

## Konstruksi Plasmid Rekombinan pET-28a-Nanobodi Secara *In Silico*

Nur Asni Setiani\*, Umi Baroroh, Ade Pia Handayani, Nushi Chairunnisa, Irma Mardiah  
Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung, Indonesia

\*Corresponding author: nur.asni@stfi.ac.id

### Abstract

Nanobodies are antibody fragments that are able to bind to certain antigens selectively, have a small size, can penetrate into tissues, are easily modified and produced for diagnostic or therapeutic purposes. These advantages make nanobodies potential to be used as components in diagnostic kits, one of which is to detect cortisol. The objective of this research is To construct pET-28a-Nanobody recombinant plasmid *in silico*. This research method was the amino acid sequence of the cortisol-binding nanobody was taken from the Protein Data Bank (PDB) with the code 6ITP which was then reverse-translated into DNA. Checking codons that match *Escherichia coli* was carried out using a Graphical Codon Usage Analyzer (GCUA) and the restriction map was analyzed using NEBCutter. The primer design was made manually by adding the appropriate restriction site pET-28a plasmid, start codon, and stop codon. The primer was analyzed using oligoanalyzer. The nanobody gene was then ligated with pET-28a and the reading frame suitability was checked. The result of this study was the nanobody gene consisted of 381 nitrogenous bases which could be propagated *in vitro* through PCR. The primers that can be used are forward primers with the addition of restriction site EcoRI 5'-GAATTCATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' and reverse primers with addition of restriction site XhoI 5'-CTCGAGTTAGCTGCTAACGGTAACCTG - 3'. The nanobody gene was able to insert into the pET-28a plasmid without changing the reading frame. The construction of pET-28a-Nanobodies resulted a reading frame according to the expected amino acids.

**Keywords:** Nanobody, construct, pET-28a, primer

### Abstrak

Nanobodi merupakan fragmen antibodi yang mampu mengikat antigen tertentu secara selektif, memiliki ukuran kecil, dapat berpenetrasi ke dalam jaringan, mudah dimodifikasi dan diproduksi untuk tujuan diagnostik atau terapeutik. Kelebihan tersebut membuat nanobodi potensial untuk digunakan sebagai komponen dalam kit diagnostik, salah satunya yaitu untuk mendeteksi kortisol. Tujuan penelitian ini untuk membuat konstruk plasmid rekombinan pET-28a-Nanobodi secara *in silico*. Metode penelitian ini adalah urutan asam amino nanobodi yang mengikat kortisol diambil dari Protein Data Bank (PDB) dengan kode 6ITP yang kemudian ditranslasi balik menjadi DNA. Pengecekan kodon yang sesuai dengan *Escherichia coli* dilakukan menggunakan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) dan dianalisis peta restriksinya menggunakan NEBCutter. Perancangan primer dibuat secara manual dengan menambahkan sisi restriksi yang sesuai plasmid pET-28a, kodon start, dan kodon stop. Analisis primer dilakukan melalui oligoanalyzer. Gen nanobodi kemudian diligasikan dengan pET-28a dan dilakukan pengecekan kesesuaian kerangka baca. Hasil dari penelitian ini adalah gen nanobodi terdiri dari 381 basa nitrogen yang dapat diperbanyak secara *in vitro* melalui PCR. Primer yang dapat digunakan adalah primer *forward* dengan penambahan sisi restriksi EcoRI 5'-GAATTCATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA-3' dan primer *reverse* dengan penambahan sisi restriksi XhoI 5'-CTCGAGTTAGCTGCTAACGGTAACCTG - 3'. Gen nanobodi dapat menyisip kedalam plasmid pET-28a tanpa mengubah pembacaan. Konstruksi pET-28a-Nanobodi menghasilkan kerangka pembacaan sesuai dengan asam amino yang diharapkan.

**Kata Kunci:** Nanobodi, Konstruksi, pET-28a, Primer

### PENDAHULUAN

Nanobodi merupakan fragmen antibodi baru yang ditemukan pada camelia (unta, llama, alpaka). Nanobodi terdiri dari domain antibodi

variabel monomer tunggal yang mampu mengikat antigen tertentu secara selektif. Nanobodi memiliki ukuran yang kecil yaitu sekitar 12–15 kDa (Muyldermans, 2013).

Nanobodi memiliki berbagai keunggulan dibandingkan antibodi konvensional. Ukuran yang kecil membuat nanobodi dapat berpenetrasi pada jaringan dengan baik dan mudah dimodifikasi untuk tujuan diagnostic atau terapeutik (Harmsen and De Haard, 2007). Begitupun dengan stabilitas dan toleransinya yang tinggi terhadap pelarut organik yang sangat pekat, nanobodi mampu menggantikan antibodi konvensional dalam pengujian ELISA dan sistem deteksi mikro berbasis chip.

