaku dosen wali yang senantiasa membimbing dan memberikan nasihat kepada saya.
5. Orang Tua dan Keluarga yang selalu menjadi tempat keluh kesah dan juga senantiasa memberikan dukungan dan kasih sayang baik secara moral dan juga materi.
6. Bapak dan Ibu dosen kimia yang senantiasa dengan ikhlas memberikan ilmu pengetahuan dan pelajaran dengan penuh kasih sayang.
7. Kakak-kakak staff Laboratorium Proteomik PT–PUI Pusat Riset Rekayasa Molekul Hayati (*Research Center for Bio–Molecule Engineering*–BIOME) yang bersedia menemani dan sekaligus memberikan bimbingan serta arahan dalam proses penelitian dan pengambilan data sehingga skripsi ini bisa diselesaikan dengan baik.
8. Naufal, Shadi, Chum, Rahma, Chol dan faqih sebagai teman seperjuangan TA Biokimia yang sudah mau berjuang bersama dari mulai proses penulisan proposal, penelitian, pengambilan data hingga selesainya naskah ini.

9. Mahasiswa Kimia Universitas Airlangga angkatan 2018 yang telah memberi dukungan dan menemani dalam menuntut ilmu.
10. Saudara dan teman-teman yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu yang senantiasa bersedia mendengarkan dan memberikan dukungan atas pengerjaan skripsi ini

Penyusun menyadari bahwa dalam penulisan naskah proposal ini masih banyak kekurangan, sehingga penyusun mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi penulisan naskah skripsi yang lebih baik. Penyusun berharap naskah skripsi ini dapat berguna bagi penyusun dan pembaca agar dapat menjadi panduan dalam melakukan penelitian di bidang terkait.

Surabaya, 8 Januari 2022

Penyusun,

Risa Yunita

Yunita, R, 2022, Optimasi Ekspresi Protein *Spike* Mutan SARS-CoV-2 Terfusi dengan *Glutathione S-Transferase* (GST), skripsi ini dibawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M. Si dan Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si. Departemen Kimia, fakultas Sains dan teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

ABSTRAK

Protein *spike* telah dijadikan dasar dalam pengembangan antigen dan juga berbagai kit deteksi SARS-CoV-2. Sebelum dilakukan Produksi protein *spike* dilakukan proses *design* yaitu dengan dilakukannya mutasi pada D614G dan Q677H pada *spike wild type*. Hal ini dikarenakan kedua mutasi ini sangat berdampak pada proses pengenalan terhadap reseptor. Proses ekspresi pada *E. coli* BL21(DE3) memberikan keuntungan berupa produksi yang relatif murah, efisien dan mendapatkan hasil yang lebih banyak. Namun permasalahannya adalah protein rekombinan yang terbentuk dalam keadaan tidak terlarut (badan inklusi). Salah satu strategi yang digunakan untuk mengatasi ini adalah digunakan vektor pGEX-4T-1/*Smut* yang terfusi dengan GST pada N-terminal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah protein *spike* mutan SARS-CoV-2 rekombinan dapat diekspresikan pada fraksi terlarut dengan menggunakan GST di *E. coli* BL21(DE3) dan menentukan kondisi optimum ekspresi protein *spike* mutan SARS-CoV-2 rekombinan yang terfusi dengan GST pada *E. coli* BL21(DE3). Ekspresi protein dilakukan dengan optimasi terhadap suhu dan waktu induksi serta konsentrasi IPTG. Protein rekombinan *spike* mutan kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan SDS-PAGE dan dilakukan pengukuran pita densitas secara semi kuantitatif dengan menggunakan perangkat lunak ImageJ. Protein *Smut* terlarut berhasil diekspresikan dengan kondisi optimum yaitu induksi 0,5 mM IPTG dengan suhu 20 °C overnight (16–18 jam).

Kata kunci: GST-tag, SARS-CoV-2, Protein Spike, Protein Soluble, pGEX-4T-1/Smut.

Yunita, R, 2022, Optimizing of *Spike Protein Mutant SARS-CoV-2* Expression Fused into *Glutathione S-Transferase* (GST), this final project is under guidance of Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si. and Fatiha Khairunnisa, S.Si., M.Si. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRACT

The spike protein has been used to develop antigens and SARS-CoV-2 detection kits. Before the production of spike protein, a design process was carried out, specifically by D614G and Q677H mutations in a wild-type spike. These two mutations affect the receptor's recognition process. The expression process in *E. coli* BL21(DE3) offers advantages of low cost, efficient production, and higher yields. The issue is that the recombinant proteins form an insoluble state (inclusion bodies). A strategy to overcome those problems is with using pGEX-4T-1/*Smut* as a vector that contains GST. The GST-tag fuse into Smut protein at the N-terminus. The study aimed to see if the recombinant SARS-CoV-2 mutant spike protein could be expressed in the soluble fraction and determine its optimum expression conditions using GST in *E. coli* BL21(DE3). Determine the protein expression by optimizing the temperature, induction time, and IPTG concentration. The spike mutant recombinant protein was also analyzed using SDS-PAGE, and semiquantitative intensity band measurement was performed using ImageJ. Soluble smut protein was successfully expressed under optimal conditions, which is 0.5 mM induction of IPTG with 20 °C overnight (16-18 Hours).

