

**PEMURNIAN PROTEIN ALFA-AMILASE
Saccharomycopsis fibuligera R64 MUTAN
YANG DIEKSPRESIKAN DALAM INANG *Pichia pastoris*
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI AFINITAS**

SKRIPSI

**RISTA AWALIA
A 201 025**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2024**

PEMURNIAN PROTEIN ALFA-AMILASE
Saccharomycopsis fibuligera R64 MUTAN
YANG DIEKSPRESIKAN DALAM INANG *Pichia pastoris*
MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI AFINITAS

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

RISTA AWALIA
A 201 025



SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA
YAYASAN HAZANAH
BANDUNG
2024

**PEMURNIAN PROTEIN ALFA-AMILASE
Saccharomycopsis fibuligera R64 MUTAN
YANG DIEKSPRESIKAN DALAM INANG *Pichia pastoris*
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI AFINITAS**

**RISTA AWALIA
A 201 025**

November 2024

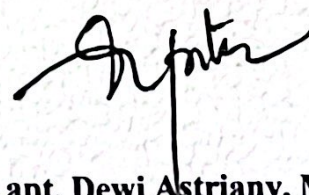
Disetujui oleh:

Pembimbing



Umi Baroroh, S.Si., M.Biotek.

Pembimbing



Dr. apt. Dewi Astriany, M.Si

Kutipan atau saduran baik sebagian ataupun seluruh naskah, harus menyebut nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Skripsi ini saya persembahkan kepada ayah (Koko Sunaryo), dan Ibunda (Cucu Cunasih) terkasih, serta adik tersayang (Erwan Ramadhan, dan Muhammad Bagas Arizki) dan juga seluruh pihak (Keluarga dan sahabat) yang senantiasa memberikan dukungan, cinta, dan do'a serta semangat dalam perjalanan saya menyelesaikan skripsi ini.

ABSTRAK

Pemurnian protein alfa-amilase sangat penting dalam industri untuk meningkatkan efisiensi dan kualitas produk. Oleh karena itu, penelitian ini memanfaatkan kromatografi afinitas dengan matriks Ni-Sepharose untuk memurnikan protein alfa-amilase. Pemurnian ini dilakukan dalam kondisi natif untuk mempertahankan struktur dan aktivitas biologis protein. Analisis elektroforesis SDS-PAGE digunakan untuk mengevaluasi keberhasilan pemurnian, sementara *software* ImageJ digunakan untuk menganalisis citra gel dari alfa-amilase, menentukan kemurnian, dan mengukur intensitas pita protein. Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan sebuah pita protein dominan pada ukuran ~48 kDa yang menandakan keberhasilan pemurnian. Aktivitas enzim diukur menggunakan metode Fuwa, dengan aktivitas tertinggi tercatat pada jam ke-144 induksi. Dengan kombinasi kromatografi afinitas dan analisis citra menggunakan ImageJ menunjukkan bahwa pita dominan berada di ukuran sekitar ~48 kDa, dengan intensitas pita sebesar 208.27. Kemurnian protein dalam sampel mencapai 1,26% yang menunjukkan keberhasilan pemurnian enzim alfa-amilase. Penelitian ini berhasil memurnikan alfa-amilase yang stabil dan aktif secara biologis. Hasil ini menunjukkan bahwa sistem ekspresi dan pemurnian yang digunakan efektif dalam menghasilkan alfa-amilase.

Kata kunci: Alfa-amilase, *Pichia pastoris*, Pemurnian kromatografi afinitas, SDS-PAGE, *Software* ImageJ.

