



**PEMURNIAN PROTEIN ALFA-AMILASE  
*Saccharomycopsis fibuligera* R64 MUTAN YANG  
DIEKSPRESIKAN DALAM INANG *Pichia pastoris*  
MELALUI KROMATOGRAFI AFINITAS  
DENGAN KONDISI DENATURASI**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**SINTYA BUNGAN SOMA LANGI  
A223021**



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


**PEMURNIAN PROTEIN ALFA-AMILASE  
*Saccharomycopsis fibuligera* R64 MUTAN YANG  
DIEKSPRESIKAN DALAM INANG *Pichia pastoris*  
MELALUI KROMATOGRAFI AFINITAS  
DENGAN KONDISI DENATURASI**

**SINTYA BUNGAN SOMA LANGI  
A223021**

**Oktober 2024**

**Disetujui oleh :**

**Pembimbing**



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

**Pembimbing**



**Irma Mardiah, M.Si**

Kutipan atau saduran baik sebagai ataupun seluruh naskah, harus menyebutkan nama pengarang dan sumber aslinya, yaitu Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia

Dengan penuh ucapan Syukur penulis ucapkan kepada **Tuhan Yesus Kristus**, karena atas berkat dan anugerahnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulis mempersembahkan skripsi ini kepada kedua orang tua saya **Bapa Yunus Toding dan Mama Dorkas Ratte Kua**. Segala perjuangan hingga sampai titik ini saya persembahkan kepada orang yang paling berharga dalam hidup saya. Terima kasih karena selalu ada dalam suka dan duka, dalam untung dan malang, dikala sehat maupun sakit.

## ABSTRAK

Alfa-amilase merupakan enzim yang dapat memecah pati menjadi gula dan banyak digunakan di industri, khususnya industri berbasis pati yang memiliki massa molekul ~54 kDa. Teknologi DNA rekombinan merupakan alternatif untuk memproduksi alfa-amilase. Pada tahap ekspresi digunakan inang *Pichia pastoris* karena memiliki tingkat ekspresi yang tinggi dan modifikasi pasca translasi. Pemurnian protein rekombinan merupakan salah satu cara untuk mendapatkan enzim dalam bentuk yang aktif dan murni. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemurnian protein alfa-amilase yang diperoleh setelah dimurnikan dengan kromatografi afinitas dalam kondisi terdenaturasi. Metode penelitian yang dilakukan adalah ekspresi Sfamy R64 mutan dengan konsentrasi penginduksi metanol 1,5% selama 144 jam, kemudian mengkarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE, memurnikan protein dengan kromatografi afinitas pada kondisi denaturasi, menentukan kemurnian dan mengukur intensitas pita protein menggunakan *software* ImageJ. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa keberadaan alfa-amilase setelah dimurnikan ditunjukkan dengan pita tunggal berukuran sekitar ~48 kDa berdasarkan SDS-PAGE dengan intensitas pita sebesar 187,35. Kemurnian protein dalam sampel mencapai 1,44 % yang menunjukkan keberhasilan pemurnian enzim alfa-amilase.

**Kata kunci:** Alfa-amilase, *Pichia pastoris*, Pemurnian Kromatografi Afinitas, SDS-PAGE, *Software* ImageJ

## ***ABSTRACT***

Alpha-amylase is an enzyme that can break down starch into sugar and is widely used in industry, especially starch-based industries which has a molecular mass of ~54 kDa. Recombinant DNA technology is an alternative to produce alpha-amylase. At the expression stage, *Pichia pastoris* host was used because it has a high level of expression and post-translational modification. Purification of recombinant proteins is one way to obtain enzymes in an active and pure form. The aim of this study was to determine the purity of alpha-amylase protein obtained after purification by affinity chromatography under denatured conditions. The research method used was the expression of Sfamy R64 mutant with a methanol inducer concentration of 1.5% for 144 hours, then characterizing it with SDS-PAGE electrophoresis, purifying the protein with affinity chromatography under denaturing conditions, determining the purity and measuring the intensity of the protein band using ImageJ software. The results of this study indicate that the presence of alpha-amylase after purification is indicated by a single band measuring around ~48 kDa based on SDS-PAGE with a band intensity of 187.35. The purity of the protein in the sample reached 1,44% which indicates the success of the purification of the alpha-amylase enzyme.

