



## **PENGARUH VARIASI KONSENTRASI METANOL DAN LAMA INDUKSI TERHADAP EKSPRESI PROINSULIN OLEH *Pichia pastoris* SECARA INTRASELULER**

### **The Effects of Variation in Methanol Concentration and Induction Time on Intracellular Proinsulin Expression by *Pichia pastoris***

**Efrida Martius<sup>1,\*</sup>, Andree Triyadi<sup>2</sup>, Dewi Yustika<sup>2</sup>, Anis Herliyanti Mahsunah<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Balai Bioteknologi, BPPT, Gedung 630 Kawasan Puspiptek, Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

<sup>2</sup>Universitas Surya, Grand Serpong Mall Lt. 1 unit F8 & F9, Jl. M.H. Thamrin Km 2.7, Panunggangan Utara, Pinang, Kota Tangerang, Banten 15143

\*Email: [efrida.martius@bppt.go.id](mailto:efrida.martius@bppt.go.id)

#### **ABSTRACT**

*Diabetes is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia. There were 215 million diabetic patients in 2014 and the number is expected to rise in 2040. Generally, insulin is used to treat diabetic patients. Insulin production by recombinant technology has been done, though still inefficient, by using *E. coli* and *S. cerevisiae* expression system. Another alternative expression system is methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In this research, proinsulin has been expressed by *P. pastoris* intracellularly. *P. pastoris* strains used in this research were X33, GS115, and KM71H. All recombinant strains were Mut<sup>S</sup>. Best cultivation media was BMGY. Proinsulin expression was observed at 25°C. *Pichia pastoris* strain that expressed proinsulin best was GS115-PI. It was supported by PCR in which the strain GS115-PI gave 504 bp-sized bands. Based on proinsulin formation time, the final methanol concentration of 0.5% in 72 hours was found to be the best treatment.*

**Keywords:** BMGY, methanol, phenotype, *Pichia pastoris*, proinsulin

#### **ABSTRAK**

Diabetes melitus merupakan kelainan yang ditandai dengan hiperglikemia. Penderita diabetes pada tahun 2014 di dunia mencapai 215 juta dan diperkirakan akan meningkat pada tahun 2040. Umumnya penderita diabetes diberi pengobatan insulin sehingga menunjukkan akan ada peningkatan kebutuhan insulin. Produksi insulin dengan teknologi DNA rekombinan telah dilakukan dengan menggunakan sistem ekspresi *E. coli* dan *S. cerevisiae* namun masih belum efisien. Sistem alternatif lain adalah ragi metilotropik *Pichia pastoris*. Dalam penelitian ini dilakukan ekspresi proinsulin dari *P. pastoris* secara intraseluler. Galur *P. pastoris* yang digunakan dalam penelitian ini adalah X33, GS115, dan KM71H. Semua galur rekombinan adalah Mut<sup>S</sup>. Media tumbuh terbaik adalah BMGY. Ekspresi proinsulin terlihat pada suhu 25°C. Hasil PCR menunjukkan bahwa galur GS115-PI yang dapat menghasilkan pita ampikon berukuran 504 bp. Hasil PCR ini dibuktikan oleh hasil seleksi galur yang menunjukkan bahwa galur GS115-PI dapat mengekspresi proinsulin dibandingkan galur lainnya. Berdasarkan kecepatan pembentukan pita protein proinsulin, variasi konsentrasi akhir metanol 0,5% dengan lama induksi 72 jam merupakan perlakuan terbaik.

**Kata Kunci:** BMGY, fenotipe, metanol, *Pichia pastoris*, proinsulin

## PENDAHULUAN

Diabetes mellitus merupakan suatu kelainan metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia karena tidak adanya atau rendahnya kadar insulin dalam tubuh (Baeshen et al. 2016). Diabetes mellitus umumnya dibagi menjadi dua tipe yaitu tipe I dan tipe II. Tipe I disebabkan rendahnya produksi insulin dari tubuh, sedangkan tipe II disebabkan tubuh tidak dapat menggunakan insulin yang dihasilkan (WHO 2016). Berdasarkan perkiraan *International Diabetes Federation* (IDF 2015), prevalensi diabetes di dunia sebesar 415 juta jiwa dan di Indonesia sebesar 10 juta jiwa. Indonesia sendiri berada pada posisi ke tujuh setelah China, India, Amerika Serikat, Brazil, Rusia, dan Meksiko. Berdasarkan perkiraan IDF, angka penderita diabetes akan semakin meningkat sehingga jumlah penderita diabetes mencapai 642 juta jiwa pada tahun 2040. Akibatnya posisi Indonesia diperkirakan akan naik ke posisi enam. Secara umum penderita diabetes diobati dengan insulin sehingga keperluan insulin akan semakin meningkat.

Insulin merupakan hormon sepanjang 51 asam amino yang diproduksi oleh sel  $\beta$  pankreas. Hormon ini berfungsi dalam pengaturan metabolisme gula darah (Gurramkonda et al. 2010). Pada awalnya insulin diproduksi dari pankreas hewan, namun insulin yang dihasilkan dari hewan mengakibatkan komplikasi. Sehingga metode produksi diganti ke rekayasa produksi analog insulin (Quainzon dan Cheikh 2012). Umumnya prekursor insulin (proinsulin) telah diekspresikan melalui *E. coli* atau *S. cerevisiae*. Meskipun *E. coli* memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat, protein yang dihasilkan akan membentuk badan inklusi sehingga perlu dilakukan solubilisasi dan pelipatan ulang (Polez et al. 2016). Prekursor insulin larut yang dihasilkan dari *S. cerevisiae* dapat disekresi ke dalam supernatan (Gurramkonda et al. 2010). Namun protein yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* mengalami hiperglikosilasi berlebih. Selain itu, protein terglykosilasi dari *S. cerevisiae* memiliki ikatan  $\alpha$ 1,3 glikan yang bersifat hiperantigenik. Akibatnya, protein tersebut tidak terlalu cocok untuk diaplikasikan sebagai senyawa terapeutik ke manusia (Baeshen et al. 2016).

*Pichia pastoris* merupakan sistem ekspresi alternatif yang menjanjikan. *P. pastoris* merupakan ragi metilotropik yang dapat menggunakan metanol sebagai sumber karbon (Shen et al. 2016). Ragi ini memiliki beberapa keuntungan seperti: dapat mencapai densitas sel yang tinggi, kultur medium yang murah, memiliki promoter AOX1 yang berkontribusi dalam kualitas serta kuantitas protein yang dihasilkan (Baeshen et al. 2014). *P. pastoris* berpotensi untuk memproduksi protein rekombinan prokariot atau eukariot yang diproses dengan benar (secara intraseluler maupun ekstraseluler) (Looser et al. 2015), serta protein yang dihasilkan oleh *P. pastoris* tidak mengalami glikosilasi berlebih sehingga protein tersebut lebih mirip struktur protein eukariot tinggi (Baeshen et al. 2016). Pada umumnya terdapat tiga galur *P. pastoris* yang digunakan dalam produksi protein rekombinan yaitu X33, GS115, dan KM71H (Ahmad et al. 2014; Sturmberger et al. 2016; Safder et al. 2018).

*P. pastoris* telah digunakan untuk mengekspresi beragam protein seperti insulin, gen *lysozyme*, dan pleucidin cDNA (Baeshen et al. 2016; Samalla 2015). Penelitian tentang ekspresi proinsulin secara ekstraseluler dari *P. pastoris* juga telah dilakukan dengan hasil yang memuaskan. Hasil penelitian dari Baeshen et al. (2016) menunjukkan ekspresi proinsulin secara ekstraseluler sebanyak 5 mg/L dengan volume kultivasi sebanyak 25 mL. Ekspresi protein secara intraseluler mempunyai keunggulan berupa hasil produksi protein lebih tinggi dibanding ekspresi secara ekstraseluler karena protein akan terhindar dari hidrolisis oleh produk metabolik sel seperti enzim proteolitik (Yin et al. 2012). Metanol sebagai sumber karbon yang digunakan untuk menginduksi ekspresi proinsulin dari *P. pastoris* (Vanz et al. 2014). Gurramkonda et al. (2010) menggunakan 6 g/L metanol untuk memproduksi proinsulin secara ekstraseluler namun terjadi penurunan produksi proinsulin dan kematian sel. Maka dari itu Gurramkonda et al. (2010) menurunkan konsentrasi metanol menjadi 2 g/L dan tidak terjadi kematian sel. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi metanol yang digunakan berperan dalam viabilitas dan kemampuan ekspresi *P. pastoris*.