Menurut penelitian Ding *et al.* (2019), nanobodi dapat berikatan kuat dengan kortisol melalui interaksi hidrofobik. Struktur nanobodi yang terkompleks dengan kortisol tersedia dalam PDB dengan kode 6ITP. Kortisol dikenal sebagai hormon stress pada tubuh yang disintesis dari kolesterol (Thau, *et al.*, 2021). Jumlah kortisol yang berlebih atau kurang di dalam tubuh akan menyebabkan masalah kesehatan seperti sindrom Cushing dan Addison sehingga monitoring kadar kortisol secara berkala penting dalam menjaga kesehatan tubuh (Baroroh, *et al.*, 2022). Metode pengukuran kadar kortisol sudah banyak dilakukan yakni dengan kromatografi, ELISA, dan immunosensor optikal serta elektrik (Kaushik, *et al.*, 2014). Nanobodi yang dikonjugasikan dengan nanopartikel emas menawarkan banyak keunggulan sebagai kit deteksi. Selain sederhana dan cepat penyiapannya, metode ini stabil dan memiliki sensitivitas tinggi (Liu *et al.*, 2019). Ukuran nanobodi yang lebih kecil dari antibodi utuh, membuatnya lebih mudah diproduksi dan biayanya lebih murah.

Teknologi DNA rekombinan merupakan salah satu metode yang bisa digunakan untuk memperbanyak nanobodi dalam memproduksi kit diagnostik kortisol. Perbanyak gen dapat dilakukan melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang membutuhkan primer sebagai komponen utamanya. Primer dapat ditambahkan sisi restriksi yang sesuai dengan plasmid sehingga dapat terligasi dengan baik (Maksum dkk., 2017). Ekspresi protein nanobodi dapat menggunakan *Escherichia coli*

sebagai inangnya karena telah terkarakterisasi dengan baik dan pertumbuhan serta produksi proteinnya bisa lebih cepat. Oleh karena itu, penting untuk menggunakan kodon yang sesuai dengan bakteri inang agar protein dapat terekspresi dengan baik.

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, penelitian ini dilakukan untuk membuat konstruk plasmid rekombinan pET28a-Nanobodi secara *in silico* yang kedepannya dapat digunakan untuk memproduksi protein nanobodi sebagai komponen kit diagnostik.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gen nanobodi yang ditranslasi balik dari urutan asam amino dengan kode 6ITP yang diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) serta plasmid pET-28a.

### **Alat**

Alat yang digunakan terdiri dari perangkat keras dan perangkat lunak. Perangkat keras berupa seperangkat komputer, sedangkan perangkat lunak terdiri dari Protein Data Bank (PDB), Reverse translate, Graphical Codon Usage Analyzer (GCUA), NEBcutter, OligoAnalyzer, dan SnapGene.

### **Metode**

#### **Penyiapan DNA target**

Urutan asam amino nanobodi diperoleh dari Protein Data Bank (PDB) dengan kode 6ITP, yaitu nanobodi yang berikatan dengan kortisol (Ding *et al.*, 2019). Kode asam amino tersebut disimpan dalam format FASTA dan ditranslasi menggunakan <https://bioinformatics.org/>. Selanjutnya, dilakukan analisis preferensi penggunaan kodon pada *Escherichia coli* menggunakan *Graphical Codon Usage Analyzer* (GCUA) dan dipilih persentasi paling tinggi. Urutan DNA yang diperoleh selanjutnya disebut DNA target dan dilakukan analisis sisi restriksi menggunakan NEBcutter untuk mencegah terjadinya pemotongan oleh enzim restriksi.

### Penyiapan vektor ekspresi

Plasmid yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan plasmid pET-28a. Gen target nanobodi akan disisipkan pada daerah *Multiple Cloning Site* (MCS) sehingga dipilih enzim restriksi yang tidak memotong target.

### Desain primer

Primer dibuat secara manual menggunakan DNA nanobodi sebagai template. Primer akan digunakan untuk memperbanyak gen nanobodi secara *in vitro* dengan penambahan sisi restriksi enzim yang sesuai dengan plasmid, kodon start dan kodon stop. Hasil desain primer dianalisis menggunakan OligoAnalyzer untuk melihat kesesuaian dengan parameter primer yang baik dan dilakukan simulasi PCR menggunakan SnapGene untuk melihat penempelan primer.

