

**EKSPRESI ALFA-AMILASE *Saccharomycopsis fibuligera* R64 MUTAN  
DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN  
KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 1,5%**

**SKRIPSI**

**CLARA CLAUDIA  
A 191 010**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG  
2023**

**EKSPRESI ALFA-AMILASE *Saccharomyopsis fibuligera* R64 MUTAN  
DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN  
KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 1,5%**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**CLARA CLAUDIA  
A 191 010**



**SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
YAYASAN HAZANAH  
BANDUNG  
2023**

**EKSPRESI ALFA-AMILASE *Saccharomyopsis fibuligera* R64 MUTAN  
DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN  
KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 1,5%**

**CLARA CLAUDIA  
A 191 010**

**Agustus 2023**

**Disetujui oleh:**

**Pembimbing**

**Pembimbing**

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

**Dr. apt. Dewi Astriany, M. Si**

## **KUTIPAN**

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

Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua saya Bapa (Romanus Rusdi) dan Ibu (Nursiah). 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. Dan untuk teman-teman yang telah berjuang bersama terima kasih karena kalian selalu ada sebagai pendengar keluh kesah selama penyusunan skripsi ini.

## ABSTRAK

Alfa-amilase adalah enzim yang banyak digunakan di industri, khususnya industri berbasis pati yang memiliki massa molekul ~54 kDa. Telah digunakan sebagai penghantaran terapi sebagai obat membantu pencernaan yang memiliki efek antiinflamasi. *Saccharomycopsis fibuligera* R64 telah teridentifikasi sebagai ragi penghasil alfa-amilase yang memiliki aktivitas amilolitik terbaik, sayangnya belum mampu mendegradasi pati mentah. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah membuat enzim ini memiliki absorptivitas yang tinggi terhadap substrat. Desain struktur *Sfamy* R64 mutan dengan menambahkan sisi pengikatan di permukaan secara *in silico* sebelumnya sudah dilakukan. Oleh karena itu, dibutuhkan alfa-amilase yang mampu memecah pati mentah pada suhu yang lebih rendah untuk menurunkan biaya produksi. 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. Tujuan penelitian ini adalah ekspresi *Sfamy* R64 mutan pada inang *P. pastoris* dan mengkarakterisasi serta menguji aktivitasnya. Metode penelitian yang dilakukan adalah ekspresi *Sfamy* R64 mutan dengan konsentrasi penginduksi metanol 1,5% selama 144 jam, kemudian mengkarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE dan menguji aktivitasnya dengan metode Fuwa. Hasil dari penelitian ini adalah *Sfamy* R64 mutan dapat terekspresikan dengan adanya pita pada elektroforesis SDS-PAGE dengan berat molekul ~54 kDa dan memiliki aktivitas paling tinggi pada waktu induksi 0 jam dengan aktivitas 25.31 U/mL.

Kata kunci: Alfa-amilase, *Sfamy* R64 mutan, *Pichia pastoris*, SDS-PAGE, metode Fuwa

## ABSTRACT

*Alpha-amylase is an enzyme that is widely used in industry, especially in starch-based industries which has a molecular mass of ~54 kDa. It has been used as a therapeutic delivery as a digestive aid that has anti-inflammatory effects. Saccharomycopsis fibuligera R64 has been identified as an alpha-amylase producing yeast that has the best amyolytic activity, unfortunately it has not been able to degrade raw starch. One effort that can be done is to make this enzyme have a high absorptivity of the substrate. Sfamy R64 mutant structural design by adding an in silico surface binding site has previously been carried out. Therefore, alpha-amylase is needed which is able to break down raw starch at lower temperatures to reduce production costs. 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. The aim of this study was the expression of mutant Sfamy R64 in P. pastoris hosts and to characterize and test its activity. The research method used was the expression of mutant Sfamy R64 with an inducing concentration of 1.5% methanol for 144 hours, then characterized by SDS-PAGE electrophoresis and tested for its activity by the Fuwa method. The results of this study were that the Sfamy R64 mutant could be expressed in the presence of a band on SDS-PAGE electrophoresis with a molecular weight of ~54 kDa and had the highest activity at induction time of 0 hours with an activity of 25.31 U/mL.*

*Keywords: Alpha-amylase, Sfamy R64 mutant, Pichia pastoris, SDS-PAGE, Fuwa method*

## 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 seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih kepada Ibu Umi Baroroh, S.Si., M. Biotek dan Ibu Dr. apt. Dewi Astriany, 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. Oleh karena itu dengan kerendahan hati, penulis ingin 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 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. apt. Hesti Riasari, 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. Orang tua serta keluarga yang memberikan dukungan, semangat, serta doa untuk penulis selama menyelesaikan skripsi ini,
7. Untuk sahabat tercinta Fidelia Raisa yang selalu ada selama masa kuliah dan Elsa Destiana yang turut membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini serta rekan-rekan mahasiswa angkatan 2019 yang sama-sama berjuang menyelesaikan studi di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
8. Untuk Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) 2023 yang diselenggarakan oleh Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah turut mendanai selama masa penelitian dalam skripsi ini.