Berdasarkan kemampuan *P. pastoris* yang telah dijelaskan di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji kemampuan ekspresi proinsulin oleh beberapa galur *P. pastoris* serta mengkaji pengaruh variasi konsentrasi dan lama induksi terhadap ekspresi proinsulin secara intraseluler.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Balai Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) Gedung 630, Kawasan Puspiptek, Tangerang Selatan, Banten. Waktu penelitian dimulai dari September 2017- Agustus 2018.

### Kloning plasmid

Plasmid pPICZA-PI ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* TOP10 mengikuti metode dari Sambrook dan Russel (2001). Sel *E. coli* rekombinan ditumbuhkan ke dalam media *Luria Broth* (LB) rendah garam padat (1% tripton, 0,5% yeast extract, 0,5% NaCl, dan 2% agar) dengan suplementasi 25 µg/mL Zeocin™ pada suhu 37°C, 16-18 jam. Koloni tunggal yang tumbuh kemudian diregenerasi untuk keperluan isolasi plasmid dalam media LB rendah garam cair dengan suplementasi Zeocin™ pada suhu 37°C, 160 rpm, 16-18 jam. Isolasi plasmid dilakukan dengan kit *high-speed plasmid mini* dari Geneaid (Taipei). Hasil isolasi kemudian dilinearisi dengan *SacI* sesuai prosedur Thermo Fisher (Massachusetts). Hasil isolasi dan linearisasi dianalisis dengan elektroforesis agarosa.

### Transformasi *P. pastoris*

Proses pembuatan sel kompeten dan transformasi *P. pastoris* menggunakan kit *EasyComp™* (Invitrogen, USA). Sel kompeten *P. pastoris* ditransformasi dengan plasmid pPICZA dan pPICZA-PI. Sel rekombinan ditumbuhkan dalam media padat YPD (1% yeast extract, 2% pepton, 2% dekstrosa, dan 2% agar) dengan suplementasi 100 µg/mL Zeocin™ pada suhu 28°C selama 4 hari. Koloni tunggal yang tumbuh diregenerasi untuk keperluan pembuatan stok gliserol. Stok gliserol disimpan dalam -80°C.

### Seleksi klon

Proses seleksi klon dilakukan dengan menumbuhkan koloni *P. pastoris* hasil transformasi dalam media *buffered complex medium containing glycerol* (BMGY) (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM bufer kalium fosfat pH 6,0, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, dan 1% gliserol) pada suhu 30°C, 250 rpm selama 1 hari. Kultur disentrifugasi pada hari selanjutnya dan pelet diresuspensi dalam *buffered minimal medium containing methanol and/or histidine* (BMM(H)) (100 mM bufer kalium fosfat pH 6,0, 1,34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 0,5% metanol, dan 0,004% histidine) pada suhu 25°C, 250 rpm. Sebanyak 1 mL sampel diambil dan induksi metanol sebanyak 0,5% dilakukan setiap 24 jam. Ekstraksi protein intraseluler *P. pastoris* rekombinan dilakukan berdasarkan prosedur dari Haar (2007). Analisa protein intraseluler dilakukan dengan *Tricine* SDS-PAGE.

### Analisa pita protein dengan SDS-PAGE

Analisa SDS-PAGE dilakukan berdasarkan metode dari Schägger (2006). Alat SDS-PAGE yang digunakan yaitu produk ATTO (AE6450). Elektroforesis dilakukan dalam dua bufer yaitu bufer katoda (Trisin 1 M, Tris 1 M, SDS 1%) di bagian dalam tangki dan bufer anoda (Tris 1 M). Gel kemudian divisualisasi dengan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) R-250. Pada awalnya gel direndam dalam larutan fiksasi (amonium asetat 0,1 M, metanol 50%, asam asetat 10%), kemudian dalam larutan staining (CBB R-250 0,1%, metanol 40%, asam asetat 10%) selama 30 menit dan dalam larutan *destaining* (metanol 40%, asam asetat 10%) hingga terlihat pita protein dan gel menjadi bening.

Pewarnaan perak dilakukan jika pita protein tidak terlihat setelah pewarnaan CBB R-250. Prosedur pewarnaan perak mengikuti prosedur Chevallet et al. (2006). Gel yang telah diwarnai dengan CBB R-250 direndam ke dalam larutan 50 mM amonium hidrogen karbonat kemudian ke dalam larutan fiksasi (30% (v/v) etanol, 10% (v/v) asam asetat). Selanjutnya gel dibilas dalam larutan 30% (v/v) etanol dan dilanjutkan dengan pembilasan gel dalam air *ultrapure*. Kemudian gel disensitasi dalam 0,8 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dan dilanjutkan dengan inkubasi dalam larutan 12 mM AgNO<sub>3</sub>. Setelah itu gel diinkubasi dalam larutan developer (3% (w/v) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 6,25 µL 10% (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 14 µL

formalin 37%). Pewarnaan gel dilakukan hingga cukup. Selanjutnya gel direndam dalam larutan stop (4% (w/v) Tris + 2% (v/v) asam asetat). Pada tahap akhir, gel dibilas dalam air *ultrapure*.

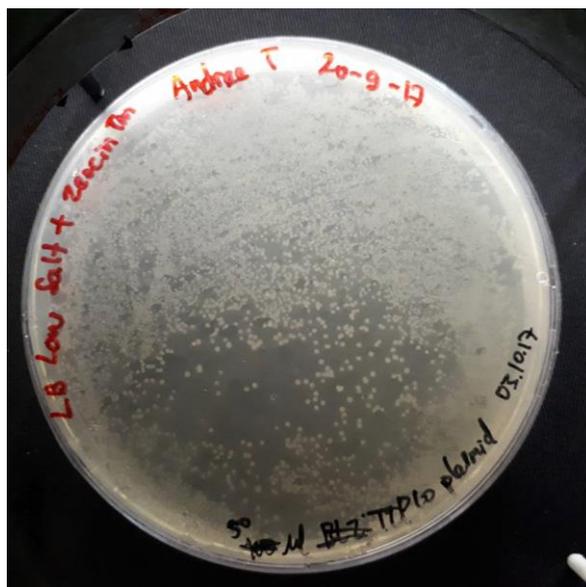
### Konfirmasi hasil integrasi gen proinsulin

Tiga koloni terpilih hasil seleksi ditumbuhkan dalam media cair YPD + Zeocin pada suhu 30°C, 160 rpm selama 20 jam. Selanjutnya dilakukan isolasi genom mengikuti prosedur *Bust n' Grab* dari Harju et al. (2004). Konsentrasi genom diukur dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop™ (Thermoscientific).

Tahap PCR dilakukan dengan menggunakan *thermal cycler* (TaKaRa). Konsentrasi genom hasil isolasi dilakukan pengenceran sebanyak 50×. Komposisi reagen yang ditambahkan per satu sampel adalah *nuclease free water* (11,4 µL), 10× bufer (2 µL), 25 mM MgSO<sub>4</sub> (1,5 µL), dNTP (2 µL), primer F (0,8 µL), primer R (0,8 µL), DNA polimerase (0,5 µL), dan DNA template (1 µL). Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis agarosa kemudian pita amplikon divisualisasi dengan *UV Transluminator*.