Keywords: GST-tag, SARS-CoV-2, Spike Protein, Soluble Protein, pGEX-4-1/Smut.

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Risa Yunita
NIM : 081811533017
Program Studi : S1 Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: **OPTIMASI EKSPRESI PROTEIN *SPIKE* MUTAN SARS-COV-2 TERFUSI DENGAN *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST)***

Apabila suatu saat nanti terbukti melakukan Tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 9 Juni 2022


Risa Yunita
NIM. 081811533017

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iii
PEDOMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 SARS-CoV-2.....	5
2.1.1 Protein <i>Spike</i>	6
2.1.2 Mutasi pada D614G dan Q677H.....	8
2.2 Ekspresi Sel Prokariotik.....	9
2.2.1 Sel inang <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	12
2.3 DNA Rekombinan.....	14
2.3.1 Vektor Ekspresi pGEX-4T-1.....	16
2.4 Analisis Protein dengan Elektroforesis.....	19
2.4.1 <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (SDS-PAGE).....	19
BAB III METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	22
3.2.1 Bahan.....	22
3.2.2 Alat Penelitian.....	23
3.3 Diagram Alir Penelitian.....	24
3.4 Prosedur Penelitian.....	25
3.4.1 Pembuatan Media dan Reagensia.....	25
3.4.1.1 Pembuatan Media Cair.....	25
3.4.1.2 Pembuatan Media Padat.....	25
3.4.1.3 Pembuatan Larutan Ampisilin 100 mg/mL.....	25
3.4.1.4 Pembuatan Larutan buffer PBS (binding buffer/A).....	25
3.4.1.5 Pembuatan Gel SDS-PAGE 12 %.....	26
3.4.1.6 Pembuatan Larutan <i>Staining</i>	26
3.4.1.7 Pembuatan Larutan <i>Destaining</i>	26

3.4.1.8 Pembuatan Larutan <i>Running Buffer</i> SDS-PAGE.....	26
3.4.1.9 Pembuatan <i>Loading Buffer</i> SDS-PAGE.....	27
3.4.1.10 Pembuatan Larutan Bufer TAE (Tris Acetate EDTA) 1x.....	27
3.4.2 Peremajaan Bakteri.....	27
3.4.2.1 Peremajaan bakteri <i>E. coli</i> DH5 α /pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>	27
3.4.2.2 Peremajaan bakteri <i>E. coli</i> BL21(DE3)/pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>	27
3.4.3 Pembuatan Inokulum Bakteri <i>E. coli</i> DH5 α dan <i>E. coli</i> BL21(DE3)	28
3.4.4 Pembuatan Sel Kompeten Bakteri <i>E. coli</i> DH5 α dan <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	28
3.4.5 Transformasi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> ke Sel Kompeten <i>E. coli</i> DH5 α	29
3.4.6 Seleksi Transforman <i>E. coli</i> DH5 α Rekombinan.....	29
3.4.7 Isolasi Plasmid Rekombinan pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>	29
3.4.8 Karakterisasi Hasil Isolasi Plasmid Rekombinan <i>Spike</i> Mutan SARS- CoV-2 dalam <i>E. coli</i> DH5 α dan BL21(DE3).....	30
3.4.8.1 Restriksi DNA Plasmid Rekombinan secara <i>Single Digest</i>	31
3.4.8.2 Elektroforesis Agarosa Hasil DNA Plasmid Rekombinan.....	31
3.4.9 Transformasi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> ke Sel Kompeten <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	32
3.4.10 Isolasi Plasmid Rekombinan pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>	32
3.4.11 Optimasi Ekspresi Protein Rekombinan <i>Smut</i> pada <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	33
3.4.11.1 Optimasi Ekspresi terhadap Suhu, Waktu, dan induksi IPTG....	34
3.4.12 Analisis Protein Rekombinan <i>Smut</i> dengan SDS-PAGE.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Transformasi pGEX- <i>Smut</i> pada <i>Escherichia coli</i> DH5 α	37
4.2 Isolasi dan Konfirmasi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> secara <i>Single Digest</i>	39
4.3 Transformasi dan Konfirmasi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dengan <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	42
4.4 Optimasi Ekspresi Protein Rekombinan <i>Smut</i> pada <i>E. coli</i> BL21(DE3)....	43
4.4.1 Optimasi Suhu dan Waktu Induksi.....	46
4.4.2 Optimasi Konsentrasi IPTG.....	48
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA.....	52
LAMPIRAN.....	56
Lampiran 1. Peta pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>	56
Lampiran 2. Urutan nukleotida gen penyandi protein <i>spike</i> mutan pada pGEX- 4T-1/ <i>Smut</i>	57
Lampiran 3. Analisis GST tag dengan Prot Param.....	59
Lampiran 4. Hasil <i>multiple sequence alignment</i> antara <i>Spike Wildtype</i> dengan <i>Smut</i>	61

