



Optimasi Waktu Induksi dalam Mengekspresikan Gen Proinsulin secara Intraseluler Menggunakan Inang *Pichia pastoris*

Induction Time Optimization of Intracellular Proinsulin Gene Expression Using Pichia pastoris as the Host

Efrida Martius^{1,*}, Febraska Laoditta², Dewi Yustika Sofia², Anis Herliyati Mahsunah¹

¹Balai Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Gedung 630,

²Universitas Surya,

Article History

Received : 5 November 2019

Approved : 13 Februari 2020

Published : 31 Maret 2020

Kata Kunci: Proinsulin, *Pichia pastoris*, Diabetes, Ekspresi, Intraseluler

Keywords: Proinsulin, *Pichia pastoris*, Diabetes, Expression, Intracellular.

Abstrak

Gen proinsulin telah berhasil diinsersi pada galur *Pichia pastoris* X33, GS115 dan KM71H pada penelitian sebelumnya, namun masih memerlukan optimasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ekspresi galur *P. pastoris* dan waktu induksi yang optimal dalam mengekspresikan proinsulin. Ekspresi proinsulin dilakukan pada suhu 20 °C selama 120 jam untuk pemilihan galur terbaik. Variasi lama induksi yang digunakan adalah 0, 24, 48, 72, 96, 120 dan 144 jam untuk mengetahui waktu induksi optimal. Kultur kemudian dilisis, dielektroforesis menggunakan *Tricine* SDS PAGE dan divisualisasikan dengan pewarnaan perak. Berdasarkan ketebalan pita yang terbentuk pada gel elektroforesis, galur X33-X2 menghasilkan proinsulin terbanyak dibandingkan GS115-G11 dan KM71H-K4. Ekspresi proinsulin optimal pada 120 jam dan mengalami penurunan proinsulin pada waktu induksi 144 jam akibat akumulasi metanol. Galur X33-X2 merupakan inang terbaik dan waktu induksi 120 jam merupakan waktu induksi optimal dalam mengekspresikan proinsulin secara intraseluler. Hasil ini diharapkan dapat menjadi referensi dalam mengembangkan produksi insulin di Indonesia.

Abstract

The proinsulin gene has been successfully inserted in the *Pichia pastoris* X33, GS115 and KM71H strains in former research, but still requires optimization. This research was conducted to determine the expression of *P. pastoris* strain and optimal induction time in expressing proinsulin. Proinsulin expression was carried out at 20°C at 120 hours induction time for strain selection. Various induction time, namely 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours were used to determine the optimal induction time. The culture was then lysed, electrophoresed using *Tricine* SDS PAGE and visualized with silver staining. The X33-X2 strain produces the most proinsulin compared to GS115-G11 and KM71H-K4 based on band thickness on electrophoresis gel. Optimal proinsulin expression at 120 hours and decreased proinsulin at 144 hours induction time due to methanol accumulation. The X33-X2 strain is the best host and the 120 hours induction time is the optimal induction time for expressing proinsulin intracellularly. This result is expected to be used as a reference in developing insulin production in Indonesia.

How to cite: Martius, E., Laoditta, F., Sofia, D.Y., & Mahsunah, A.H. (2020). Optimasi Waktu Induksi dalam Mengekspresikan Gen Proinsulin secara Intraseluler Menggunakan Inang *Pichia pastoris*. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*, 2(1), 26-35.



*Corresponding Author:

Jln. Kw. Puspipstek, Muncul, Serpong, Kota Tangerang Selatan, Banten 15314

E-mail: efrida.martius@bppt.go.id

e-ISSN 2655-9927

PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan kelainan metabolik akibat kurangnya sekresi insulin, rusaknya fungsi insulin atau keduanya yang ditandai dengan hiperglikemia (Kharroubi & Darwish, 2015). Total penderita diabetes di Indonesia mencapai lebih dari 10,2 juta pada tahun 2017 (IDF, 2018) dan diprediksi akan meningkat menjadi 21 juta penderita pada tahun 2030. Sebanyak 10-15% penderita diabetes membutuhkan insulin dalam menjaga kadar glukosa darah dan mencegah komplikasi, namun ketersediaan insulin di Indonesia terbatas (WHO, 2016). Kebutuhan insulin ini mendorong adanya produksi insulin. Produksi insulin pada tubuh manusia dimulai dari transkripsi mRNA preproinsulin dari nukleus menjadi preproinsulin, kemudian preproinsulin dipotong oleh enzim peptidase menjadi proinsulin (Tokarz *et al.*, 2018). Proinsulin yang telah terkonformasi menuju badan golgi untuk dipotong dan menghasilkan insulin dan peptida-C (Steiner *et al.*, 1972). Namun, karena adanya kelainan fungsi/produksi insulin dalam tubuh, hal ini mendorong adanya produksi insulin dilakukan dengan teknologi DNA rekombinan.

Goeddel *et al.* (1979) berhasil memproduksi insulin dengan menggabungkan rantai insulin-A dan insulin-B yang diproduksi oleh *Escherichia coli*. Produksi insulin dengan teknik lain juga dilakukan oleh Moore *et al.* (1983) yang berhasil mengintroduksi cDNA proinsulin pada sel sekresi hormon adenokortikotrofik (ACTH) untuk produksi proinsulin dan mengetahui mekanisme konversi proinsulin menjadi insulin. Penemuan ini memberikan kemudahan bagi industri farmasi dalam meningkatkan purifikasi insulin hasil ekstraksi dari hewan dan produksi insulin manusia (Philipson *et al.*, 2015). Produksi proinsulin dapat menggunakan berbagai inang, salah satunya adalah ragi *Pichia pastoris* yang mampu memproduksi protein heterologous tanpa hiperglikosilasi (Grinna & Tschopp, 1988). Selain itu, *P. pastoris* juga mampu memproduksi lebih dari 15 gram protein rekombinan dari 1 liter kultur secara intraseluler (Hasslacher *et al.*, 1997) sehingga dapat digunakan untuk produksi skala besar.