ABSTRACT

Alpha-amylase protein purification is very important in industry to improve efficiency and product quality. Therefore, this study utilized affinity chromatography with Ni-Sepharose matrix to purify alpha-amylase protein. This purification was carried out under native conditions to maintain the structure and biological activity of the protein. SDS-PAGE electrophoresis analysis was used to evaluate the success of the purification, while ImageJ software was used to analyze the gel image of alpha-amylase, determine the purity, and measure the intensity of the protein band. The results of the SDS-PAGE analysis showed a dominant protein band at a size of ~48 kDa indicating successful purification. Enzyme activity was measured using the Fuwa method, with the highest activity recorded at 144 hours of induction. The combination of affinity chromatography and image analysis using Imagej showed that the dominant band was around ~48 kDa, with a band intensity of 208.27. The purity of the protein in the sample reached 1.26% indicating the success of the purification of the alpha-amylase enzyme. This study succeeded in purifying stable and biologically active alpha-amylase. These results indicate that the expression and purification systems used are effective in producing alpha-amylase.

Keywords: Alpha-amylase, Pichia pastoris, Affinity chromatography purification, SDS-PAGE, ImageJ software.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim,

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala berkah rahmat dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Pemurnian Protein Alfa-amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Mutan yang Diekspresikan dalam Inang *Pichia pastoris* menggunakan Kromatografi Afinitas”**.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dilakukan untuk memenuhi salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana pada Program Studi Sarjana Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Umi Baroroh, S.Si.,M.Biotek. dan Dr. apt. Dewi Astriany, M.Si. atas bimbingan, nasihat, dukungan, serta pengorbanan yang diberikan. Pada kesempatan ini, tidak lupa penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo, M.Si., selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. apt. Deby Tristiyanti, M.Farm., selaku Dosen Wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
5. Seluruh staf dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Seluruh staf Pusat Riset Bioteknologi dan Bioinformatika Universitas Padjadjaran,
7. Orang tua yang sudah memberikan doa dan selalu mendukung baik secara material maupun moril selama perkuliahan,
8. Uum, Desis, Intan, Agisty, Aini, dan Evelyn selaku sahabat yang selalu ada selama masa perkuliahan dan menemani penulis menyelesaikan skripsi ini,
9. Serta rekan-rekan angkatan 2020 yang telah memberikan inspirasi, motivasi, semangat dan kegembiraan semasa perkuliahan

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati diharapkan masukan berupa kritik dan saran yang bersifat membangun untuk perbaikan di masa yang akan datang. Penulis berharap semoga tugas akhir ini akan memberikan manfaat bagi penulis sendiri dan juga bagi pihak lain yang berkepentingan.

Bandung, November 2024

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
KUTIPAN	ii
PERSEMBAHAN	iii
ABSTRAK	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Alfa-Amilase.....	4
2.2 <i>Saccharomyces fibuligera</i> R64 Mutan.....	4
2.3 <i>Pichia pastoris</i> sebagai Inang Ekspresi	5
2.4 Karakterisasi Enzim melalui SDS-PAGE.....	6
2.5 Uji Aktivitas Enzim α -Amilase menggunakan Metode Fuwa	6
2.6 Kromatografi Afinitas.....	7
2.7 Matriks Ni-Sepharose	7
2.8 Pemurnian Protein dalam Kondisi Natif.....	7
2.9 <i>Software</i> ImageJ dan Penggunaannya	8
BAB III TATA KERJA.....	9
3.1 Alat	9
3.2 Bahan	9
3.3 Metode Penelitian	10
3.3.1 Alur Penelitian.....	10
3.3.2 Ekspresi Alfa-amilase	10
3.3.3 Uji Karakteristik dengan Metode SDS-PAGE	11
3.3.4 Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa	12
3.3.5 Pemurnian dengan Kromatografi Afinitas dalam Kondisi Natif.....	13

3.3.6 Analisis Kemurnian Protein Alfa-Amilase dengan Menggunakan Software ImageJ pada Gel SDS-PAGE dalam Kondisi Natif	14
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Ekspresi Alfa-amilase	16
4.2 Uji Karakteristik dengan Metode SDS-PAGE	16
4.3 Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa.....	18
4.4 Pemurnian dengan Kromatografi Afinitas dalam Kondisi Natif	21
4.5 Analisis Kemurnian Protein Alfa-Amilase dengan Menggunakan Software ImageJ pada Gel SDS-PAGE dalam Kondisi Natif.....	22
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA ...	25
5.1 Kesimpulan	25
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	28