### Uji fenotipe

Uji fenotipe dilakukan dengan menumbuhkan *P. pastoris* rekombinan hasil seleksi koloni dalam media padat *minimal medium containing methanol and/or histidine*



**Gambar 1.** Hasil transformasi *E. coli* TOP10 dengan plasmid pPICZA-PI

(MM(H)) (1,34% YNB, 4 × 10<sup>-5</sup> biotin, 0,5% metanol, 0,004% histidin, 2% agar) dan *minimal medium containing glycerol and/or histidine* (MD(H)) (1,34% YNB, 4 × 10<sup>-5</sup> biotin, 1% gliserol, 0,004% histidin, 2% agar). *P. pastoris* rekombinan ditumbuhkan dalam media MM(H) terlebih dahulu kemudian dalam media MD(H) pada suhu 30°C selama 48 jam. Berdasarkan kecepatan penggunaan metanol, fenotipe dari *P. pastoris* dibagi menjadi Mut<sup>+</sup> (penggunaan metanol normal) dan Mut<sup>S</sup> (penggunaan metanol lambat). Kontrol Mut<sup>+</sup> yang ditumbuhkan dalam masing-masing media adalah GS115/pPICZ/*lacZ* dan kontrol Mut<sup>S</sup> yang ditumbuhkan adalah GS115 Albumin. Pengamatan kecepatan pertumbuhan sampel dilakukan setiap 24 jam.

### Seleksi galur

Tiga koloni terpilih hasil seleksi ditumbuhkan dalam media BMGY pada suhu 30°C, 250 rpm selama 1 hari. Kultur disentrifugasi pada hari selanjutnya dan pelet dipindah ke dalam media BMM(H). Ekspresi proinsulin dilakukan pada suhu 25°C, 250 rpm, selama 4 hari. Sebanyak 1 mL sampel diambil dan 0,5% metanol ditambah setiap 24 jam. Sampel protein dianalisis dengan *Tricine* SDS-PAGE.

### Optimasi ekspresi proinsulin

GS115-PI ditumbuhkan dalam media BMGY pada suhu 30°C, 250 rpm, 1 hari. Kultur disentrifugasi pada hari selanjutnya dan pelet diresuspensi dalam media BMM(H). Ekspresi proinsulin dilakukan pada suhu 25°C, 250 rpm, selama 6 hari. Sebanyak 1 mL sampel diambil setiap 1 hari. Variasi konsentrasi akhir metanol sebesar 0,5, 1, 1,5 dan 2% ditambahkan ke dalam kultur setiap 1 hari. Analisa protein dilakukan menggunakan *Tricine* SDS-PAGE.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kloning plasmid pPICZA-PI

Proses transformasi plasmid pPICZA-PI ke dalam *E. coli* berhasil karena *E. coli* rekombinan dapat tumbuh dalam media dengan suplementasi Zeocin. Hal ini menunjukkan bahwa *E. coli* rekombinan mengandung plasmid pPICZA-PI yang memiliki marka resistensi terhadap Zeocin sehingga *E. coli* dapat tumbuh pada media

tersebut. Pertumbuhan *E. coli* rekombinan memenuhi permukaan media sehingga efisiensi transformasi tidak dapat dihitung. Hasil transformasi *E. coli* ditampilkan dalam Gambar 1.

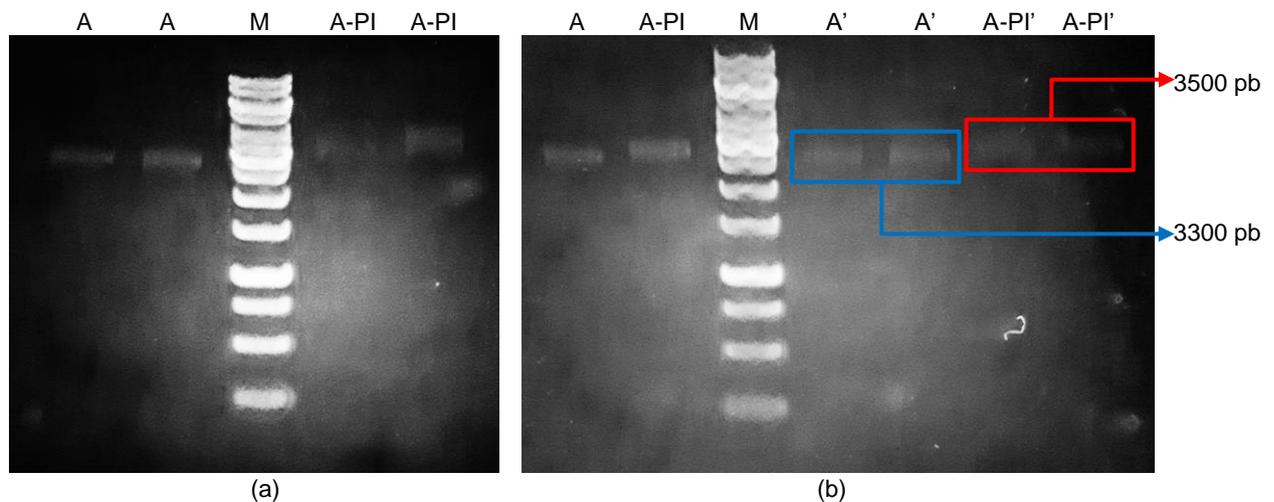
Koloni tunggal yang tumbuh kemudian diregenerasi dalam media LB cair dengan suplementasi Zeocin untuk keperluan isolasi plasmid. Terdapat dua jenis *E. coli* rekombinan yang ditumbuhkan dalam media yaitu *E. coli* yang mengandung plasmid pPICZA (plasmid tanpa gen sisipan) dan *E. coli* yang mengandung plasmid pPICZA-PI (plasmid dengan gen sisipan). Proses transformasi *E. coli* dengan pPICZA telah dilakukan oleh peneliti Balai Bioteknologi (BPPT). Proses transformasi dilakukan menggunakan metode Sambrook dan Russel (2001) sesuai dengan metodologi yang telah dijelaskan sebelumnya. Plasmid pPICZA berukuran 3,3 kb dan ukuran sisipan gen PI berukuran 179 pb sehingga plasmid pPICZA-PI akan berukuran 3,479 kb. Hal ini akan menyebabkan adanya perbedaan posisi kedua pita plasmid pada gel elektroforesis.

Isolasi plasmid berhasil yang ditunjukkan dengan adanya pita pada gel elektroforesis. Meskipun begitu, konsentrasi DNA hasil isolasi masih rendah dilihat dari hasil pengukuran konsentrasi dengan Nanodrop™ maupun dari hasil visualisasi pita DNA. Rendahnya konsentrasi hasil isolasi plasmid kemungkinan disebabkan sel bakteri tidak terlisis sempurna, *nuclease-free water* yang ditambahkan tidak tepat di tengah matriks kolom, atau proses elusi plasmid

yang tidak sempurna. Faktor lain yang mempengaruhi hasil isolasi plasmid adalah ukuran plasmid, jumlah salinan plasmid (*copy number*), dan kondisi pertumbuhan bakteri (Pronobis et al. 2016). Plasmid hasil isolasi kemudian dilinearisasi. Hasil isolasi dan linearisasi plasmid ditunjukkan dalam Gambar 2. Berdasarkan hasil linearisasi, kedua jenis plasmid tersebut telah linear. Plasmid pPICZA-PI menunjukkan ukuran sebesar ±3,5 kb, sedangkan plasmid pPICZA sebesar 3,3 kb. Ukuran plasmid pPICZA-PI lebih besar dari plasmid pPICZA karena mengandung gen sisipan sehingga sesuai dengan ukuran teoritis. Plasmid yang linear ini kemudian ditransformasi ke dalam *P. pastoris*.