Pichia pastoris dikembangkan untuk menghasilkan protein rekombinan dengan sistem ekspresi yang menggunakan promotor kuat AOX1 (Cregg *et al.*, 1985). Promotor ini ditekan dengan keberadaan glukosa, gliserol dan etanol (Inan & Meagher, 2001). Akan tetapi, akan dilepaskan saat diinduksi metanol (Cregg *et al.*, 1985). Keberadaan

metanol mengaktivasi faktor transkripsi *methanol expression regulator 1* (Mxr1) yang berada di sitoplasma untuk masuk ke dalam nukleus dan berikatan dengan promotor AOX1 sehingga gen protein rekombinan dan gen AOX ditranskripsi (Zhan *et al.*, 2017). Enzim AOX mengoksidasi metanol menjadi formaldehida dan hidrogen peroksida. Formaldehida yang dihasilkan kemudian dioksidasi menjadi format dan karbon dioksida oleh dehidrogenase di sitoplasma sebagai sumber energi bagi sel untuk tumbuh (Cereghino & Cregg, 2000). Berdasarkan kemampuannya dalam memetabolisme metanol, *P. pastoris* dibedakan menjadi tiga jenis (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Mut⁺ merupakan fenotipe yang dapat tumbuh dalam metanol dengan laju perkembangan *wild-type* dan membutuhkan asupan metanol yang tinggi dalam fermentasi skala besar (Aoki *et al.*, 2003). Mut^s merupakan fenotipe yang lambat dalam memetabolisme metanol karena memiliki gen AOX1 yang terganggu, sehingga bergantung pada promotor AOX2 yang lebih lemah dalam memetabolisme metanol (Cregg *et al.*, 1987). Mut⁻ tidak mampu tumbuh dalam metanol karena tidak memiliki kedua promotor (Cregg *et al.*, 1987). Penelitian oleh Krainer *et al.* (2012) menyatakan bahwa fenotipe Mut^s lebih baik dalam mengekspresikan protein rekombinan berupa horseradish peroksidase C1A dibandingkan fenotipe Mut⁺ dalam produktivitas dan efisiensi ekspresi. Secara umum, fenotipe Mut⁺ memiliki pertumbuhan yang cepat sedangkan fenotipe Mut^s memiliki produktivitas yang lebih tinggi (Chirovulu *et al.*, 1997).

Pichia pastoris mampu mengekspresikan protein rekombinan secara intraseluler dan ekstraseluler (Invitrogen, 2010). Menurut Yin *et al.* (2012), *yield* protein intraseluler lebih banyak dibandingkan ekstraseluler. Ekspresi proinsulin intraseluler berhasil dilakukan Triyadi (2018) menggunakan *P. pastoris* galur X-33, GS115 dan KM71H. Galur *P. pastoris* yang menghasilkan proinsulin paling banyak adalah GS115 pada lama induksi 72 jam dan suhu 25°C menggunakan konsentrasi akhir metanol 0,5% (v/v). Menurut Cos *et al.* (2006) suhu rendah mampu meningkatkan produktivitas protein rekombinan sehingga menghasilkan protein rekombinan lebih banyak dibandingkan suhu tinggi. Oleh sebab itu, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui galur *P. pastoris* yang mampu mengekspresi proinsulin secara intraseluler paling banyak pada suhu 20 °C dan menentukan waktu induksi optimalnya.

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; autoklaf, cawan petri (90 x 15 mm), tips mikropipet, eppendorf 1,5 dan 2 ml, mikropipet 2-20 µl, mikropipet 20-200 µl, Mikropipet 100-1000 µl, tabung falkon, spatula, wadah timbang, neraca analitik, laminar UV, jarum ose, pipet ukur 25 ml, erlenmeyer 100 ml, pengaduk magnetik, *hotplate*, inkubator orbital, inkubator, inkubator goyang, spektrofotomer UV, kuvet spektrofotometer, botol schott 250 ml dan 500 ml, *High Speed Refrigerated Microcentrifuge*, gelas ukur 100 ml, vortex, perangkat SDS-PAGE, power SDS-PAGE, *ultrapure water system*, membran filter 0,2 µm, pemindai, pH meter, lemari pendingin, lemari pembeku, tabung reaksi, *plastic wrap*, suntikan syringe dan 0,5 mm *glass beads*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: ekstrak ragi (*HIMEDIA*), pepton teknis, d-glukosa (*Merck*), agar bakteri (*Oxoid*), asam klorida (HCl), dH₂O, zeocin (*Invitrogen*), gliserol (*Calbiochem*), amonium sulfat (*JT. Baker*), *yeast nitrogen* tanpa asam amino dan amonium sulfat (*JT. Baker*), biotin (*SIGMA*), metanol (*Merck*), l-histidin (*BIO BASIC Canada Inc.*), alkohol 70%, kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) (*JT. Baker*), dikalium fosfat (K₂HPO₄) (*EMSURE*), kasa, tali, kapas, aluminium foil (*Total Wrap*), tris (*AppliChem*), *tricine buffer* (*BIO BASIC CANADA, INC.*), SDS (*Bio Basic Inc.*), *coomasie brilliant blue-R250* (*Merck*), akrilamida (*Merck*), bis-akrilamida (*Promega, USA*), dithiothreitol (DTT) (*Promega, Kanada*), amonium persulfat (*Promega, USA*), fenilmetanasulfonil fluorida (PMSF) (*MP. Biomedicals, LLC., Paris*), asam etilenadiaminatetraasetat (EDTA) (*AppliChem*), sodium dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄) (*Merck*), disodium hidrogen fosfat (Na₂HPO₄) (*Merck*), DROW, air miliQ, tetrametietilendiamin (TEMED) (*Merck*), amonium hidrogen karbonat ((NH₄)₂CO₃) (*Merck*), etanol absolut (*Merck*), asam asetat glasial (*Merck*), natrium trisulfat (Na₂S₂O₃) (*JT. Baker*), perak nitrat (AgNO₃) (*Agu Cicca Reagent*), kalium karbonat (K₂CO₃) (*JT. Baker*), formalin 37%, β-mercaptoetanol (*MP. Biomedicals*), *coomasie protein assay reagent 950 ml* (*Thermo Scientific*).