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Komposisi Stacking Gel 12%	11
3.2 Komposisi Separating 5%	11
3.3 Komposisi <i>Buffer</i> A Volume 40 ml	13
3.4 Komposisi <i>Buffer</i> B Volume 10 ml.....	13
4.1 Uji Aktivitas Enzim dengan Metode Fuwa.....	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Peta plasmid pPICZ α -A- <i>Sfamy</i> R64 mut11 K48Q	5
3.1 Alur Penelitian	10
4.1 Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi α -amilase (1) Markerprotein; (2) Sebelum induksi jam ke-0; (3-8) Setelah induksi jam ke-24, 48, 72, 96, 120, dan 144.....	17
4.2 Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi <i>P.pastoris</i> tanpa α -amilase (1) Setelah induksi jam ke-144; (2) Marker protein; (4-8) Setelah induksi jam ke-120, 24, 48, 72, dan 96; (9) Sebelum induksi jam ke-0	17
4.3 Kurva Aktivitas Alfa-amilase	19
4.4 Kurva Aktivitas <i>Pichia pastoris</i> tanpa α -amilase	19
4.5 Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil pemurnian α -amilase (1) Marker protein; (2) Wash 10 mM; (3-8) Elusi 25 mM (1), Elusi 25 mM (4), Elusi 50 mM (1), Elusi 50 mM (4), Elusi 100 mM (1), Elusi 100 mM (4), Elusi 200 mM (4), dan Elusi 300 mM (3).....	21
4.6 Profil Intensitas Pita Protein α -amilase dalam Kondisi Natif menggunakan ImageJ.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. YPD + Alfa-amilase dan YPD + Alfa-amilase + <i>Zeocin</i>	28
2. BMGY + Alfa-amilase	28
3. BMMY + Alfa-amilase.....	28
4. SDS-PAGE α -amilase Sebelum Pemurnian	29
5. SDS-PAGE <i>Pichia pastoris</i> tanpa α -amilase Sebelum Pemurnian	29
6. SDS-PAGE α -amilase Setelah Pemurnian	30
7. Hasil Perhitungan pada Sampel α -amilase dengan <i>zeocin</i> ..	31
8. Hasil Perhitungan pada Sampel <i>P.pastoris</i> tanpa α -amilase	32
9. Hasil Fraksi - Fraksi yang didapatkan dari Pemurnian α -amilase	33
10. Proses Pengecekan Kemurnian Protein α -Amilase.....	34
11. Data Intensitas Pita Protein pada Gel SDS-PAGE α -amilase dalam Kondisi Natif	36
12. Perhitungan Persentase Kemurnian	36