### Konstruksi plasmid

Konstruksi plasmid rekombinan dilakukan menggunakan SnapGene untuk mengetahui letak posisi gen nanobodi yang diligasikan ke dalam plasmid pET-28a sehingga menghasilkan kerangka pembacaan asam amino yang sesuai. Langkah pertama yang dilakukan yaitu pemotongan plasmid pET-28a dan DNA nanobodi menggunakan enzim restriksi yang sesuai. Selanjutnya, diligasikan dengan DNA nanobodi dan diterjemahkan menjadi asam amino sesuai dengan kerangka pembacaan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penyiapan DNA target

Urutan asam amino nanobodi yang berikatan dengan kortisol yang diperoleh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan kode 6ITP terdiri dari 127 asam amino dengan urutan sebagai berikut:

“QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVVSNTG  
STGYWAWFRQPGTEREGVAATYTAGSGT  
SMTYYADSVKGRFTISQDNAKKTLYLQMNSL  
KPEDTGMVRCSTRFAGRWYRDSEYRAWG  
QGTQVTVSS”

Urutan asam amino kemudian dirubah kedalam urutan nukleotida dengan menggunakan *software*

<https://bioinformatics.org/>. sehingga diperoleh 381 pasang basa yang selanjutnya dianalisis menggunakan *software* GCUA untuk menganalisis suatu kodon agar mencapai hasil kodon yang preferens dengan *E.coli*. Gambar 1 menunjukkan hasil analisis GCUA. Beberapa penggunaan kodon dari urutan gen nanobodi tidak preferens dengan kodon yang digunakan *Escherichia coli* (kesesuaian relatif kurang dari 100%). Terdapat 6 asam amino atau 18 kodon yang tidak preferens. Asam amino yang tidak preferens tersebut diantaranya V atau valin (GTG), G atau glisin (GGC), A atau alanin (GCG), N atau asparagin (AAC), R atau arginin (CGC) dan C atau sistein (TGC). Kodon-kodon tersebut kemudian diubah dengan urutan kodon yang bisa mencapai *preferens* 100% pada *E.coli* (Lucks *et al.*, 2008). Tujuan perubahan tersebut dilakukan agar ketika diekspresikan pada inang *E.coli* dapat dihasilkan asam amino yang sesuai. Tabel 1 menunjukkan perubahan pada kodon yang mengkode asam amino valin, glisin, alanin, asparagin, arginin dan sistein.

Urutan asam amino yang telah dirubah tersebut selanjutnya dianalisis kembali dengan menggunakan GCUA hingga mencapai preferensi 100%. Dengan nilai preferensi 100%, gen dapat terekspresi dengan baik pada inang *E.coli* sehingga dihasilkan protein target. Urutan DNA yang selanjutnya akan digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut :

“CAGGTTTCAGCTGCAGGAAAGCGGTGGTG  
GTAGCGTTCAGGCAGGTGGTAGCCTGCGT  
CTGAGCTGTGTTGTTAGCGGTAATACCGG  
TAGCACCGGTTATTGGGCATGGTTTTCGTC  
AGGGTCCGGGTACCGAACGTGAAGGTGTT  
GCAGCAACCTATACCGCAGGTAGCGGTAC  
CAGCATGACCTATTATGCAGATAGCGTTAA  
AGTTCGTTTTACCATTAGCCAGGATAATGC  
AAAAAAAAACCCTGTATCTGCAGATGAATAG  
CCTGAAACCGGAAGATACCGGTATGTATC  
GTTGTGCAAGCACCCGTTTTGCAGGTCCG  
TGGTATCGTGATAGCGAATATCGTGCATG  
GGTTCAGGGTACCCAGGTTACCGTTAGCA  
GC”

Pengecekan gen nanobodi selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *software* NEBCutter untuk mengecek enzim restriksi yang dapat memotong DNA target. Pengecekan ini juga bertujuan untuk memilih enzim restriksi pada plasmid yang tidak memotong DNA target. Gambar 2 menunjukkan hasil analisis gen nanobodi menggunakan NEBCutter. Pada gambar tersebut terlihat ada beberapa enzim restriksi yang dapat memotong gen nanobodi diantaranya yaitu MspA1I, PvuII, PaqCI, HgaI, BspCNI, DdeI, Hyp188I, Sau96I, Avall, HpyAV, HpyCH4IV, BbvI, MwoI, MseI, MboII, BcgI, Hpy188II, BsaJI, BstEII dan HpyCH4III. Setelah dilihat dan dibandingkan dengan enzim restriksi yang terdapat pada plasmid pET-28a yang berada pada bagian *multiple cloning site* (MCS), bahwa enzim restriksi yang terdapat pada plasmid tersebut dapat digunakan karena tidak memotong gen nanobodi. Enzim yang terdapat dalam plasmid pET-28a diantaranya yaitu XhoI, NotI, EagI, Hind III, Sall, SacI, EcoRI, BamHI, NheI, NdeI dan NcoI.