Komposisi media yang digunakan digunakan adalah Yeast extract peptone dextrose medium (YPD) + Agar Zeocin = 1% ekstrak ragi (m/v), 2% pepton (m/v), 2% d-glukosa (m/v), 2% agar (m/v), 100ug/ml zeocin. *Buffered Glycerol-complex Medium* (BMGY) = 1% ekstrak ragi (m/v), 2% pepton (m/v), 100 mM kalium fosfat, pH 6,0 (v/v), 1, 34%

YNB (v/v), 4 x 10⁻⁵% biotin (v/v). BMM(H) (*Buffered minimal*) = 100 mM kalium fosfat, pH 6,0 (v/v), 1,34% YNB (v/v), 4 X 10⁻⁵% biotin (v/v), 0,5% metanol (v/v), 100 X H (v/v).

Komposisi larutan yang digunakan dalam fermentasi yaitu Gliserol 30% = 15 ml Gliserol 100% dalam 50 ml air. 1 M Kalium fosfat pH 6,0 = 9,5 gram KH₂PO₄ dan 5,25 gram K₂HPO₄ dalam 100 ml air, pH diatur dengan penambahan HCl. YNB 13,4% = 3,4 gram YNB tanpa amonium sulfat dan asam amino, dan 10 gram amonium sulfat dalam 100 ml air, filter steril. 0,02% biotin (500X B) = 20 mg biotin dalam 100ml air, filter steril. 100x H = 400 mg L-histidin dalam 100 ml air, filter steril

Buffer yang digunakan untuk lisis sel dan elektroforesis *Tricine* SDS-PAGE adalah *Breaking buffer* = 50 mM Sodium fosfat, pH 7,4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5% gliserol. 2x *Tricine Sample Buffer* = 150 mM Tris-HCl, pH 7,0, 30% gliserol, 12% SDS, 0,05% *Coomasie Brilliant Blue R-250*, 6% β-mercaptoetanol. Bufer Katoda 1 x = 0,1 M Tris, 0,1 M Trisin, 0,1% SDS. Bufer Anoda 10 x = 0,2 M Tris, HCl hingga pH 8,9. Bufer Gel 3x = 3 M Tris, 0,3% SDS, HCl hingga pH 8,45

Larutan yang diperlukan dalam elektroforesis *Tricine* SDS-PAGE sebagai berikut: Larutan AB-3 = 48 gram akrilamid dan 1,5 gram bis-akrilamid dalam 100 ml air miliQ. Larutan AB-6 = 46,5 gram akrilamid dan 3 gram bis-akrilamid dalam 100 ml air miliQ. Larutan Gliserol 50% = 30 ml gliserol 85% dalam 50 ml air miliQ. Larutan APS 10% = 0,1 gram amonium persulfat dalam 2 ml air miliQ. Larutan Fiksasi = 0,78 gram amonium asetat ditambah 50 ml metanol, 10 ml asam asetat dan 40 ml air miliQ. Larutan *Staining* = 0,05 gram *Coomasie Brilliant Blue R250* ditambah 20 ml asam asetat glasial dan 180 ml air miliQ. Larutan *Destaining* = 20 ml asam asetat glasial ditambah 180 ml air miliQ. Larutan Tris-HCl 0,5 M pH 7,0 = 6,057 gram tris ditambah 80 ml air dan diatur pH dengan HCl. Larutan Sodium fosfat 50 mM, pH 7,4 = 0,24 gram sodium fosfat (monobasic) dalam 40 ml air miliQ, diatur pH dengan NaOH

Larutan yang dibutuhkan dalam pewarnaan perak sebagai berikut: Larutan amonium hidrogen karbonat = 0,2 gram amonium hidrogen karbonat dalam 25 ml metanol dan 25 ml air miliQ. Larutan fiksasi 30% etanol, 10% asam asetat = 15 ml etanol absolut ditambah 5 ml asam asetat dan 30 ml air miliQ. Larutan bilas 30% etanol = 15 ml etanol absolut dalam 35 ml air miliQ. Larutan sensitasi 0,8 mM Na₂S₂O₃ = 0,0064 gram Na₂S₂O₃ dalam 50 ml air miliQ. Larutan 12 mM AgNO₃ = 0,1 gram

AgNO₃ dalam 50 ml air miliQ. Larutan *developer* 0,01% K₂CO₃, 10% Na₂S₂O₃, formalin = 1,5 gram K₂CO₃ 6,25 µl Na₂S₂O₃, 14 µl formalin 37% dalam 50 ml air miliQ. Larutan *stop* 4% tris, 2% HAc = 2 gram tris, 1 ml asam asetat glasial dalam 49 ml air miliQ.