### Transformasi *P. pastoris*

Terdapat 3 galur *P. pastoris* yang digunakan dalam proses transformasi yaitu X33, GS115, dan KM71H. Masing-masing galur ini ditransformasi dengan plasmid pPICZA dan pPICZA-PI sehingga galur *P. pastoris* selanjutnya ditambah huruf A (untuk *P. pastoris* dengan plasmid pPICZA, contoh: X33A), dan ditambah huruf PI (untuk *P. pastoris* dengan plasmid pPICZA-PI, contoh: X33-PI). Proses transformasi *P. pastoris* berjalan dengan baik seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 3. Masing-masing galur *P. pastoris* rekombinan dapat tumbuh dalam media YPD dengan suplementasi Zeocin setelah diinkubasi selama 4 hari. Hal ini menunjukkan bahwa plasmid telah terintegrasi ke dalam genom *P. pastoris*

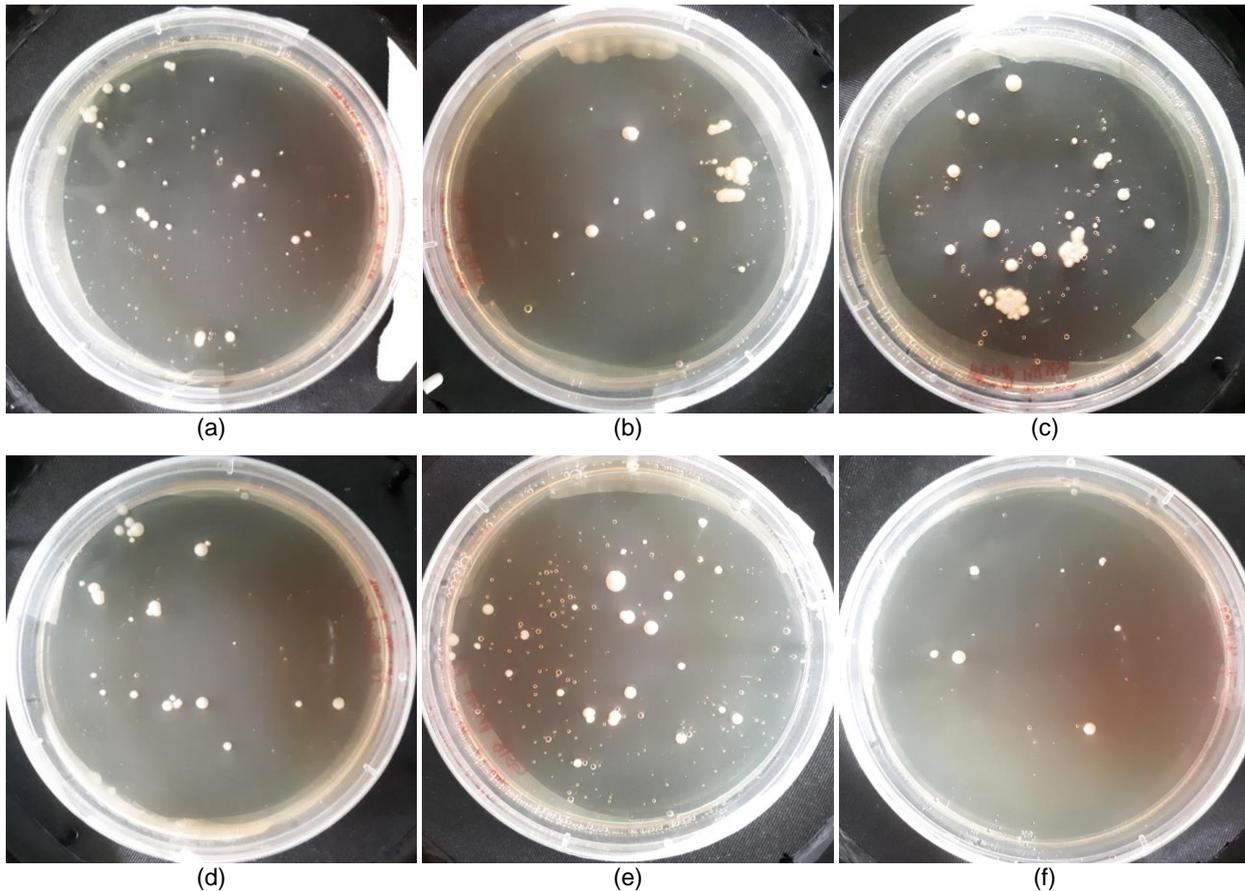


**Gambar 2.** Hasil: (a) isolasi plasmid dan (b) linearisasi plasmid. A = pPICZA sebelum linearisasi, A-PI = pPICZA-PI sebelum linearisasi, M = Marka DNA 1 kb, A' = pPICZA setelah linearisasi, A-PI' = pPICZA-PI setelah linearisasi

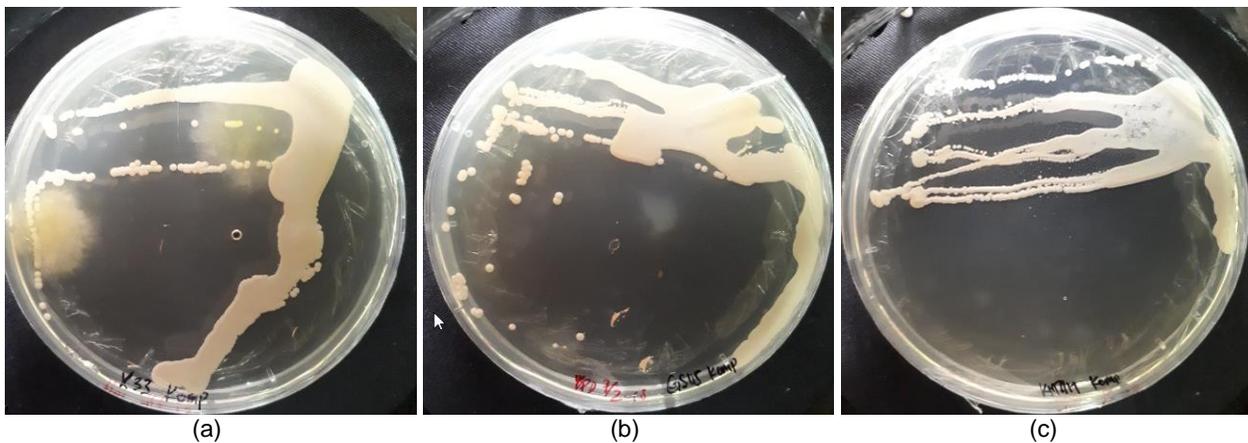
sehingga sel dapat mengekspresikan protein resistensi Zeocin. Morfologi dari koloni *P. pastoris* hasil transformasi berbentuk bulat dengan warna putih krim. Permukaan koloni licin dan koloni memiliki konsistensi yang lunak sesuai dengan deskripsi ATCC<sup>®</sup> 28485<sup>™</sup>. Berdasarkan kemampuan pertumbuhan *P. pastoris* rekombinan dalam media YPD dengan Zeocin, proses

transformasi disimpulkan berhasil.

Sel kompeten juga ditumbuhkan dalam media YPD. Tujuan dari perlakuan ini adalah untuk melihat pengaruh persiapan sel kompeten terhadap viabilitas sel. Pada Gambar 4 ditunjukkan hasil inkubasi sel kompeten *P. pastoris* sebelum transformasi. Sel kompeten ditumbuhkan dalam media YPD dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari.



**Gambar 3.** Hasil transformasi *Pichia pastoris*: (a) X33A, (b) GS115A, (c) KM71HA, (d) X33-PI, (e) GS115-PI, dan (f) KM71H-PI



**Gambar 4.** Hasil regenerasi sel kompeten dalam media YPD: (a) X33, (b) GS115, dan (c) KM71H

Hasil inkubasi menunjukkan sel kompeten dapat tumbuh dengan baik meskipun terdapat kontaminasi jamur pada media X33. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa proses persiapan sel kompeten tidak merusak sel.