### Penyiapan vektor ekspresi

Vektor ekspresi merupakan vektor yang digunakan untuk mengekspresikan gen menjadi protein yang diharapkan. Vektor ekspresi yang digunakan dalam penelitian ini berupa plasmid pET-28a (Gambar 3). Dilihat dari bagian *multiple cloning site* plasmid pET-28a enzim restriksi yang dipilih untuk menyisipkan gen nanobodi diantaranya pada bagian XhoI dan EcoRI. EcoRI merupakan suatu enzim restriksi yang banyak digunakan dalam berbagai penelitian, sedangkan XhoI merupakan enzim yang posisinya diujung sehingga meminimalisir keberadaan enzim restriksi lain.

### Desain Primer

Tahapan selanjutnya dalam penelitian ini yaitu menentukan desain primer untuk memperbanyak gen nanobodi. Desain primer secara manual dilakukan dengan mengambil 18 basa diawal dan diakhir gen nanobodi yang kemudian ditambahkan sisi restriksi enzim EcoRI (CTTAAG) dan basa pengkode kodon

start (ATG) pada bagian primer *forward*, sedangkan pada bagian primer *reverse* ditambahkan sisi restriksi enzim XhoI (CTCGAG) dan basa pengkode kodon stop (TAA) pada bagian primer *reverse*. Hasil primer *forward* dan primer *reverse* sebagai berikut:

Primer *forward* :

5'GAATTCATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA3'

Primer *reverse* :

5'CTCGAGTTAGCTGCTAACGGTAACCTG3'

Primer tersebut dianalisis menggunakan OligoAnalyzer dan disimulasikan proses PCR menggunakan SnapGene. Adapun hasil analisis primer terangkum dalam Tabel 2. Analisis berupa panjang primer, %GC, T<sub>m</sub>, dimer, dan hairpin.

Berdasarkan hasil analisis primer, panjang basa primer setelah adanya penambahan urutan DNA sisi restriksi dan kodon masih berada pada rentang panjang primer yang sesuai, yaitu 27pb. Jika primer yang dihasilkan terlalu pendek, sulit untuk menempel pada template dan mudah terlepas. Sedangkan ukuran primer yang terlalu panjang dapat berakibat terhibridisasi dengan primer lain sehingga tidak membentuk polimerisasi DNA.

Begitupun dengan hasil %GC dan T<sub>m</sub>, kedua primer memenuhi persyaratan. Persentase GC adalah kandungan jumlah basa G (guanin) dan C (sitosin) yang dapat mempengaruhi T<sub>m</sub> suatu primer. Persentase GC juga mempengaruhi ikatan antar untai pada DNA. Persentase GC yang baik berada pada rentang 40-60% (Septiari *et al.*, 2015). Primer dengan persentase GC yang rendah tidak akan menempel secara efektif pada template, sedangkan persentase GC melebihi 60% dapat menurunkan tingkat ekspresi, karena dapat menterminasi transkripsi (Sasmito dkk, 2014). *Melting temperature* (T<sub>m</sub>) adalah temperatur di mana 50% untai ganda DNA terpisah. Hasil T<sub>m</sub> dari primer *forward* sebesar 62°C dan primer *reverse* sebesar 63°C. Primer dengan T<sub>m</sub> yang terlalu tinggi (>65°C) akan mengurangi efektifitas *annealing* sehingga proses amplifikasi DNA berjalan kurang baik,

sedangkan Tm yang terlalu rendah memiliki kecenderungan menempel ditempat lain dan menghasilkan produk yang tidak spesifik (Borah, 2011).

Kriteria lain yang dianalisis oleh *oligoanalyzer* adalah *hairpin*, *self dimer*, dan *cross dimer*. *Hairpin* adalah salah satu struktur sekunder yang sebaiknya dihindari dalam mendesain primer. Struktur *hairpin* dapat dipecah dengan adanya  $\Delta G$  atau energi bebas. Hasil dari *hairpin* pada primer *forward* sebesar -0,19 kcal/mol dan primer *reverse* sebesar -0,22 kcal/mol. Struktur *hairpin* dapat dipecah apabila memiliki nilai  $\Delta G$  lebih besar dari -6 kcal/mol sehingga *hairpin* yang terbentuk pada primer *forward* dan *reverse* dapat digunakan karena dapat dipecah dan tidak mengganggu proses penempelannya pada template (Sasmito *et al.*, 2014).

*Self dimer* merupakan primer yang berikatan dengan primer lainnya yang sejenis. Kedua primer memiliki kemungkinan membentuk *self dimer* karena nilai  $\Delta G$  kurang dari -6 kcal/mol yaitu -7,04 kcal/mol sehingga melewati batas toleransi dari persyaratan nilai  $\Delta G$  pada struktur *self dimer*. Hal ini dapat mengakibatkan proses penempelan pada template tidak berjalan maksimal bahkan dapat terjadi kegagalan penempelan, dimana masing-masing primer akan menempel pada primer itu sendiri. Sama halnya dengan nilai *cross dimer*, pasangan primer *forward* dan *reverse* tidak memenuhi persyaratan karena kedua primer tersebut memiliki nilai  $\Delta G$  yang lebih kecil dari -6 kcal/mol yaitu -7,04 kcal/mol. *Cross dimer* merupakan ikatan yang terjadi jika suatu primer berikatan dengan primer pasangannya (primer *reverse* dan primer

*forward*). Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa primer masih dapat digunakan dengan meningkatkan konsentrasi primer saat proses PCR.