Tahapan pertama dilakukan fermentasi galur *P. pastoris* berupa X33 koloni 2 (X33-X2), GS115 koloni 11 (GS115-G11) dan KM71H koloni 4 (KM71H-K4) yang berasal dari stok kultur BPPT diregenerasi dengan menggoreskan pada media padat *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD) yang mengandung antibiotik zeocin dan diinkubasi selama 48 jam. Koloni tunggal dikultivasi dalam media kultivasi *Buffered Glycerol-complex* (BMGY) dan diinkubasi dengan suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm selama 16-18 jam. Setelah itu, biomassa *P. pastoris* diukur dengan spektrofotometer pada absorbansi 600 nm hingga mencapai nilai 2-6. Kultur dipindahkan ke dalam tabung falkon steril dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 g selama 5 menit pada suhu 4 °C, supernatan dibuang dan pelet dipindahkan ke media ekspresi *Buffered Minimal* (BMM(H)). Setelah itu, kultur ditambahkan metanol hingga mencapai konsentrasi akhir 0,5% (v/v) dalam media setiap 24 jam pada suhu 20 °C. Setelah 120 jam, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 12.000g selama 5 menit pada suhu 4 °C, supernatan dibuang dan pelet disimpan.

Pelet ditambahkan *Breaking Buffer* dengan perbandingan 1:1 (berat pelet: volume *breaking buffer*) dan diresuspensi. Setelah itu, ditambahkan *glass beads* dengan perbandingan 1:1 (berat pelet : berat *glass beads*) dan divorteks dengan 12.000 g selama 30 detik. Lalu, diinkubasi selama 30 detik dalam es dan dilakukan 8x pengulangan. Hasil resuspensi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 10 menit dan supernatan dipisahkan. Supernatan ditambahkan dengan 2x *Tricine Sample Buffer* dengan perbandingan 1:3 dan diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 37 °C selama 15 menit. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam sumur gel SDS-PAGE dan elektroforesis dijalankan dengan tegangan 30 volt selama 1 jam, selanjutnya dengan tegangan 90 volt hingga mencapai batas akhir. Setelah itu, gel diinkubasi dalam larutan fiksasi selama 1 jam, dalam larutan *staining* selama 1 jam, dan *destaining* hingga gel menjadi bening.

Gel yang telah diwarnai dibilas terlebih dahulu dengan air miliQ selama 5 menit dan dilakukan 2 kali pengulangan. Kemudian direndam dalam larutan 50 mM amonium hidrogen karbonat selama

45 menit dan dibilas dengan air miliQ selama 2 x 5 menit. Setelah itu, gel direndam dalam larutan fiksasi selama 30 menit, diinkubasi dengan larutan 30% (v/v) etanol selama 2 x 10 menit dan dibilas dengan air miliQ selama 2 x 10 menit. Selanjutnya, gel diinkubasi dalam 0,8 mM selama 1 menit dan dibilas kembali dengan air miliQ selama 2 x 1 menit. Gel kemudian diinkubasi dengan larutan 12 mM AgNO₃ selama 20 menit dan dibilas dengan air miliQ selama 10 detik. Setelah itu, gel diinkubasi dalam larutan *developer* dengan penambahan formalin hingga kontras warna yang diinginkan. Kemudian gel dibilas dengan air miliQ selama 10 detik. Pewarnaan gel dihentikan dengan perendaman dalam larutan *stop* selama 30 menit dan dibilas dengan air miliQ selama 2 x 30 menit.

Nilai Rf digunakan untuk menghitung bobot molekul dengan membandingkan kurva linear antara nilai Rf terhadap log bobot molekul. Perhitungan nilai Rf adalah sebagai berikut.

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak pita dengan batas atas gel SDS}}{\text{Jarak seluruh gel SDS}}$$

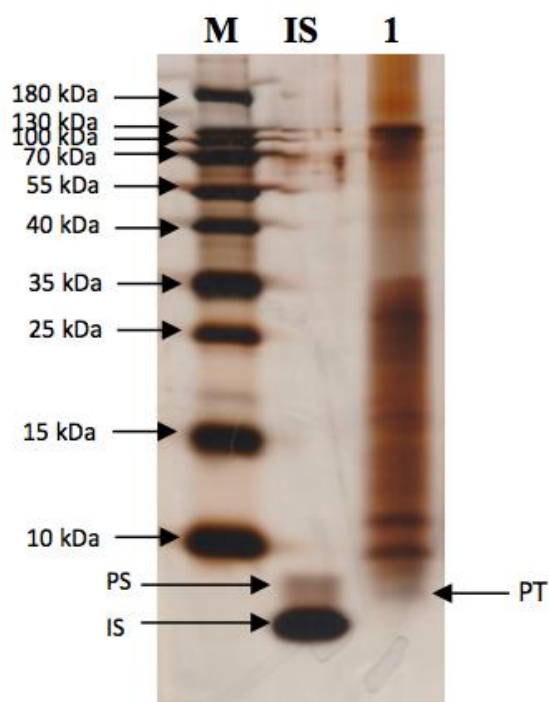
Setelah nilai Rf diplot dengan log berat molekul marka protein dan didapatkan persamaan, nilai Rf pita target dihitung berdasarkan persamaan tersebut sehingga mendapatkan nilai log berat molekul protein target. Antilog nilai tersebut merupakan berat molekul protein target.

Hasil *scan* dari gel SDS-PAGE dengan format .jpeg dikuantifikasi menggunakan program ImageJ 1.51j8 dengan memotong gambar yang melingkupi daerah pita yang diinginkan dengan fitur *rectangular selection* kemudian mengklik *crop*. Area yang diseleksi dianalisis dengan mengklik *Analyze* dan diulangi hingga seluruh pita dianalisis sehingga akan muncul beberapa plot secara bersusun. Pada masing-masing plot terdapat garis yang menggambarkan *peak* sehingga ditarik garis antara pangkal awal dan pangkal ujung menggunakan *straight line*. Setelah itu, area dalam *peak* dihitung menggunakan *wand (tracing) tool* dan kotak *Result* akan muncul menggambarkan luas area pita yang diseleksi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil visualisasi insulin standar menunjukkan adanya 2 pita, seperti pada Gambar 1. Pada penelitian ini, insulin standar yang digunakan merupakan produk komersial Humulin Eli Lilly. Insulin manusia dengan rumus empiris C₂₅₇H₃₈₃N₆₂O₇₇S₆ memiliki bobot molekul 5808 Da (Lilly, 2018). Pita yang lebih tipis di atas insulin