***Keywords:*** *Alpha-amylase, Pichia pastoris, Affinity Chromatography Purification, SDS-PAGE, ImageJ Software*





## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan YME atas segala rahmat dan karunia-Nya yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Strata Satu (S1) pada Program Studi Farmasi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STFI) Bandung.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Umi Baroroh, S.Si.,M.Biotek dan Ibu Irma Mardiah, M.Si, selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, nasehat, dukung, semangat serta masukan yang sangat berharga selama proses penulisan skripsi ini.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis menyadari bahwa tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak akan sulit dalam menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Untuk itu dengan kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. apt. Adang Firmansyah, M.Si., selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
2. Dr. apt. Diki Prayugo Wibowo, M.Si., selaku Wakil Ketua I Bidang Akademik Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
3. Dr. apt. Wiwin Winingsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,
4. Dr. Syarif Hamdani, M.Si., selaku Dosen Wali selama perkuliahan di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
5. Seluruh staf dosen, asisten laboratorium, staf administrasi, serta jajaran karyawan yang turut memberikan ilmu serta bantuan selama perkuliahan,
6. Kepada Kakak dan adik saya tercinta yang selalu menyemangati dan selalu menjadi motivasi penulis dalam mewujudkan semua cita-cita dan harapannya. Terus tumbuh menjadi versi paling hebat,
7. Teristimewa kepada cinta pertama saya, Bapak Yunus Toding dan Mama tercinta Dorkas Ratte Kua, orangtua hebat yang selalu senantiasa menjadi penyemangat saya sebagai sandaran terkuat dari kerasnya dunia.
8. Kepada M.Bayu, Terimakasih banyak selalu memberikan doa, semangat, dukungan serta pengertian dan perhatian yang tulus dan terimakasih selalu ada dalam kondisi apapun.

Dalam penulisan skripsi ini jauh dari kata sempurna oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati diharapkan masukan berupa saran dan kritik yang bersifat membangun untuk menyempurnakan penelitian ini. Semoga Tuhan YME senantiasa memberikan rahmat dan berkah-Nya kepada kita semua. Amin.

Bandung, 06 Oktober 2024

Penulis

## DAFTAR ISI

ABSTRAK .....	i
<i>ABSTRACT</i> .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB I PENDAHULUAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1 Latar Belakang.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2 Identifikasi Masalah .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3 Tujuan Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4 Kegunaan Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1 Enzim Alfa-amilase .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 Pemurnian dengan Kromatografi Afinitas Histag.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4 SDS PAGE .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB III TATA KERJA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Alat .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Bahan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3 Metode Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.1 Alur Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.2 Ekspresi Alfa-amilase.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.3 Uji Karakteristik dengan Metode SDS PAGE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.4 Pemurnian Alfa-amilase pada Kondisi Denaturasi .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.5 SDS-PAGE Pewarnaan Perak ProteoSilver.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.6 Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Ekspresi Alfa-amilase.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2 Karakterisasi Protein dengan SDS-PAGE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3 Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4 Pemurnian Protein pada Kondisi Denaturasi ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
BAB V <u>SIMPULAN</u> DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.1 Simpulan.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR PUSTAKA .....	39
LAMPIRAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Komposisi Separating Gel Poliakrilamid 15% .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Komposisi Stacking Gel Poliakrilamid 5% ...	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3 Komposisi larutan Buffer A.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4 Komposisi larutan Buffer B .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Uji Aktivitas Enzim dengan Metode Fuwa .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur 3D dari enzim alfa-amilase. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 Peta plasmid pPICZalfa-A-Sfamy R64. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 Skema SDS-PAGE.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi Amilase .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi <i>P. Pastoris</i> kosong....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.3 Grafik Aktivitas Kurva Alfa-amilase .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.4 Grafik Aktivitas Kurva <i>P. pastoris</i> kosong.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.5 SDS-PAGE hasil pemurnian menggunakan silverprotein	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi kegiatan penelitian .....	38
2. Hasil Uji aktivitas metode fuwa .....	40
3. Perhitungan Pembuatan larutan .....	41
4. Perhitungan Konsentrasi Metanol 1,5% .....	42
5. Hasil Kemurnian Protein Menggunakan <i>Software</i> ImageJ.....	43