### Konstruksi Plasmid

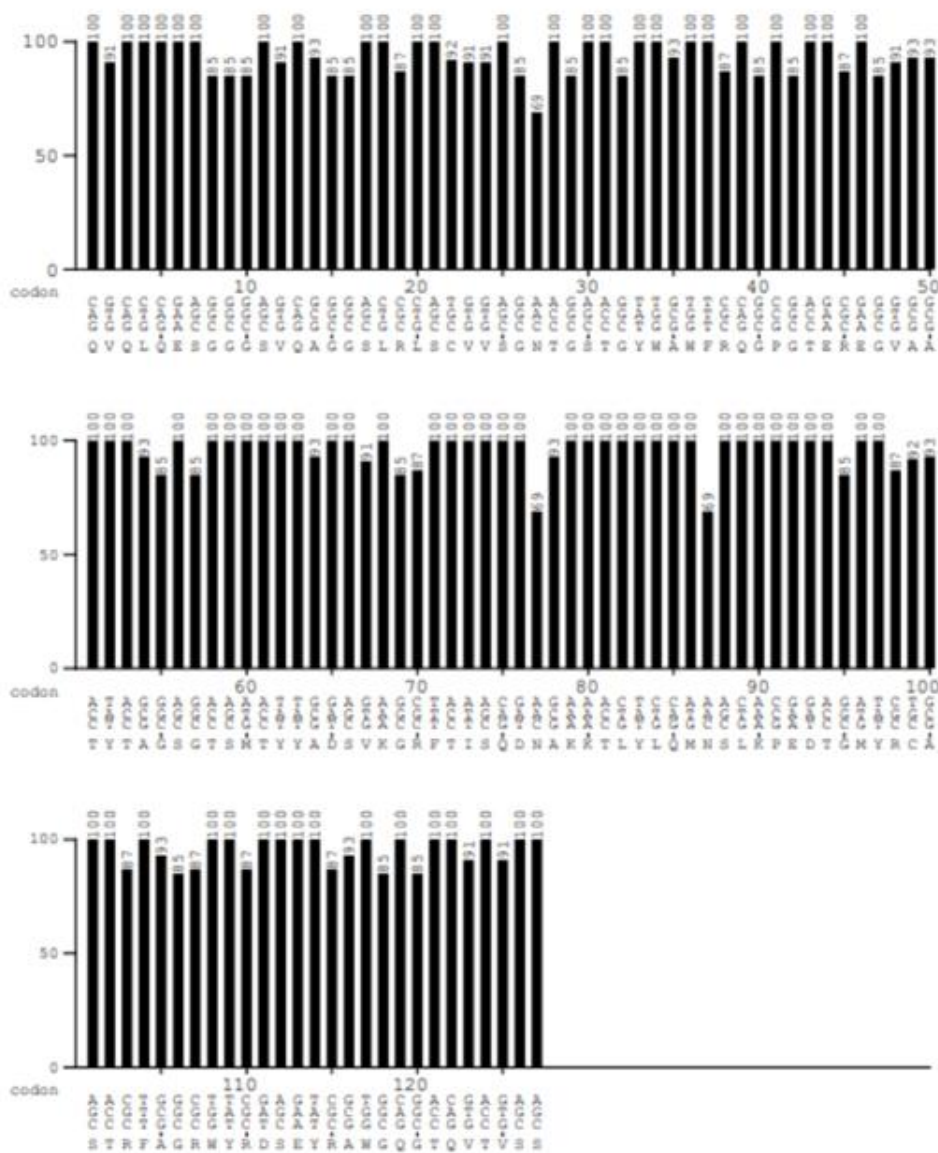
Konstruksi plasmid dilakukan bertujuan untuk menyisipkan suatu gen nanobodi pada plasmid pET-28a. Baik gen maupun plasmid keduanya dipotong menggunakan enzim XhoI dan EcoRI kemudian diligasikan sehingga terbentuk plasmid rekombinan pET-28a-Nanobodi seperti pada Gambar 4. Berhasil atau tidaknya suatu gen target diligasikan pada plasmid ditandai dengan tidak berubahnya kerangka pembacaan (*in frame*) sehingga protein yang diharapkan dapat diekspresikan dengan baik. Berdasarkan hasil pengecekan kerangka baca menggunakan SnapGene (Gambar 5), gen nanobodi terligasi dengan baik dan *in frame* sehingga pembacaan sesuai dengan urutan asam amino yang diharapkan.