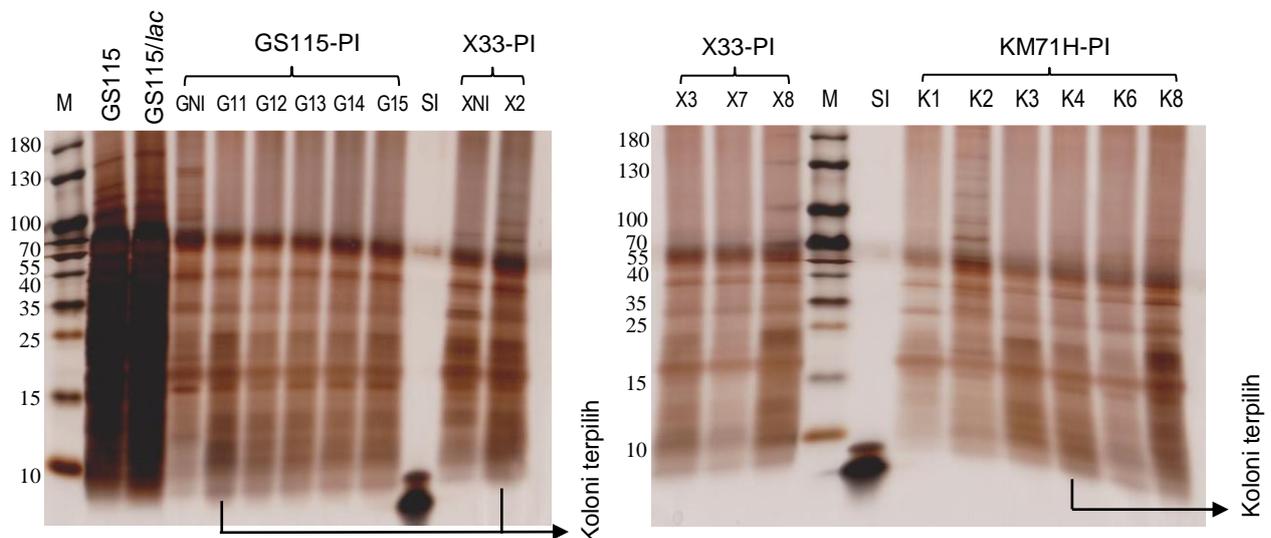
**Seleksi klon**

Hasil transformasi dari masing-masing *P. pastoris* rekombinan dengan gen sisipan memberikan beberapa koloni tunggal. Seleksi koloni dilakukan untuk memilih klon penghasil pita proinsulin terbaik dari masing-masing galur rekombinan. Berdasarkan perhitungan bobot molekul (BM) dengan menggunakan *software* Expassy, proinsulin hasil ekspresi *P. pastoris* rekombinan berukuran 6 kDa dan terdiri dari 53 asam amino. Sehingga pita proinsulin akan berada di antara marka protein terbawah yang berukuran 10 kDa dengan standar insulin dengan ukuran 5,8 kDa. Ekspresi proinsulin telah dilakukan pada suhu 30°C namun tidak terlihat pita proinsulin (data tidak ditampilkan). Oleh karena itu, suhu ekspresi diturunkan menjadi 25°C. Penurunan suhu ini didasarkan dari hasil literatur beberapa jurnal penelitian. Beberapa hasil penelitian menunjukkan penurunan suhu ekspresi *P. pastoris* memberikan hasil yang lebih tinggi (Li et al, 2014; Maity et al, 2015; dan Prabhu et al, 2016). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa proses ekspresi protein rekombinan lebih baik pada suhu rendah seperti pada suhu 23°C (Wu et al. 2012). Pita proinsulin mulai terlihat pada suhu ekspresi ini (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa proses ekspresi proinsulin lebih baik dilakukan dalam suhu rendah.

Pita proinsulin terlihat setelah dilakukan pewarnaan perak. Perbandingan ketebalan pita dilihat secara visual. Ketebalan pita tidak diukur dengan menggunakan perangkat lunak karena kerapatan antar pita sehingga antar pita tidak terpisah. Pita proinsulin paling tebal dari GS115-PI ditunjukkan oleh koloni nomor 11 yang selanjutnya disebut G11, untuk galur X33-PI ditunjukkan oleh koloni nomor 2 yang selanjutnya disebut X2, dan untuk galur KM71H-PI ditunjukkan oleh koloni nomor 4 yang selanjutnya disebut K4. Analisis seleksi koloni telah dilakukan sebanyak tiga kali dan memberi hasil yang konsisten sehingga membuktikan bahwa koloni terpilih merupakan penghasil pita proinsulin terbaik (Gambar 5).

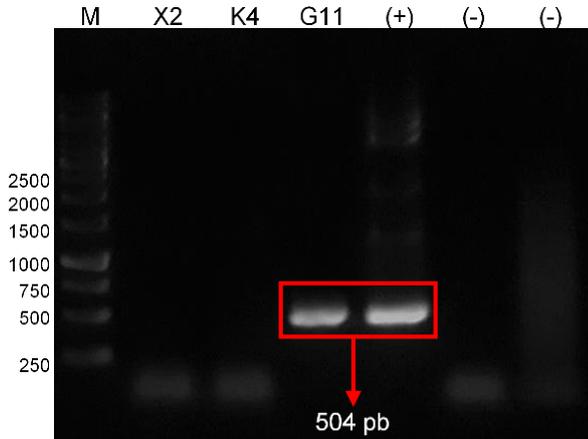
**Konfirmasi hasil integrasi**

Proses konfirmasi integrasi gen sisipan ke dalam genom *P. pastoris* dilakukan dengan dua tahap yaitu isolasi genom *P. pastoris* rekombinan serta amplifikasi gen sisipan dengan PCR. Konsentrasi genom yang diperoleh kemudian diukur dengan menggunakan Nanodrop™. Rata-rata hasil isolasi genom mencapai ±3000 ng/μL. Hasil isolasi genom ini kemudian diencerkan sebanyak 50× agar dapat dipakai sebagai cetakan DNA. Konsentrasi hasil pengenceran genom berada pada rentang 100-700 ng/μL. Kemurnian genom yang dilihat dari rasio 260/280 memberi angka di atas 2. Hal ini menunjukkan adanya kontaminasi RNA yang dapat dicegah dengan penambahan RNase untuk isolasi genom selanjutnya (Ashram et al. 2016).



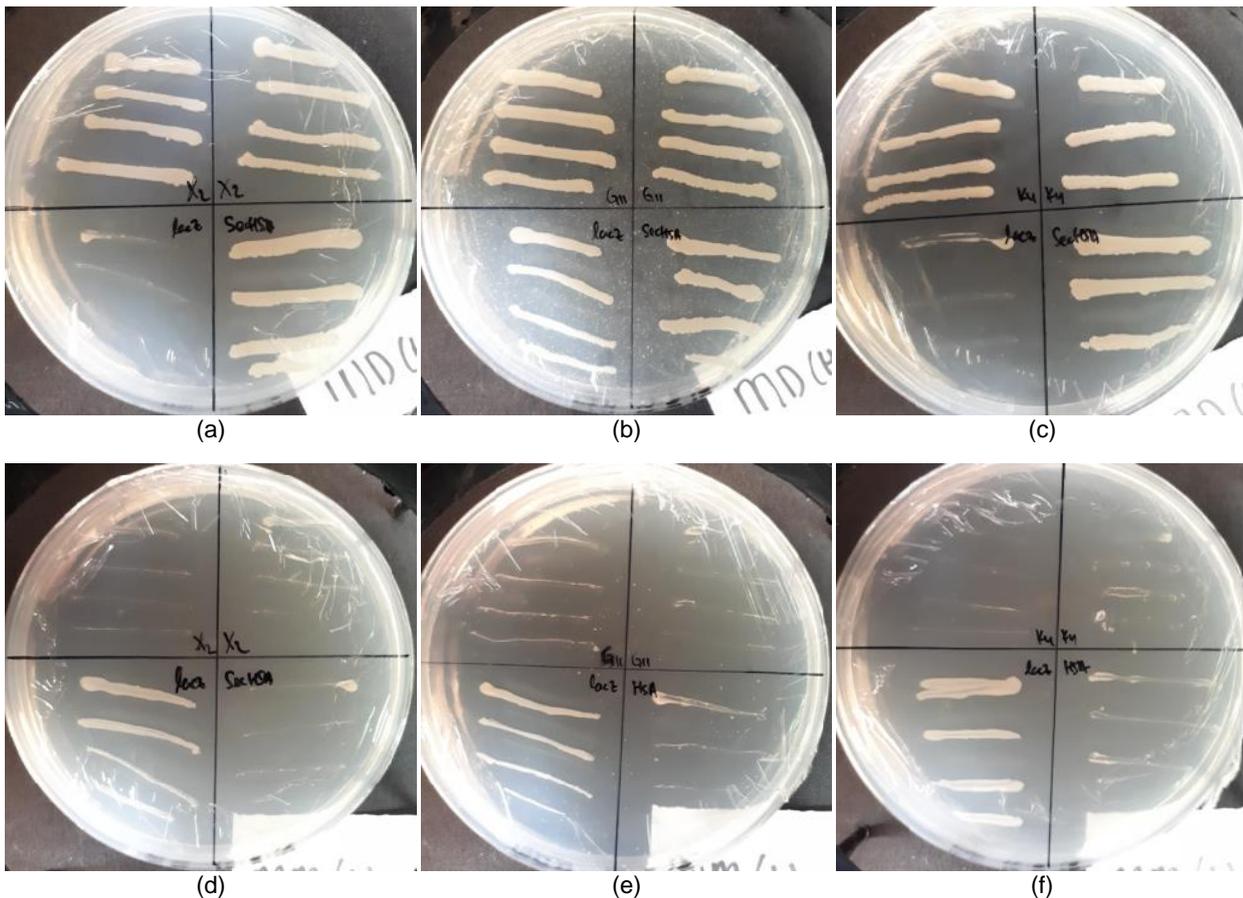
**Gambar 5.** Seleksi koloni dengan suhu ekspresi 25°C. Panah hitam menandakan koloni yang dipilih