## DAFTAR PUSTAKA

- Algofar, M. A. A., Rosmansyah, H. F., Rum, I. A., Muhsinin, S., & Fatmawati, F. (2021). Artikel Review: Study  $\alpha$ -Amilase dari mikroba serta pemanfaatannya dalam pembuatan Maltodekstrin. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 6(1), 102-117.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2020). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8309-8321.
- Amalia, R., Ismaya, W. T., Puspasari, F., Hasan, K., Subroto, T., Natalia, D., & Soemitro, S. (2016). Heterologous expression of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* R64 and its Tyr401Trp mutant in *Pichia pastoris*. *Microbiology Indonesia*, 10(1), 4.
- Atmaja, D. S., & Khairul, W. (2013). Isolasi, Purifikasi Dan Karakterisasi  $\alpha$ -Amilase Dari *Trichoderma Viride* FNCC 6013. *Chemical Information*, 1(1), 85-93.
- Baroroh, U., Kusumawardhani, S., Novianti, M. T., Yusuf, M., Mardiah, I., & Azhari, R. N. (2022). Desain Peta Plasmid Pengkode  $\alpha$ -Amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Mutan dan Pemodelan Struktur Protein. *Chimica et Natura Acta*, 10(3), 100-105.
- Baroroh, Umi, S.K. et al. (2018) 'Desain Peta Plasmid Pengkode  $\alpha$ -Amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Mutan dan Pemodelan Struktur Protein', *Chimica et Natura Acta*, 6(3), pp. 127–135.
- Bollok, M. et al. (2009) 'Recent Patents on the *Pichia Pastoris* Expression System: Expanding the Toolbox for Recombinant Protein Production', *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), pp. 192–201.
- De Marco, A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 1-17.
- Hasan, K., Tirta Ismaya, W., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., & Soemitro, S. (2008). Proteolysis of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: characterization of digestion products. *Biologia*, 63, 1044-1050.
- Howard, Wahyuni. (2015). Pengujian Aktivitas Enzim  $\alpha$ -Amilase.
- Juariah, S. (2021). Media Alternatif Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dari Biji Durian (*Durio Zibethinus murr*). *Meditory: The Journal of Medical Laboratory*, 9(1), 19–25.
- Kit, T.A.E. (2004) 'Easy Select TM *Pichia* Expression Kit', InvitrogenTM, 25-0172.
- Lebendiker, M. (2002). 'Bradford-Protein Determination'. Faculty of Science, The Hebrew University of Jerusalem.



- Krainer, F. W., & Glieder, A. (2021). Advances in functional expression of multi-domain proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Journal*, 16(1), 1900516.
- Manns, J.M. (2011) 'SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins', *Current Protocols in Microbiology*, (SUPPL. 22), pp. 1–13.
- Martius, E., Triyadi, A., Sofia, D. Y., & 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
- Nasution, U. J., Wijaya, S. M., Wibisana, A., Safarrida, A., Rachmawati, I., Puspitasari, D. J., & Wulyoadi, S. (2018). Pemurnian enzim sefalosporin-C asilase dan optimasi proses kromatografi penukar ion. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 5(2), 119-126.
- Nelson, D. L., Cox, M., & Hoskins, A. A. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (Eighth edi). Macmillan Learning.
- Ningtyas, N., Mubarik, N. R., & Rahayuningsih, M. (2023). Penapisan dan Karakterisasi Amilase dari Bakteri Asal Ekoenzim. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 28(3), 441-448.
- Purnawan, A., Capriyanti, Y., Kurniatin, P. A., & Rahmani, N. (2016). Optimasi Produksi Enzim Amilase dari Bakteri Laut Jakarta (*Arthrobacter arilaitensis*). *Jurnal Biologi Indonesia*, 11(2).
- Raul, D., Biswas T., Mukhopadhyay, S., Das, S. K., and Gupta, S., 2014, Production and Partialpurification of Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (mtcc 121) Using Solid State Fermentation, *Biochem. Research Int.*, 1–5.
- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.
- Schneider, C. A., (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nature Methods*, 9(7), 671-675.
- Su, C., (2016). "Purification and characterization of recombinant alpha-amylase from *Pichia pastoris* using immobilized metal affinity chromatography under denaturing conditions." *Journal of Biotechnology*, 231, 1-7.
- Tazkiah, N. P., Rosahdi, T. D., & Supriadin, A. (2017). Isolasi dan Karakterisasi Enzim Amilase dari Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus*). *al Kimiya: Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*, 4(1), 17-22.
- Winarno, F. (2010). 'Enzim Pangan'. M-Brio Press.