### KESIMPULAN

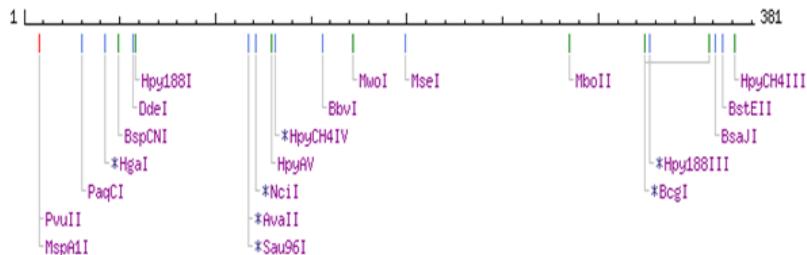
Gen nanobodi dapat diperbanyak menggunakan primer *forward* dengan sisi restriksi EcoRI 5'GAATTCATGCAGGTTTCAGCTGCAGGAA3' dan primer *reverse* dengan sisi restriksi XhoI 5'CTCGAGTTAGCTGCTAACGGTAACCTG3', serta dapat menyisip pada *Multiple Cloning Site* (MCS) plasmid pET-28a dengan menghasilkan pembacaan *inframe*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Yayasan Hazanah yang telah memberikan hibah riset fundamental.