*P. pastoris* rekombinan yang memiliki gen sisipan akan menghasilkan amplicon berukuran 504 pb yang merupakan ukuran



**Gambar 6.** Amplifikasi gen sisipan dari genom *P. pastoris* rekombinan. (+) merupakan kontrol positif, (-) merupakan kontrol negatif. Pita amplicon yang sesuai dihasilkan oleh koloni G11

gen AOX1 (325 pb) ditambah ukuran gen sisipan (179 pb). Berdasarkan hasil elektroforesis yang ditampilkan dalam Gambar 6, hanya GS115-G11 yang menghasilkan pita amplicon berukuran 504 pb dan sesuai dengan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah plasmid pPICZA-PI hasil isolasi dari *E. coli* rekombinan. Sehingga, hasil ini mendukung hasil analisis seleksi galur yaitu GS115-G11 merupakan galur yang dapat menghasilkan proinsulin. Galur X33-X2 dan KM71H-K4 tidak memberikan pita amplicon yang diharapkan. Hal ini bisa juga dilihat dari konsentrasi cetakan genom dari masing-masing galur yang belum optimum. Menurut Lorenz (2012), jumlah cetakan yang dipakai dalam proses PCR berpengaruh terhadap hasil yang diberikan. Jumlah cetakan ini menunjukkan jumlah salinan cetakan DNA yang mengandung sekuen komplemen dari primer PCR. Selain itu, salah satu faktor lain



**Gambar 7** Uji fenotipe tiga koloni *P. pastoris* terpilih: (a) X33-X2 pada MD, (b) GS115-G11 pada MDH, (c) KM71H-K4 pada MD, (d) X33-X2 pada MM, (e) GS115-G11 pada MMH, dan (f) KM71H-K4 pada MM. (Keterangan media: MD = *Minimal Dextrose*, MM = *Minimal Methanol*, MDH = *Minimal Dextrose with histidine*, dan MMH = *Minimal Methanol with histidine*. Setiap cawan dibagi empat sektor, dari sektor bagian atas kiri searah jarum jam: sampel *P. pastoris* terpilih (2 sektor), GS115 Sec HSA, dan GS115/pPICZA/*lacZ*. Pertumbuhan koloni yang ditampilkan merupakan hasil pengamatan hari kedua)

yang mungkin terjadi adalah proses *annealing* yang tidak terjadi pada sampel X33-X2 dan KM71H-K4 sehingga tidak terjadi amplifikasi gen proinsulin. Suhu *annealing* pada umumnya berada pada rentang 52-58°C (Lorenz 2012). Sehingga pada penelitian berikutnya perlu dilakukan optimasi konsentrasi cetakan dan suhu *annealing* untuk galur X33-X2 dan KM71H-K4.

Fenotipe dari *P. pastoris* rekombinan juga dapat dianalisis melalui hasil elektroforesis di atas. *P. pastoris* dengan fenotipe Mut<sup>+</sup> akan menghasilkan pita ampikon berukuran 2,2 kb. Namun hasil elektroforesis diatas tidak menunjukkan adanya pita berukuran 2,2 kb dari sampel sehingga terbukti bahwa fenotipe *P. pastoris* rekombinan terpilih merupakan Mut<sup>S</sup>.

**Uji fenotipe *P. pastoris* rekombinan**

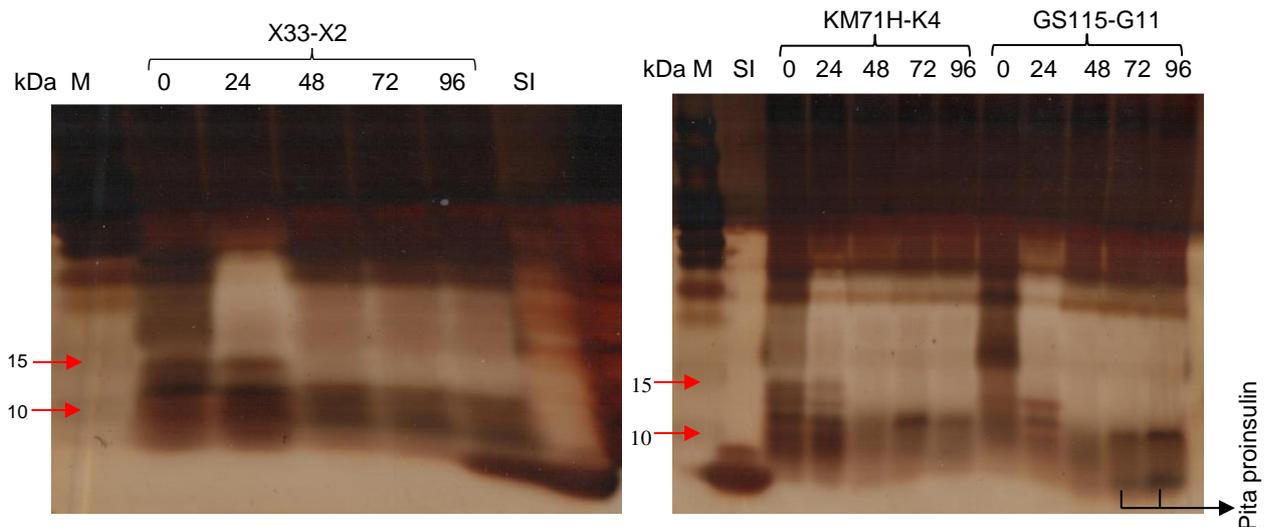
Uji fenotipe dilakukan untuk mengetahui fenotipe dari *P. pastoris* setelah proses transformasi. Koloni uji disimpulkan memiliki fenotipe Mut<sup>+</sup> jika dapat tumbuh normal di kedua media minimal, sedangkan fenotipe Mut<sup>S</sup> jika mengalami pertumbuhan normal di media minimal dekstrosa namun mengalami pertumbuhan yang lambat atau tidak tumbuh sama sekali di media minimal metanol.

Hasil uji fenotipe ditampilkan dalam Gambar 7. Dalam uji fenotipe ini, terdapat dua kontrol yang ditumbuhkan dalam masing-masing media minimal yaitu GS115/pPICZ/*lacZ* dan GS115 Albumin. GS115/pPICZ/*lacZ* merupakan kontrol

untuk Mut<sup>+</sup> sedangkan GS115/Albumin merupakan kontrol untuk Mut<sup>S</sup>. GS115/pPICZ/*lacZ* mengalami pertumbuhan yang normal pada kedua jenis media sedangkan GS115/Albumin mengalami pertumbuhan yang lambat pada media yang mengandung metanol. Hal ini membuktikan bahwa kedua jenis kontrol fenotipe tersebut sudah sesuai dengan teori. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian dari Alias et al. (2011).