standar merupakan proinsulin standar karena mengandung jumlah yang lebih sedikit dibandingkan insulin standar. Regulasi FDA memperbolehkan insulin komersial untuk mengandung kurang dari 10 ppm proinsulin dan residu lain yang berkaitan dengan insulin (Bohannon, 1983). Menurut Binder *et al.* (1996), insulin manusia komersial telah bebas dari kontaminan residu, namun dapat mengandung <1 ppm atau 1 mg/L proinsulin. Oleh karena itu, pita yang terbentuk di atas insulin standar merupakan proinsulin standar. Penggunaan pewarnaan perak yang dapat mendeteksi protein dalam jumlah nanogram juga dapat memvisualisasikan proinsulin dengan kadar rendah.



Gambar 1. Visualisasi protein target. M= marka protein 10-180 kDa, IS= standar insulin, 1= Galur X33-X2, PT = proinsulin target. Hasil fermentasi *P. pastoris* X33-X2 pada suhu ekspresi 20 °C, metanol 0,5% setiap 24 jam sekali selama 120 jam. Pita PT terdapat di antara pita marka protein 10 kDa dan insulin standar 5808 Da.

Hasil perhitungan BM proinsulin standar (PS), insulin standar (IS) dan proinsulin target (PT) ditunjukkan pada Tabel 1. Nilai Rf pita PT dimasukkan dalam persamaan dan BM yang dihasilkan adalah 6761 Da. Pita PT berada di antara PS dan IS. IS memiliki BM 5808 Da secara teoretis, akan tetapi hasil dengan perbandingan nilai Rf adalah 6165 Da. Perbedaan perhitungan ini dapat terjadi karena pita IS dan pita target berada di luar

marka 10-70 kDa. Perhitungan BM menjadi akurat apabila sampel protein berada pada jarak linear dari kurva standar. Kesalahan perhitungan sebesar $\pm 10\%$ dapat diterima (Matsumoto *et al.*, 2018).

Tabel 1. Bobot molekul proinsulin dan insulin standar (PS dan IS) serta protein target (PT) hasil fermentasi *P. pastoris* X22-X3 berdasarkan Nilai Rf

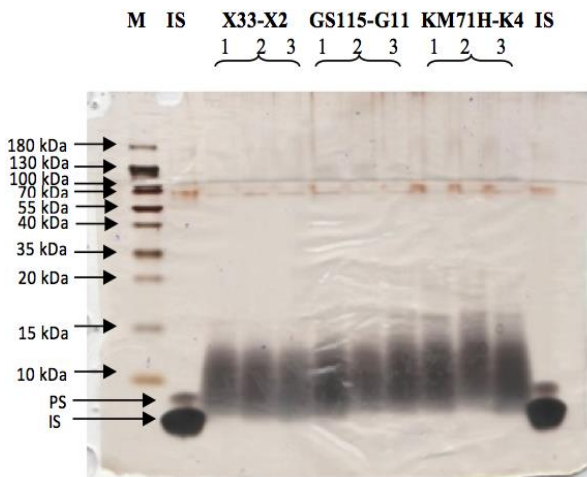
	PS	IS	PT
Nilai Rf	0,76	0,80	0,77
BM (Da)	7079	6165	6761

$R^2 = 0.989$. PS= proinsulin standar, IS= insulin standar, PT= proinsulin target. Nilai Rf terhadap bobot molekul PS, IS dan PT pada gel Gambar 4.3. dan memiliki kesalahan perhitungan $\leq 10\%$.

Ketidaksamaan BM pita PT dan PS dapat terjadi akibat variasi antar protein, seperti struktur protein, perbedaan hasil pascatranslasi dan komposisi asam amino yang mempengaruhi migrasi elektroforesis (Zahid *et al.*, 2014). Selain itu, jenis produksi PS juga tidak diketahui, seperti ekspresi ekstraseluler atau intraseluler dan bagaimana urutan sekuen yang digunakan. Protein ekstraseluler memiliki komposisi yang lebih kompleks daripada intraseluler untuk menghalangi proses pelipatan protein karena protein yang disekresi harus dalam bentuk belum dilipat. Polipeptida hidrofobik dan bermuatan kecil pada protein ekstraseluler memudahkan protein untuk transpor keluar membran (Nakashima & Nishikawa, 1994). Komposisi yang lebih kompleks dapat menyebabkan protein yang dihasilkan secara ekstraseluler memiliki BM lebih tinggi dibandingkan intraseluler. Urutan sekuen yang tidak mengikuti Gurramkonda *et al.* (2010) mempengaruhi asam amino yang dihasilkan sehingga BM yang dihasilkan tidak sama.

Pemilihan galur *P. pastoris* dilakukan pada suhu 20 °C dengan induksi metanol 0,5% (v/v) setiap 24 jam sekali dengan waktu induksi 120 jam. Pada suhu 20 °C, pita paling bawah dapat dihasilkan oleh seluruh inang *Pichia pastoris* X33-X2, GS115-G11, dan KM71H-K4. Visualisasi proinsulin hasil ekspresi *P. pastoris* X33-X2, GS115-G11 dan KM71H-K4 dapat dilihat pada Gambar 2. Pita yang terbentuk memiliki ketebalan yang berbeda-beda antara satu dengan yang lain. Akan tetapi, setelah dicermati, X33-X2 menghasilkan pita dengan ketebalan yang serupa pada tiga perlakuan, dibandingkan pada GS115-G11 dan KM711H-K4 yang memiliki ketebalan yang tidak sama pada tiga

perlakuan. Hasil yang konstan ini menandakan bahwa kemampuan ekspresi X33-X2 konsisten, sedangkan kemampuan ekspresi GS115-G11 dan KM71H-K4 berbeda-beda. Pita yang terbentuk juga tidak memiliki letak yang sejajar, hal ini dapat terjadi akibat adanya “doublet” yang mengindikasikan adanya polipeptida dengan asam amino yang sama namun memiliki residu berlebih atau berbeda posisi, seperti isoform (Caprette, 2005). Modifikasi pasca translasi akibat fosforilasi atau glikosilasi mampu menambahkan komposisi asam amino sehingga dapat menambah BM protein target sehingga letak yang dihasilkan lebih tinggi daripada BM teoritis.