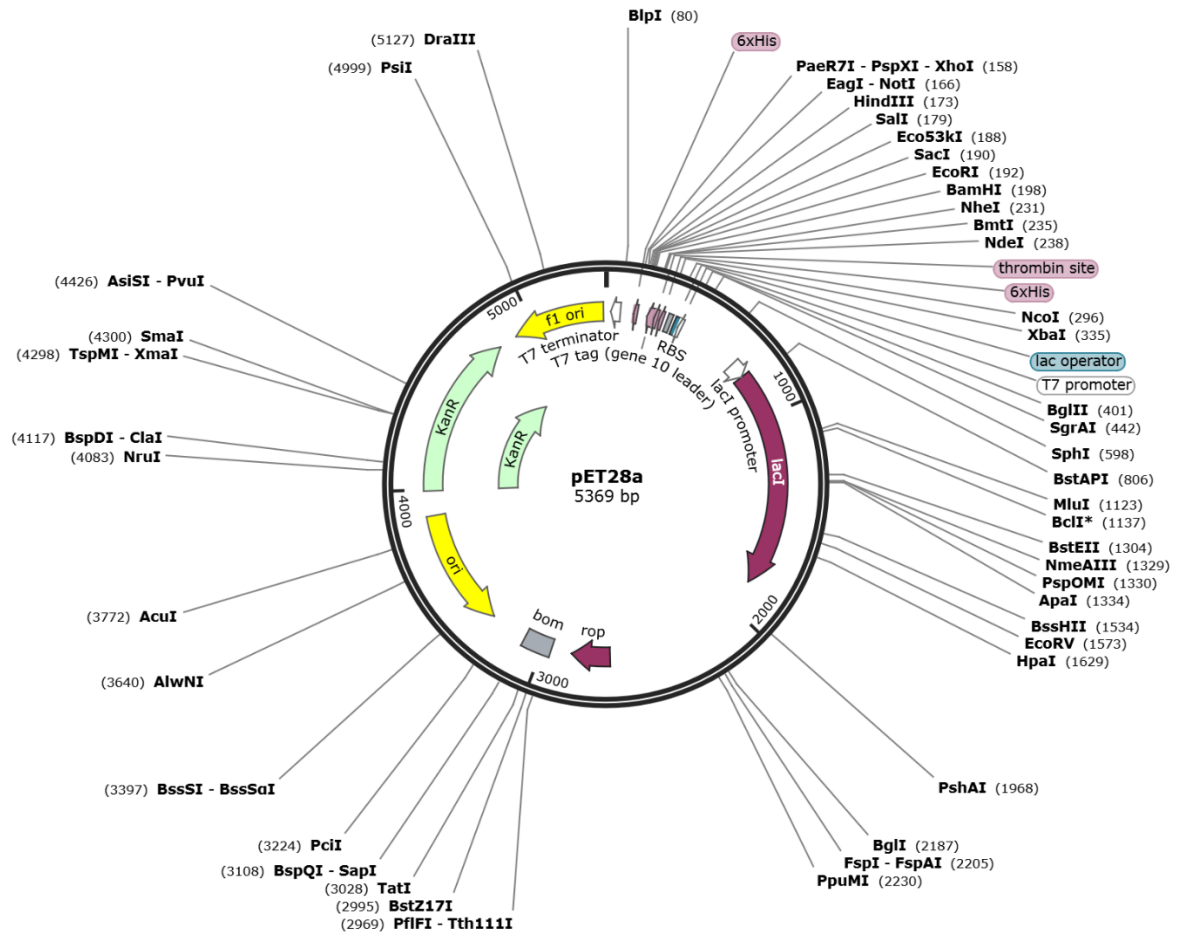


Gambar 1. Hasil analisis GCUA *relative* kurang dari 100%

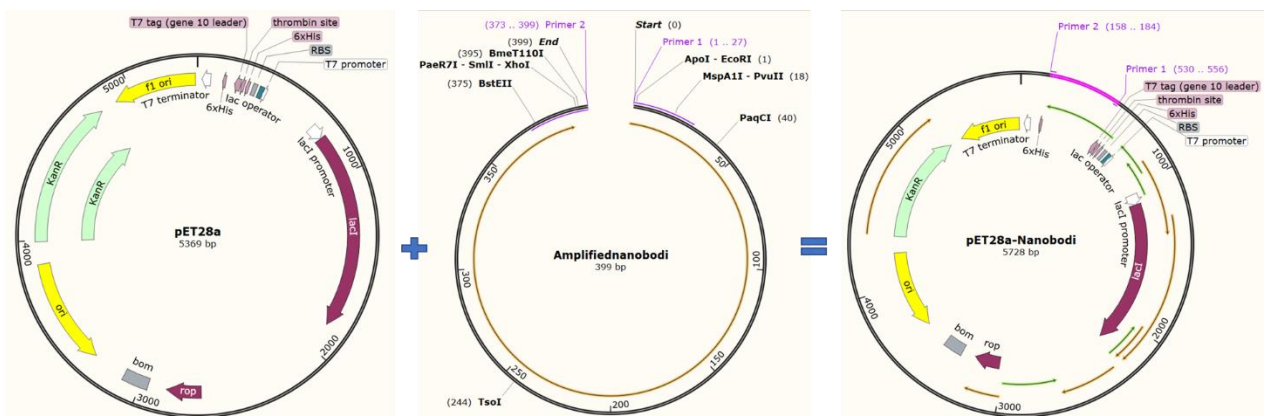


Gambar 2. Hasil analisis dari NEBCutter

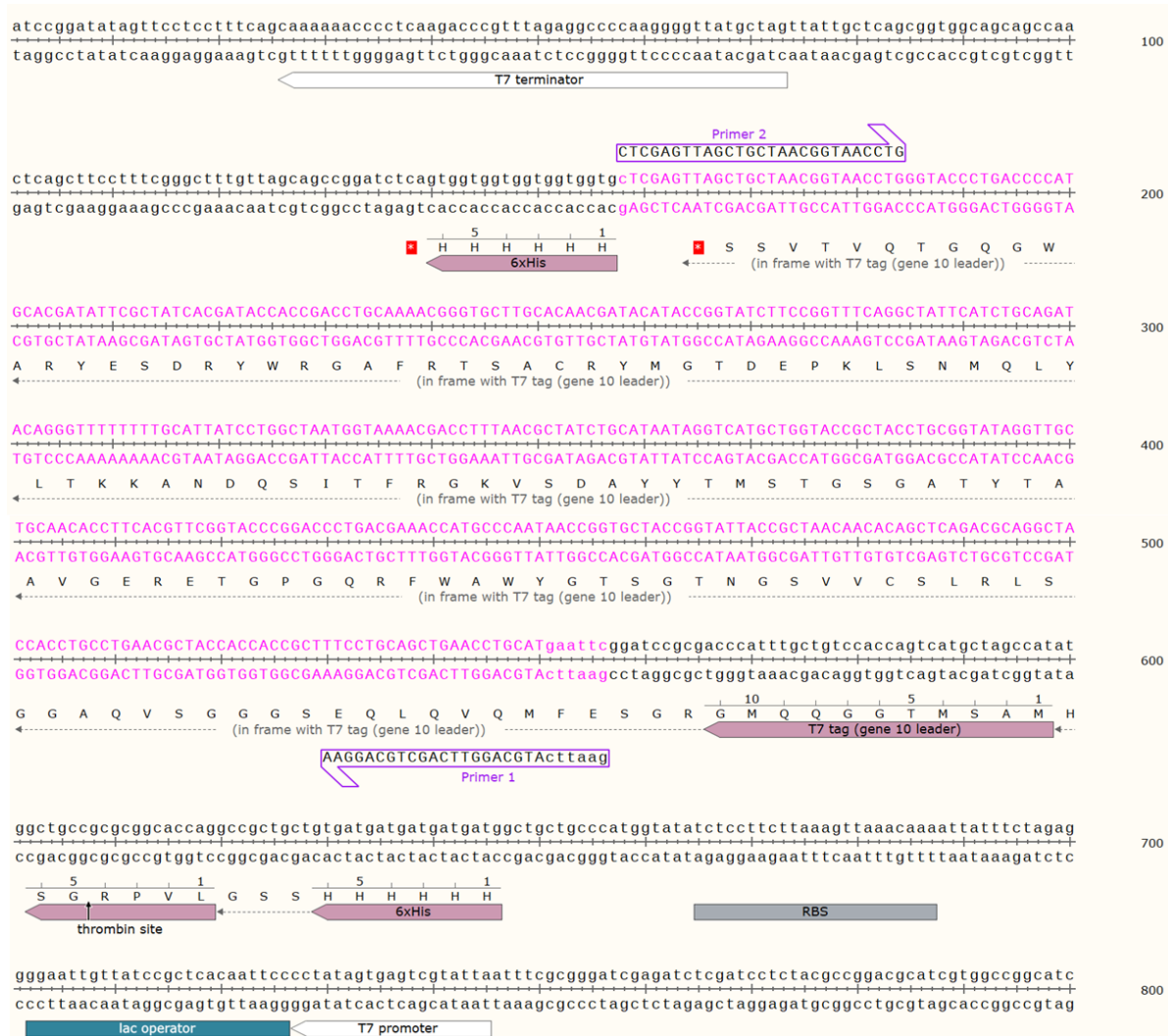
Created with SnapGene®



Gambar 3. Peta plasmid pET-28a



Gambar 4. Hasil konstruksi plasmid rekombinan pET-28a-Nanobodi



**Gambar 5.** Hasil cek *inframe* plasmid rekombinan pET-28a-Nanobodi

**Tabel 1.** Perubahan kodon asam amino

Asam amino	Kodon awal	Kodon yang dirubah
Valin (V)	GTG	GTT
Glisin (G)	GGC	GGT
Alanin (A)	GCG	GCA
Asparagin (N)	AAC	AAT
Arginin (R)	CGC	CGT
Cistein (C)	TGC	TGT

**Tabel 2.** Hasil analisis primer

Kriteria	Syarat	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>
Panjang primer	18-30 pb	27 pb	27 pb
%GC	40–60%	48%	52%
Tm (°C)	42-65 °C	62°C	63°C
Selisih Tm	≤ 5°C	1°C	1°C
<i>Hairpins</i>	$\Delta G \leq -3$ kcal/mol	-0,19 kcal/mol	-0,22 kcal/mol
<i>Self dimer</i>	$\Delta G \leq -6$ kcal/mol	-7,04 kcal/mol	-7,04 kcal/mol
<i>Cross dimer</i>	$\Delta G \leq -6$ kcal/mol	-7,04 kcal/mol	-7,04 kcal/mol



#### DAFTAR PUSTAKA

- 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 Simulation. *Indones. J. Chem.* 22(2): 515 - 525
- Borah, P. 2011. "Primer Designing for PCR." Colloquium faculty Science Vision 11: 134-136.
- Ding, L., Wang, Y., 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* 593: 1248–1256.
- Harmsen, M. M., and De Haard H. J. 2007. "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." *Appl Microbiol Biotechnol* 77:13–22.