Koloni X33-X2 yang ditumbuhkan mengalami pertumbuhan normal pada media MD, namun mengalami perlambatan pertumbuhan pada media MM. Perbedaan kemampuan pertumbuhan ini juga diamati dari koloni GS115-G11, begitu juga dari koloni KM71H-K4. Berdasarkan hasil analisis ini, disimpulkan bahwa fenotipe dari ketiga koloni uji merupakan Mut<sup>S</sup>.

*P. pastoris* dengan fenotipe Mut<sup>S</sup> memiliki keuntungan dibanding *P. pastoris* fenotipe Mut<sup>+</sup>. Galur Mut<sup>S</sup> tidak memerlukan metanol dan oksigen dengan jumlah sebanyak yang dibutuhkan galur Mut<sup>+</sup> dalam proses peningkatan produksi (misalnya skala industri) (Cereghino dan Cregg 2000). Meskipun begitu, galur Mut<sup>S</sup> akan membutuhkan waktu induksi yang lebih panjang karena penggunaan metanol yang lebih lambat. Berdasarkan penelitian Orman et al. (2009) dan Krainer et al. (2012), *P. pastoris* dengan fenotipe Mut<sup>S</sup> memiliki tingkat produksi dan efisiensi yang lebih tinggi dalam ekspresi protein rekombinan.



**Gambar 8.** Hasil seleksi galur. M= marka protein, SI= standar insulin. Kultur disampling pada jam ke- 0, 24, 48, 72, dan 96. Pita proinsulin yang terekspresikan oleh GS115-G11

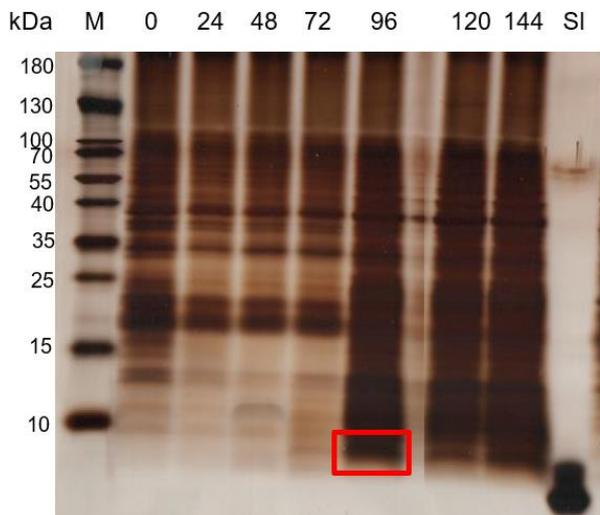
### Seleksi galur

Seleksi galur dilakukan dengan tujuan untuk memilih galur yang dapat mengekspresikan proinsulin terbaik. Hasil seleksi galur ditampilkan dalam Gambar 8. Berdasarkan Gambar 8, pita proinsulin tidak terlihat jelas dari galur X33-X2 dan KM71H-K4. Meskipun pada lajur X2 induksi jam ke-96 memberikan pita yang tebal namun terlihat bahwa pita tersebut berdekatan dengan standar insulin. Hal ini menyebabkan pita tersebut tidak dapat disimpulkan sebagai pita proinsulin. Pada KM71H-K4, terdapat pita yang memiliki posisi sama dengan pita proinsulin namun pita tersebut samar-samar. Hal ini mungkin dikarenakan jumlah proinsulin yang sedikit. Pita proinsulin terlihat

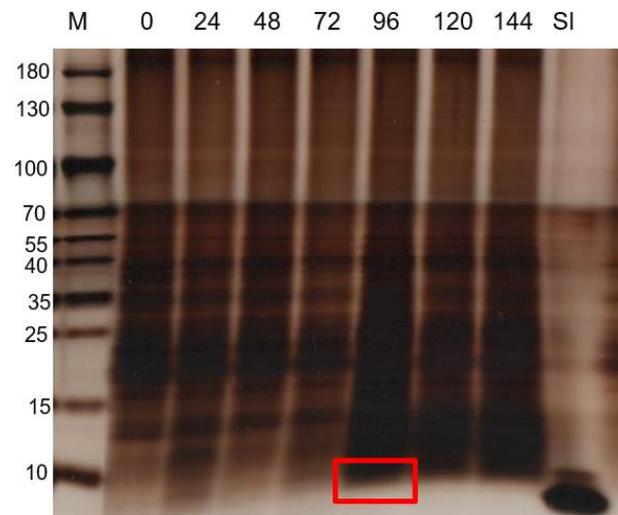
jelas dari galur GS115-G11 dan semakin tebal dari jam 72 ke jam 96. Berdasarkan hasil perbandingan ini, galur GS115-G11 merupakan galur yang dipilih untuk analisis pengaruh variasi metanol terhadap ekspresi proinsulin.

### Optimasi ekspresi proinsulin

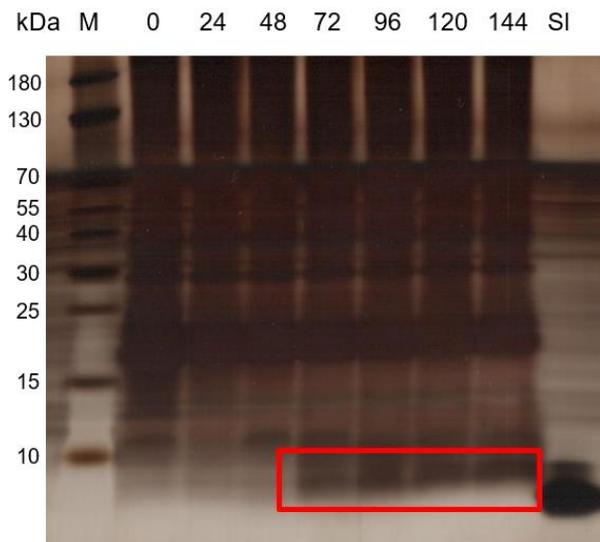
Proses optimasi ekspresi proinsulin dilakukan dengan melakukan variasi konsentrasi akhir metanol sebagai penginduksi dalam media fermentasi. Tujuan dari perlakuan ini adalah untuk mengkaji pengaruh variasi konsentrasi metanol yang diberikan terhadap ekspresi proinsulin. Hasil variasi konsentrasi akhir metanol ditampilkan dalam Gambar 9.



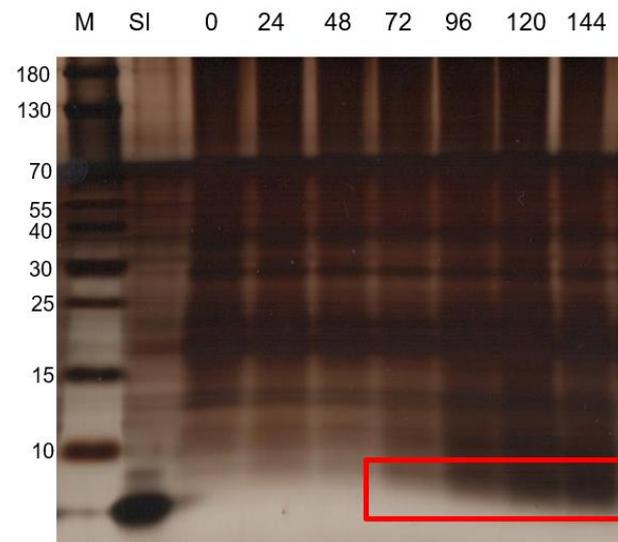
(a)



(b)



(c)



(d)

**Gambar 9.** Variasi konsentrasi akhir metanol terhadap ekspresi proinsulin (kotak merah). Keterangan konsentrasi akhir metanol: kDa = BM marka protein, M = marka protein, SI = standar insulin, (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 1,5%, dan (d) 2%. Kultur disampling pada jam ke-0, 24, 48, 72, 96, 120, dan 144

Pita proinsulin berhasil diekspresi dari masing-masing variasi konsentrasi metanol dengan kecenderungan yang berbeda. Hasil variasi metanol dengan konsentrasi akhir sebesar 0,5% dan 1% memberikan pita proinsulin yang terlihat jelas setelah 72 jam induksi dan semakin tebal sampai 144 jam induksi. Pita yang dihasilkan dari induksi metanol 1% lebih tebal dibanding pita hasil induksi metanol 0,5%. Hal ini menunjukkan peningkatan konsentrasi metanol sebesar 1% meningkatkan ekspresi proinsulin. Meskipun demikian, penggunaan metanol dengan konsentrasi akhir metanol sebesar 0,5% sudah dapat mengekspresikan proinsulin.