Gambar 2. Visualisasi hasil ekspresi proinsulin *P. pastoris* X33-X2, GS115-G11 dan KM71H-K4 secara intraseluler pada Suhu 20 °C. Ekspresi proinsulin dilakukan dalam media BMM(H) pada suhu 20 °C dengan induksi metanol 0,5% setiap 24 jam selama 120 jam. Seluruh inang menghasilkan pita proinsulin target. X33-X2 menghasilkan ketebalan pita yang konstan dengan 3 pengulangan. Pita yang dihasilkan tidak sejajar akibat konsentrasi proinsulin atau adanya modifikasi pasca translasi sehingga bobot molekul berbeda

Nilai Rf marka kemudian dibandingkan dengan log BM marka dan menghasilkan persamaan $y = -1,709x + 2,288$ dengan $R^2 = 0,987$ dan hasil perhitungan BM terdapat pada Tabel 2. Nilai Rf pita marka dihitung menggunakan batas bawah pita karena pita PT tidak terbentuk sempurna (menjadi sebuah pita) melainkan menempel dengan protein lain di atasnya. Pita paling bawah yang dihasilkan *P. pastoris* X33-X2, GS115-G11 dan KM71H-K4 berada di antara pita PS dan IS, sehingga menandakan bahwa pita tersebut merupakan pita PT yang dihasilkan secara intraseluler. Akan tetapi,

perhitungan nilai Rf pita paling bawah masing-masing galur menghasilkan BM yang berbeda.

Tabel 2. Bobot molekul PT Hasil Ekspresi seluruh inang *P. pastoris* pada suhu 20 °C berdasarkan Nilai Rf

Sampel/Kolom	Nilai Rf	BM (Da)
PS	0,82	7762
IS	0,9	5623
X33-X2/1	0,85	6760
X33-X2/2	0,86	6606
X33-X2/3	0,86	6606
GS115-G11/1	0,85	6760
GS115-G11/2	0,84	7079
GS115-G11/3	0,84	7079
KM71H-K4/1	0,84	7079
KM71H-K4/2	0,83	7413
KM71H-K4/3	0,85	6918

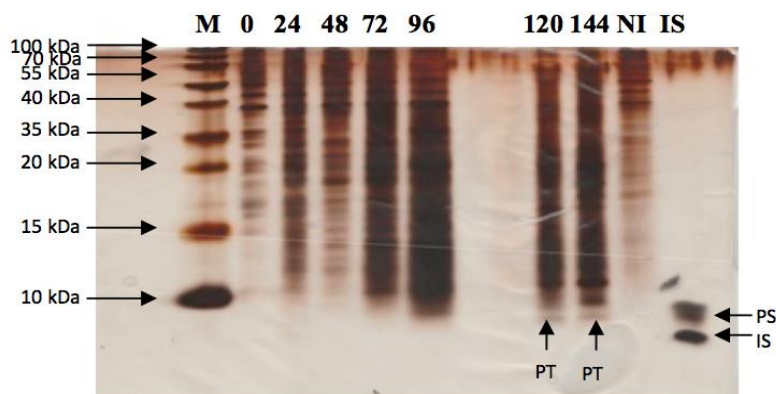
$R^2 = 0,987$. Nilai Rf terhadap BM proinsulin standar (PS), insulin standar (IS) dan proinsulin target (PT) pada gel Gambar 3. PT seluruh galur berada di antara PS dan IS. Proinsulin target X33-X2 pengulangan 1-3 dan GS115-G11 pengulangan 1 memiliki kesalahan perhitungan $\leq 10\%$, sedangkan proinsulin target lainnya memiliki kesalahan perhitungan $> 10\%$. Perbedaan BM dapat disebabkan adanya “doublet” berupa isoform proinsulin.

Ketebalan pita yang dianalisis menggunakan ImageJ menghasilkan data luas area, ditunjukkan pada Tabel 3. X33-X2 memiliki rata-rata luas area yang paling tinggi dibandingkan GS115-G11 dan KM71H-K4. Ketebalan pita proinsulin X33-X2 terlihat konsisten dibandingkan GS115-G11 dan KM71H-K4. Oleh sebab itu, X33-X2 merupakan inang yang paling baik dalam menghasilkan proinsulin pada suhu ekspresi 20 °C.

Optimasi waktu induksi dilakukan menggunakan inang *P. pastoris* X33-X2 sebagai inang terpilih pada suhu ekspresi 20 °C dalam menghasilkan proinsulin. Ekspresi proinsulin dilihat berdasarkan pita paling bawah (PT) yang tervisualisasi pada gel, seperti pada Gambar 3. Ekspresi proinsulin tidak terlihat pada 0 jam hingga 96 jam, namun terlihat ada penambahan variasi protein dan jumlah protein yang dihasilkan. Konsentrasi protein total yang digunakan saat elektroforesis telah disamakan, oleh sebab itu adanya pita yang lebih tebal dapat disebabkan variasi protein yang terekspresi seperti isoform atau protein dengan BM yang hampir sama.