- Kaushik, A., Vasudev, A., Arya, S.K., Pasha, S.K., Bhansali, S., 2014. Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application. *Biosens. Bioelectron.* 53, 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.09.060>
- Liu, R.R., Song, L.T., Meng, Y.J., Zhu, M., Zhai, H.L., 2019. Study on Biocompatibility of AuNPs and Theoretical Design of a Multi-CDR-Functional Nanobody. *J. Phys. Chem. B.* 123, 7570–7577. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05147>
- Maksum, I.P., Lestari, A., Fauzia, R.P., Rachman, S.D., and Soedjanaatmadja, U.M.S. 2019. "Escherichia coli BL21 (DE3) expression system using TorA signal peptide for recombinant human albumin (rHA) secretion." *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences.* 10(4): 3319–3324.
- Lucks, JB., Nelson, DR., Kudla, GR., Plotkin, JB. 2008. Genome Landscapes and Bacteriophage Codon Usage. *PLoS Comput Biol.* 4(2): e1000001.
- Muyldermans, S. 2013. "Nanobodies: natural single-domain antibodies." *Annual Review of Biochemistry* 82: 775–97.
- Sasmito, D.E.K., Kurniawan, R., Muhimmah, I. 2014. Karakteristik primer pada polymerase chain raction (PCR) untuk sekuensing DNA. *Mini Review SNIMed* 93-102.
- Septiari, I.G.A., Yustiantara, P.S., Yowani, S.C. 2015. Analisis Primer Untuk Amplifikasi Promoter Inha Multidrug Resistance Tuberculosis (MDR-Tb) Dengan Metode Polymerase Chain Reaction (PCR). *Jurnal Kimia* 9 (1): 117-123
- Thau L, Gandhi J, Sharma S. Physiology, Cortisol. [Updated 2021 Sep 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.