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 perbaikan di masa yang akan datang. Semoga Tuhan YME senantiasa memberikan rahmat dan berkah-Nya kepada kita semua. Amin.



Bandung, Agustus 2023

Penyusun

## DAFTAR ISI

LEMBARAN PENGESAHAN .....	i
KUTIPAN .....	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN.....	iii
ABSTRAK .....	iv
<i>ABSTRACT</i> .....	v
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Identifikasi Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Kegunaan Penelitian.....	2
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian .....	3
BAB II TINJUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Enzim Alfa-amilase .....	4
2.2 Sistem Ekspresi <i>Pichia pastoris</i> .....	6
2.3 Media Pertumbuhan dan Ekspresi <i>Pichia Pastoris</i> .....	7
2.4 Vektor Ekspresi untuk <i>Pichia pastoris</i> .....	10
2.6 Karakterisasi Protein Melalui SDS-PAGE.....	10
2.7 Uji Aktivitas Alfa-amilase Menggunakan Metode Fuwa.....	11
BAB III TATA KERJA .....	12
3.1 Alat.....	12
3.2 Bahan .....	12
3.3 Metode Penelitian.....	12
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	16
BAB V SIMPULAN DAN ALUR PENELITIAN SELANJUTNYA.....	21
5.1 Kesimpulan .....	21
5.2 Alur Penelitian Selanjutnya .....	21
DAFTAR PUSTAKA .....	22
LAMPIRAN.....	24

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur alfa-amilase .....	5
Gambar 2.2 Peta plasmid pPICZ $\alpha$ -A- <i>Sfamy</i> R64 .....	10

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Media Ekspresi <i>Pichia pastoris</i> .....	9
Tabel 3.1 Komposisi Separating Gel Poliakrilamid 12% .....	13
Tabel 3.2 Komposisi <i>Stacking</i> Gel Poliakrilamid 5% .....	13

## DAFTAR LAMPIRAN

Gambar 4.1 Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi Amilase Galur SMD1168.....	17
Gambar 4.2 Elektroforegram SDS-PAGE supernatan hasil ekspresi <i>P. Pastoris</i> kosong Galur SMD1168.....	17
Table 4.1 Uji Aktivitas Enzim dengan Metode Fuwa.....	18
Gambar 4.3 Grafik aktivitas amilase.....	18
Gambar 4.4 Grafik <i>Pichia pastoris</i> Kosong.....	19

## DAFTAR PUSTAKA

- 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.
- Baroroh, U. *et al.* (2019) 'Molecular dynamics study to improve the substrate adsorption of Saccharomycopsis fibuligera R64 alpha-amylase by designing a new surface binding site', *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 12, pp. 1–13.
- 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.
- 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.
- Chi, Zhenming *et al.* (2009) 'Saccharomycopsis fibuligera and its applications in biotechnology', *Biotechnology Advances*, 27(4), pp. 423–431.
- De Schutter, K., *et al.* (2009) 'Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris' *Nat. Biotechnol.*
- Fuwa, H. (1954) 'A New Method for Microdetermination modified method of that described by Mc Cready', *J. Biochem.*, 41(5), pp. 583–603.
- Gaffar, S. (2010) 'Produksi Protein Rekombinan dalam Sistem Ekspresi Pichia pastoris', *UNPAD Press*, Bandung
- Gaffar, S. *et al.* (2019) 'Combination of genetic manipulation improved saccharomycopsis fibuligera  $\alpha$ -amylase secretion by pichia pastoris', *Indonesian Journal of Chemistry*, 19(2), pp. 305–318.
- Herawati, N, *et al.* 2018 'Pichia pastoris: Sel Ragi Untuk Produksi Protein Rekombinan', *E-Journal Biologi*, Vol 17 No 2.
- Howard, W. (2015) 'Pengujian aktivitas enzim amilase', *ITB Press*, Bandung, 10(02), pp. 1–12.
- Kit, T.A.E. (2004) 'EasySelect™ Pichia Expression Kit', *Invitrogen™*, 25-0172.
- Manns, J.M. (2011) 'SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins', *Current Protocols in Microbiology*, (SUPPL. 22), pp. 1–13.
- Novianti, Mia Tria. 2016 'Eksresi Human Albumin Rekombinan (rHA) dalam Inang Pichia pastoris Galur SMD1168', *UNPAR PRESS*, Bandung.
- De Souza, P.M. and e Magalhães, P. de O. (2010) 'Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry - a review', *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), pp. 850–861.
- Stoscheck, C.M. (1990) 'Increased uniformity in the response of the Coomassie blue G protein assay to different proteins', *Analytical Biochemistry*, 184(1), pp. 111–116.
- Tazkiah, N.P., Rosahdi, T.D. and Supriadin, A. (2019) 'Isolasi dan Karakterisasi

- Enzim Amilase dari Biji Nangka (*Artocarpus heterophyllus*)', *al-Kimiya*, 4(1), pp. 17–22.
- Weinacker, D. *et al.* (2013) 'Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry', *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), pp. 1043–1048.
- Zhu, W. *et al.* (2021) 'Medium optimization for high yield production of human serum albumin in *Pichia pastoris* and its efficient purification', *Protein Expression and Purification*, 181 (2021) 105831.