Tabel 3. Rata-rata luas area pemilihan inang menggunakan ImageJ

Galur/Kolom	Luas Area	Rata-rata Luas Area
X33-X2/1	2171.945	
X33-X2/2	5237.011	
X33-X2/3	3522.576	3643.844
GS115-G11/1	4934.153	
GS115-G11/2	2973.271	
GS115-G11/3	835.137	2914.187
KM71H-K4/1	1726.17	
KM71H-K4/2	1103.158	
KM71H-K4/3	5594.789	2808.039



Gambar 3. Optimasi lama induksi dari *P. pastoris* X33-X2 pada Suhu Ekspresi 20 °C. Keterangan gambar (kiri-kanan) M; marker, 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam, NI= X33-X2 non induksi, IS= insulin standar. PS= proinsulin standar, PT= proinsulin target. Ekspresi dilakukan menggunakan media BMM dengan induksi metanol 0,5% setiap 24 jam selama 120 jam. Ekspresi proinsulin mulai terlihat pada lama induksi 120 jam dan 144 jam seperti ditunjukkan pada tanda panah ke atas.

Tabel 4. Bobot molekul proinsulin target hasil ekspresi inang *P. pastoris* X33-X2 pada suhu 20 °C lama induksi 120 Jam dan 144 Jam berdasarkan Nilai Rf

	PS	IS	PT
Nilai Rf	0.72	0.80	0.77
BM (Da)	7585	5754	6456

$R^2 = 0,962$. Nilai Rf terhadap BM proinsulin standar (PS), insulin standar (IS) dan proinsulin target (PT). PT berada di antara PS dan IS. Kesalahan perhitungan $\leq 10\%$ dari BM teoritis menandakan hasil dapat diterima.

Ekspresi proinsulin mulai terlihat pada lama induksi 120 jam dan 144 jam. Pita PT pada 120 jam dan 144 jam terbentuk sempurna (tidak menempel pada protein lain) dan ketebalan pita PT terlihat seragam. Oleh sebab itu, ketebalan pita diukur berdasarkan luas area yang dihitung menggunakan *software* ImageJ. Pita yang terpisah memudahkan dalam melihat ketebalan pita dengan *software* ImageJ dalam melihat *peak* pita.

Keberadaan pita dianalisis dengan memasukkan nilai Rf pada persamaan $y = -1,413x + 1,900$ dengan $R^2 = 0,962$, hasil perbandingan nilai Rf dengan log BM marka protein. Setelah itu, BM pita yang merupakan PT ditunjukkan pada Tabel 4. Pita paling bawah dari hasil ekspresi *P. pastoris* X33-X2

pada lama induksi 120 jam dan 144 jam (6456 Da) berada di antara PS dan IS. Hal ini menandakan bahwa pita tersebut merupakan pita PT. Selain itu, kesalahan perhitungan $\leq 10\%$ dari BM teoritis juga menandakan bahwa hasil ini dapat diterima.

Dalam menentukan lama induksi optimal, ketebalan pita dianalisis menggunakan *software* ImageJ berdasarkan luas area dari pita target seperti pada Tabel 5. Pita PT dengan lama induksi 120 jam memiliki luas area yang lebih tinggi dibandingkan 144 jam. Proinsulin mulai terekspresi pada lama induksi 120 jam dan menghasilkan pita yang paling tebal sehingga merupakan lama induksi yang optimal pada suhu 20°C. Fermentasi dengan inang *P. pastoris* fenotipe mut^s pada umumnya untuk

mencapai konsentrasi protein rekombinan tinggi membutuhkan waktu yang lama, 150-200 jam (Vassileva *et al.*, 2001). Mut^s memiliki tingkat konsumsi metanol dan pertumbuhan yang rendah sehingga membutuhkan waktu induksi yang panjang (Zhang *et al.*, 2003).

Tabel 5. Hasil perhitungan luas area yang terbentuk pada 120 jam dan 144 jam berdasarkan ImageJ

Pita	Luas Area
120 jam	3617.530
144 jam	3178.045

Keberadaan gliserol pada medium BMGY menekan promotor AOX1 untuk tidak mentranskripsi gen proinsulin. Sisa gliserol dalam sel saat dipindahkan ke medium ekspresi BMM membuat promotor AOX1 tertekan, namun seiring berjalannya waktu, ketidakberadaan gliserol dalam medium membuat sel harus beradaptasi dengan metanol (Chauhan *et al.*, 1999).

Mut^s memetabolisme metanol dengan lambat karena memiliki gen AOX1 yang terganggu, sehingga bergantung pada promotor AOX2 yang lebih lemah dalam memetabolisme metanol (Cregg *et al.*, 1987). Ekspresi proinsulin menjadi rendah saat 144 jam dapat disebabkan akumulasi metanol yang masih tersisa sehingga menjadi toksik pada sel dan mendegradasi proinsulin yang ada. Metanol dioksidasi menjadi formaldehida dan metanol peroksida oleh enzim AOX (Cereghino & Cregg, 2000). Hidrogen peroksida menghasilkan stress oksidatif pada sel dan dapat memicu degradasi protein rekombinan (Hilt & Wolf, 1992).