DAFTAR PUSTAKA

- Ariandi (2016) 'Pengenalan Enzim Amilase (Alpha-Amylase) dan Reaksi Enzimatisnya Menghidrolisis Amilosa Pati Menjadi Glukosa', *Jurnal Dinamika*, 07(1), pp. 74–82.
- Baroroh, U. *et al.* (2022) 'Desain Peta Plasmid Pengkode α -Amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Mutan dan Pemodelan Struktur Protein', *Chimica et Natura Acta*, 10(3), pp. 100–105.
- Bolanos-Garcia, V.M. and Davies, O.R. (2006) 'Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), pp. 1304–1313.
- Cereghino, J.L. and Cregg, J.M. (2000) 'Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*', *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), pp. 45–66.
- Claudia, C. (2023). EKSPRESI ALFA-AMILASE *Saccharomycopsis fibuligera* R64 MUTAN DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 1,5%. Bandung.
- Destiana, E. (2023). EKSPRESI α -AMILASE (*Saccharomycopsis fibuligera*) R64 MUTAN DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 0,75% DAN 1%. Bandung.
- Fitriani, Sri Zelviani, dan S. (2021) 'Jurnal fisika dan terapannya', *Jurnal Fisika dan terapannya*, 7(2020), pp. 139–148.
- Gaffar, S. *et al.* (2019) 'Combination of genetic manipulation improved *saccharomycopsis fibuligera* α -amylase secretion by *pichia pastoris*', *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(2), pp. 305–318.
- Huang, Y., Chen, M., Zhou, Y., Zhan, Y., & Liu, C. (2021) 'Advances in protein purification using metal affinity chromatography.', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, pp. 661–978.
- Jain, T., Jahn, M., & Sun, T. (2021) 'Biophysical characterization of protein therapeutics using advanced chromatography methods under native conditions.', *Journal of Chromatography A*, 16(36), pp. 461–788.
- Kumar, A., Patel, J., & Rathod, K. (2018) 'Nickel-sepharose as an affinity matrix for His-tagged proteins purification', *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 55(1), pp. 10–18.
- Lim, S.J., Hazwani-Oslan, S.N. and Oslan, S.N. (2020) *Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor; b: Enzyme and Microbial Technology Research Centre, 43400 UPM Serdang.*
- Pacholarz, K. J., Garlish, R. A., Taylor, R. J., & Barran, P.E. (2017) 'Mass Spectrometry Coupled Experiments and Protein Structure Modeling Methods', *Journal of the American Society*, 28(1), pp. 929–944.
- Putri, A.W. (2023) 'Pengukuran Kualitas Citra Menggunakan Aplikasi ImageJ pada Gambaran Vertebra Lumbosacral dengan Proyeksi

- Lateral Posisi Supine Kasus Low Back Pain (LBP)', *Jurnal Imejing Diagnostik (JImeD)*, 9(2), pp. 103–111.
- Rahayu, A., Andi mustari, A. pramutadi and Amir, B. (2023) 'Analisis Image Processing pada Prasasti Teroksidasi Ayam Téas I', *PURBAWIDYA: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Arkeologi*, 12(2), pp. 206–215.
- Rahmasari, D., Pujiyanto, S. and Rahmani, N. (2016) 'Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri Laut *Arthrobacter arilaitensis* LBF-003 (Partial Purification and Characterization Amylase from Marine Bacterium *Arthrobacter arilaitensis* LBF-003)', *Biologi Indonesia*, 12(1), pp. 129–136.
- Safitri, N.L. (2022) *PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM ALFA-AMILASE DARI *Aspergillus fumigatus* DENGAN PENAMBAHAN GLUTARALDEHID*. Bandar Lampung.
- Setyoadji, W.A., Sulistyaningsih, E. and Kusuma, I.F. (2021) 'Optimized Expression Condition of CIDR α -PfEMP1 Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21(DE3): A Step to Develop Malaria Vaccine Candidate', *Research Journal of Life Science*, 8(1), pp. 15–24.
- Sharma, P., & Kalonia, D.S. (2018) 'Biophysical approaches for evaluating protein stability under native conditions.', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(1), pp. 170–182.
- Shemesh, P. and Fishman, A. (2024) 'Optimal fermentation conditions for growth and recombinant protein production in *Pichia pastoris*: Strain selection, ploidy level and carbon source', *Current Research in Food Science*, 9(April), pp. 100840.
- Singh, V., Upadhyay, A., & Panda, A. (2020) 'Process optimization and characterization of recombinant alpha-amylase production in native conditions.', *Process Biochemistry*, 94, pp. 201–209.
- Yagmur, U. *et al.* (2024) 'Komagataella phaffii (*Pichia pastoris*) as a Powerful Yeast Expression System for Biologics Production', *Frontiers in Bioscience Elite*, 16(2), pp 19.
- Yandri, Y. *et al.* (2020) 'PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM α -AMILASE DENGAN PENAMBAHAN GLISEROL', *ANALIT: ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL CHEMISTRY*, 5(02), pp. 143–154.