Lampiran 5. Hasil SDS PAGE dan Grafik perbandingan Intensitas pita Smut terlarut untuk IPTG Ganjil dan Genap.....	63
Lampiran 6. Perhitungan untuk pembuatan larutan buffer TAE 50X.....	64
Lampiran 7. Pembuatan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) dalam 500 mL.....	65
Lampiran 8. Pembuatan <i>running buffer</i> SDS-PAGE 10X dalam 1000 mL.....	66
Lampiran 9. Pembuatan <i>staining solution</i> dalam 1000 mL.....	66
Lampiran 10. Pembuatan <i>destaining solution</i> dalam 1000 mL.....	66

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Struktur SARS-CoV-2	6
2.2	Struktur spike protein	7
2.3	a). <i>Wild type spike</i> protein (D614); b) protein <i>spike</i> mutan	9
2.4	Struktur operon laktosa	11
2.5	Pengaturan sintesis mRNA oleh Laktosa dan glukosa	12
2.6	Pengikatan DNA Plasmid oleh Sel Kompeten	16
2.7	Peta pGEX-4T-1	17
2.8	Struktur GST-Tag (PDB: 1Y6E)	18
2.9	Pemisahan protein dengan SDS-PAGE	21
3.1	Diagram Alir Penelitian	24
4.1	Hasil Transformasi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> ke dalam <i>E. coli</i> DH5 α .	38
4.2	Visualisasi hasil Isolasi dan restriksi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> DH5 α secara <i>single digest</i> menggunakan enzim restriksi <i>NotI</i> (± 8800 bp) pada agarosa 1% 100 volt, 30 menit.	41
4.3	Hasil Transformasi pGEX- <i>Smut</i> ke dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3)	42
4.4	Visualisasi hasil restriksi pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>single digest</i> menggunakan enzim restriksi <i>NotI</i> (± 8800 bp) pada agarosa 1% 100 volt, 30 menit.	43
4.5	Visualisasi profil total protein pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,5 mM, suhu 37°C protokol standar pada koloni 1.	45
4.6	Grafik Perbandingan Intensitas Pita Hasil SDS-PAGE pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,5 mM, suhu 37°C selama 4 jam dengan protokol standar.	45
4.7	Visualisasi profil total protein pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,5 mM, suhu 20°C (4 jam dan 16–18 jam (<i>overnight</i>)).	47
4.8	Grafik Perbandingan Intensitas Pita Hasil SDS-PAGE pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,5 mM, suhu 20°C selama 4 jam dan <i>overnight</i> .	48
4.9	Visualisasi profil total protein pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, suhu 20°C 16–18 jam (<i>overnight</i>).	49
4.10	Grafik Perbandingan Intensitas Pita Supernatan Hasil SDS-PAGE pGEX-4T-1/ <i>Smut</i> dalam <i>E. coli</i> BL21(DE3) dengan induksi IPTG 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1,0 mM; suhu 20°C 16–18 jam (<i>overnight</i>).	50

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1.	Peta pGEX-4T-1/ <i>Smut</i>
2.	Urutan nukleotida gen penyandi protein <i>spike</i> mutan pada pGEX- <i>Smut</i>
3.	Analisis GST tag dengan ProtParam
4.	Hasil <i>multiple sequence alignment</i> antara <i>Spike Wildtype</i> dengan <i>Smut</i>
5.	Hasil SDS PAGE dan Grafik Perbandingan intensitas Pita Smut terlarut untuk IPTG Ganjil dan Genap
6.	Perhitungan untuk pembuatan larutan buffer TAE 50X
7.	Pembuatan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) dalam 500 mL
8.	Pembuatan <i>running buffer</i> SDS-PAGE 10X dalam 1000 mL
9.	Pembuatan <i>staining solution</i> dalam 1000 mL
10.	Pembuatan <i>destaining solution</i> dalam 1000 mL