SIMPULAN

Inang *P. pastoris* X33-X2 merupakan inang yang mampu menghasilkan proinsulin secara intraseluler paling banyak dibandingkan GS115-G11 dan KM71H-K4 pada suhu 20°C. Ekspresi proinsulin optimal pada waktu induksi 120 jam. Waktu induksi yang panjang akibat aktivitas metabolik inang rendah sehingga kemampuan dalam memetabolisme metanol dan produksi protein rekombinan rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Balai Bioteknologi BPPT karena telah menyediakan tempat dan topik penelitian. Kepada Bapak Danang, Ibu Uli, Kakak Titin atas dukungan moral dan penyedia informasi berkaitan pengerjaan penelitian. Walbert Christian sebagai partner kerja laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Aoki, H., Watabe, S., & Ahsan, N. (2003). Heterologous expression in *Pichia pastoris* and single-step purification of a cysteine proteinase from northern shrimp. *Protein Expression and Purification*, 31(2), 213-221. doi: 10.1016/s1046-5928(03)00196-7
- Bohannon, N. J. V. (1983). Newer Forms of Insulin. *The Western Journal of Medicine*, 139(1), 115-116. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1010916/>.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.
- Chauhan, A. K., Arora, D., & Khanna, N. (1999). A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 34(2), 139-145. Diakses dari <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302911699>.
- Cos, O., Ramon, R., Montesinos, J.L., & Valero F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*, 5(17), 1-20. doi: 10.1186/1475-2859-5-17
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3376-3385. doi: 10.1128/mcb.5.12.3376.
- Cregg, J. M., Tschopp, J. F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W. S., Buckholz, R. G., Madden, K. R., Kellaris, P. A., & Davis, G. R. (1987). High-Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis-B Surface-Antigen in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 5, 479-485. Diakses dari <https://www.nature.com/articles/nbt0587-479>.
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M., Meagher, M. M. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. *Enzyme and Microbiology Technology*, 21(4), 277-283. doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00042-2).
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., & Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of*

- Science*, 76(1), 106-110. doi: 10.1073/pnas.76.1.106
- Grinna, L. S., & Tschopp, J. F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 5(2), 107-115. doi: 10.1002/yea.320050206.
- Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*, 9(31), 1-11. doi: 10.1186/1475-2859-9-31.
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S. D., & Schwab, H. (1997). High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expression Purification*, 11(1), 61-71. doi: 10.1006/prep.1997.0765.
- Hilt, W., & Wolf, D. H. (1992). Stress induced proteolysis in yeast. *Molecular Microbiology*, 6(17), 2437-2442. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01419.x>.
- International Diabetes Federation (IDF). (2018). IDF Western Pasific Members. Diakses pada 23 November 2018. <https://www.idf.org>.
- Inan, M., & Meagher, M. M. (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 585-589. doi: 10.1016/S1389-1723(01)80321-2
- Invitrogen. (2010). *EasySelect™ Pichia Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in Pichia pastoris*. Thermo Scientific.
- Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal Diabetes*, 6(6), 850-867. doi: 10.4239/wjd.v6.i6.850.
- Kraimer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O., & Glieder, A. (2012). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbiology Cell Factories*, 11(22), 1-14. doi: 10.1186/1475-2859-11-22.
- Lilly, E. (2018). *Humulin*. Eli Lilly and Company: Indianapolis.
- Matsumoto, H., Hanlu, H., & Komori, N. (2018). Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Electrophoretic Separation of Proteins*, 1855, 101-105. Diakses dari https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-8793-1_10.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270. doi: 10.1002/yea.1208
- Moore, H. H., Walker, M. D., Lee, F., Kelly, R. B. 1983. Expressing a Human Proinsulin cDNA in a Mouse ACTH-Secreting Cell. Intracellular Storage, Proteolytic Processing, and Secretion on Stimulation. *Cell*, 35(2), 531-538. doi: 10.1016/0092-8674(83)90187-3.
- Nakashima, H., & Nishikawa, K. (1994). Discrimination of Intracellular and Extracellular Proteins Using Amino Acid Composition and Residue-pair Frequencies. *Journal Molecular Biology*, 238(1), 54-61. Diakses dari <https://www.jsbi.org/pdfs/journal1/GIW94/Poster/GIW94P18.pdf>.
- Philipson, L. H., Bell, G., & Polonsky, K. S. (2015). Donald F. Steiner MD, 1930-2014: Discoverer of proinsulin. *Restropective*, 112(4), 940-941. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1423774112>.
- Steiner, D. F., Peterson, J. D., Tager, H., Emdin, S., Ostberg, & Y. Falkmer, S. 1973. Comparative Aspects of Proinsulin and Insulin Structure and Biosynthesis. *Integrative and Comparative Biology*, 13(3), 591-604. doi: <https://doi.org/10.1093/icb/13.3.591>.
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., Klip, A. 2018. The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2273-2289. doi: 10.1083/jcb.201802095.
- Martius, E., Triyadi, A., Yustika D., & Mahsunah, A. H. (2019). *Pengaruh Variasi Konsentrasi Metanol dan Lama Induksi terhadap Ekspresi Proinsulin oleh Pichia pastoris secara Intraseluler*. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia* 6(1): 93-105. Doi: <http://dx.doi.org/10.29122/jbbi.v6i1.3176>
- Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2001). Effect of Copy Number on the Expression Levels of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 21(1), 71-80. doi: 10.1006/prep.2000.1335.
- World Health Organization (WHO). (2016). *Global Report on Diabetes*. WHO: Geneva.
- Yin, H., Liu, Z., Zhang, A., Zhang, T., Luo, J., Shen, J., Chen, L., Zhou, B., Fu, X., Fu, C., & Zhang, Z. (2012). Intracellular expression and purification of the Canstatin-N protein in *Pichia pastoris*. *Gene*, 504(1): 122-126. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.073.
- Zahid, A., Jamil, W., & Begum, R. (2014). Method Development and Validation of SDS-PAGE for Quality Control Testing of Pegylated Interferon Alpha-2a. *IOSR Journal of Pharmacy*

- and Biological Sciences*, 9(6), 32-36. doi: 10.9790/3008-09643236.
- Zhan, C., Yang, Y., Zhang, Z., Li, X., Liu, X., & Bai, Z. (2017). Transcription factor Mxr1 promotes the expression of Aox1 by repressing glycerol transporter 1 in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*, 17(4), 1-10. doi: 10.1093/femsyr/fox015.
- Zhang W. H., Potter K. J. H., Plantz B. A., Schlegel V. L., Smith L. A., & Meagher M. M. (2003). *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 210-215. doi: 10.1007/s10295-003-0035-3.