Pita proinsulin dari hasil induksi metanol sebesar 1,5% dan 2% mulai terlihat dari setelah induksi 96 jam. Pita proinsulin paling tebal hasil induksi metanol 1,5% terlihat pada jam 96. Pita proinsulin menipis seiring bertambahnya waktu induksi meskipun tidak terlalu jelas secara visual. Ketebalan pita proinsulin secara visual dari hasil induksi metanol sebesar 2% tidak meningkat jauh dibanding pita proinsulin hasil induksi metanol 1,5%. Secara visual, ketebalan pita proinsulin pada jam ke-96 dari hasil induksi metanol 1,5% sama dengan pita proinsulin jam ke-96 dari induksi metanol dengan konsentrasi akhir 2%. Berdasarkan perbandingan di atas dan dilihat dari kecepatan pembentukan pita proinsulin, induksi metanol 0,5% merupakan konsentrasi yang paling baik untuk mengekspresikan proinsulin.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh disimpulkan bahwa proses transformasi *P. pastoris* berhasil sehingga *P. pastoris* rekombinan dapat tumbuh pada media dengan suplementasi Zeocin. Fenotipe transforman semua galur merupakan fenotipe Mut<sup>S</sup>. Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE, GS115 merupakan galur yang dapat mengekspresikan proinsulin secara intraseluler. Hasil induksi metanol 0,5% dan lama induksi 72 jam memberikan pita proinsulin paling tebal dan cepat dibandingkan dengan variasi lain.

## DAFTAR PUSTAKA

Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia*

*pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnol 98:5301-5317. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5

Alias NI, Mahadi NM, Murad AMA, Abu-Bakar FD, Rabu A, Illias RM (2011) Expression optimisation of recombinant  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 120120 in *Pichia pastoris* and its biochemical characterisation. Afr J Biotechnol 10:6700-6710. doi: 10.5897/AJB10.873

Baeshen MN, Bouback TA, Alzubaidi MA, Bora RS, Alotaibi MA, Alabbas OT, Alshahrani SM, Aljohani AA, Munshi RA, Hejin AA, Ahmed MM, Redwan EM, Ramadan HA, Saini KS, Baeshen NA (2016) Expression and purification of C-peptide containing insulin using *Pichia pastoris* expression system. BioMed Res Int 2016:1-7. doi: 10.1155/2016/3423685

Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahed MM, Ramadan HA, Saini KS, Redwan EM (2014) Cell factories for insulin production. Microb Cell Fact 13:141-150. doi: 10.1186/s12934-014-0141-0

Cereghino JL, Cregg JM (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev 24:45-66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x

Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Nat Protoc 1:1852-1858. doi: 10.1038/nprot.2006.288

El-Ashram S, Al Nasr I, Suo X (2016) Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. Biotechnol Rep (Amst) 12:33-39. doi: 10.1016/j.btre.2016.10.001

Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, Swaminathan S, Khanna N, Tisminetzky S, 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. Microb Cell Fact 9:31. doi : 10.1186/1475-2859-9-31

Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR (2004)

- Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol* 4:8. doi: 10.1186/1472-6750-4-8
- IDF (2015) IDF Diabetes atlas. Seventh Edition. International Diabetes Federation, Brussels Belgium
- Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A (2012) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact* 11:22. doi: 10.1186/1475-2859-11-22
- Li YY, Zhong KX, Hu AH, Liu DN, Chen LZ, Xu SD (2014) High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 108:90-96. doi: 10.1016/j.pep.2014.11.014
- Looser V, Brühlmann BB, Bumbak F, Stenger C, Costa M, Camattari A, Fotiadis D, Kovar K (2015) Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv* 33:1177-1193. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
- Lorenz TC (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* 63(e3938). doi: 10.3791/3998
- Maity N, Thawani A, Sharma A, Gautam A, Mishra S, Sahai V (2015) Expression and control of codon-optimized granulocyte colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 178:159-172. doi: 10.1007/s12010-015-1865-y
- Orman MA, Calik P, Ozdamar TH (2009) The influence of carbon sources on recombinant-human growth-hormone production by *Pichia pastoris* is dependent on phenotype: A comparison of Mut<sup>s</sup> and Mut<sup>+</sup> strains. *Biotechnol Appl Biochem* 52:245-255. doi: 10.1042/BA20080057
- Polez S, Origi D, Zahariev S, Guarnaccia C, Tisminetzky SG, Skoko N, Baralle M (2016) A simplified and efficient process for insulin production in *Pichia pastoris*. *PLoS One* 11:e0167207. doi: 10.1371/journal.pone.0167207
- Prabhu AA, Veeranki VD, Dsilva SJ (2016) Improving the production of human interferon gamma (hIFN- $\gamma$ ) in *Pichia pastoris* cell factory: An approach of cell level. *Process Biochem* 51:709-718. doi: 10.1016/j.procbio.2016.02.007
- Pronobis MI, Deutch N, Peifer M (2016) The Miraprep: A protocol that uses a miniprep kit and provides maxiprep yields. *PLoS One* 11:e0160509. doi: 10.1371/journal.pone.0160509
- Quianzon CC, Cheikh I (2012) History of insulin. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2:1-3. doi: 10.3402/jchimp.v2i2.18701
- Safder I, Khan S, Islam I, Ali MK, Bibi Z, Waqas M (2018) *Pichia pastoris* expression system: A potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biomed Lett* 4:1-14
- Samalla P (2015) Transformation of the X-33 strain of *Pichia pastoris* and the small scale expression of the N103H mutant hen egg white lysozyme gene. Thesis, Youngtown State University
- Sambrook JF, Russel DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1:16-22. doi: 10.1038/nprot.2006.4
- Shen W, Kong C, Xue Y, Liu Y, Cai M, Zhang Y, Jiang T, Zhou X, Zhou M (2016) Kinase screening in *Pichia pastoris* identified promising targets involved in cell growth and alcohol oxidase 1 Promoter (PAOX1) regulation. *PLoS One* 11:e0167766. doi: 10.1371/journal.pone.0167766
- Strumberger L, Chappell T, Geier M, Krainer F, Day KJ, Vide U, Trstenjak S, Schiefer A, Richardson T, Soriaga L, Darnhofer B, Birner-Gruenberger R, Glick BS, Tolstorukov I, Cregg J, Madden K, Glieder A (2016) Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *J Biotechnol* 235:121-131. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.023
- Vanz AL, Nimtz M, Rinas U (2014) Decrease of UPR- and ERAD-related proteins in *Pichia pastoris* during methanol-induced secretory insulin precursor production in controlled fed-batch cultures. *Microb Cell Fact* 13:23. doi: 10.1186/1475-2859-13-23

- von der Haar T (2007) Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. PLoS One 2(10): e1078. doi: 10.1371/journal.pone.0001078
- WHO (2016) Global Report on Diabetes. WHO Press, France
- Wu JM, Wang SY, Fu WC (2012) Lower temperature cultures enlarge the effects of vitreoscilla hemoglobin expression on recombinant *Pichia pastoris*. Int J Mol Sci 13:13212-13226. doi: 10.3390/ijms131013212
- 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 504:122-126. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.073