

**EKSPRESI α -AMILASE (*Saccharomyces fibuligera*) R64
MUTAN DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168
DENGAN KONSENTRASI PENGINDUKSI
METANOL 0,75% DAN 1%**

SKRIPSI

**ELSA DESTIANA
A191016**



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

**EKSPRESI α -AMILASE (*Saccharomyces fibuligera*) R64
MUTAN DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168
DENGAN KONSENTRASI PENGINDUKSI
METANOL 0,75% DAN 1%**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

**ELSA DESTIANA
A191016**



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

**EKSPRESI α -AMILASE (*Saccharomycopsis fibuligera*) R64 MUTAN
DALAM INANG *Pichia pastoris* GALUR SMD1168 DENGAN
KONSENTRASI PENGINDUKSI METANOL 0,75% DAN 1%**

**ELSA DESTIANA
A191016**

Agustus 2023

Disetujui oleh :

Pembimbing

Pembimbing

Umi Baroroh, S.Si, M.Biotek

Dr.apr.Dewi Astriany, M.Si

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

Kupersembahkan skripsi ini untuk Almarhum papah, mamah, dan saudaraku tercinta yang telah senantiasa mendoakan dimanapun dan kapanpun serta telah memberikan dukungan baik mental maupun material. Terimakasih telah selalu ada disetiap perjuanganku hingga saat ini.

ABSTRAK

Enzim Amilase merupakan enzim yang memecah pati menjadi gula. Proses pencernaan pati dimulai dimulut, dimana α -amilase mulai menguraikan pati menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. *Sfamy* R64 mutan memiliki energi interaksi yang lebih baik dari pada natif sehingga menghasilkan substrat yang lebih baik. Pertumbuhan enzim α -amilase dari ragi *Sfamy* R64 mutan dalam inang *P.pastoris* galur SMD1168 dengan variasi konsentrasi penginduksi metanol, yaitu 0,75% dan 1%. Tujuan penelitian ini adalah mengekspresikan *Sfamy* R64 mutan pada *P.pastoris* dengan konsentrasi penginduksi metanol 0,75% dan 1% sehingga mendapatkan konsentrasi yang optimum. Hasil ekspresi dikarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE dan aktivitas enzim diukur dengan menggunakan metode Fuwa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Sfamy* R64 mutan dapat terekspresikan pada kedua kondisi yang ditunjukkan dengan pita SDS-PAGE pada ~54kDa. Hasil ekspresi pada konsentrasi metanol 1% menghasilkan tingkat ekspresi yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 0,75%. Dan pada uji aktivitas menggunakan metode Fuwa didapatkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi penginduksi 0,75% sebesar 20511.67 U/mL pada waktu t_{96} dan pada konsentrasi 1% sebesar 11079.08 U/mL pada waktu t_{120} . Sehingga, pada penelitian ini konsentrasi penginduksi metanol 1% lebih optimum dibanding 0,75%. Hasil ini dapat digunakan sebagai referensi pada produksi *Sfamy* R64 mutan.

Kata Kunci : α -Amilase, Metanol, SDS-PAGE, FUWA

ABSTRACT

Amylase enzyme is an enzyme that breaks down starch into sugar. The process of starch digestion begins in the mouth, where α -amylase begins to break down starch into smaller fragments. Sfamy R64 mutant has better interaction energy than native so it produces a better substrate. Growth of the α -amylase enzyme from the yeast Sfamy R64 mutant in the host P.pastoris strain SMD1168 with varying concentrations of methanol inducers, namely 0.75% and 1%. The aim of this study was to express the mutant Sfamy R64 in P.pastoris with 0.75% and 1% methanol inducing concentrations so as to obtain optimum concentrations. The expression results were characterized by SDS-PAGE electrophoresis and the enzyme activity was measured using the Fuwa method. The results showed that the Sfamy R64 mutant could be expressed in both conditions as indicated by the SDS-PAGE band at ~54kDa. The expression results at 1% methanol concentration resulted in a higher expression level compared to 0.75% concentration. And in the activity test using the Fuwa method, the highest activity was found at an inducing concentration of 0.75% at 20511.67 U/mL at the time of t96 and at a concentration of 1% at a concentration of 11079.08 U/mL at the time of t120. So, in this study the concentration of methanol inducer was 1% more optimal than 0.75%. These results can be used as a reference for the production of mutant Sfamy R64.

Key words : *α -Amylase, Methanol, SDS-PAGE, FUWA*

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 **“Ekspresi α -Amilase (*Saccharomycopsis fibuligera*) R64 Mutan Dalam Inang *Pichia pastoris* Galur SMD1168 Dengan Konsentrasi Penginduksi Metanol 0,75% DAN 1%”**.

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

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing ibu Umi Baroroh, S.Si, M.Biotek dan ibu Dr.apr.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. Dr. apt. Hesti Riasari, M.Si., selaku Dosen wali yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis,
5. Seluruh staff dosen, staf administrasi, serta karyawan Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia,
6. Semua pihak yang namanya tidak dapat diucapkan satu persatu yang telah memberikan perhatian dan dukungannya dalam menyelesaikan skripsi ini, sahabat-sahabat angkatan 2019 yang telah memberikan inspirasi, dukungan, dan kegembiraan selama penulis kuliah di Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia.
7. Untuk Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) 2023 yang diselenggarakan oleh Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah turut mendanai selama masa penelitian dalam skripsi ini.

Dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kesalahan dan kekurangan karena pengetahuan yang masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dengan segala 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, Agustus 2023

Penuli

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
LEMBAR KUTIPAN.....	ii
LEMBAR PERSEMBAHAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
<i>ABSTRACT</i>	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GRAFIK.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Enzim α -Amilase	4
2.2 Sistem Ekspresi	6
2.3 Penginduksi Metanol	9
2.4 Media Pertumbuhan	10
2.5 Metode SDS-PAGE	10
2.6 Metode FUWA	11
BAB III TATA KERJA	12
3.1 Alat	12
3.2 Bahan	12
3.3 Metode Penelitian.....	12
3.3.1 Ekspresi α -amilase oleh <i>P. pastoris</i>	12
3.3.2 Metode SDS PAGE	13
3.3.3 Uji Aktivitas dengan Metode FUWA	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Ekspresi α -amilase dan <i>P.Pastoris</i> Kosong.....	15
4.2 Karakterisasi Protein dengan Elektroforesis SDS-PAGE.....	15
4.3 Uji Aktivitas dengan Metode Fuwa.....	19
BAB V HASIL DAN SIMPULAN.....	23
DAFTAR PUSTAKA.....	17
LAMPIRAN.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur 3D dari enzim α -amilase.....	5
2.2 Sistem ekspresi <i>Pichia pastoris</i>	6
2.3 Diagram vektor pPICZ α	7
2.4 Skema SDS-PAGE.....	11
4.1 Elektroforegram α -amilase Penginduksi metanol 0,75%	17
4.2 Elektroforegram <i>P.pastoris</i> kosong Penginduksi metanol 0,75%.....	18
4.3 Elektroforegram α -amilase Penginduksi metanol 1%.....	18
4.4 Elektroforegram <i>P.pastoris</i> kosong Penginduksi metanol 1%.....	19

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Galur sel <i>P. pastoris</i>	8
3.1 Komposisi <i>Separating</i> Gel Poliakrilamid 12%.....	14
3.2 Komposisi <i>Stacking</i> Gel Poliakrilamid 5%.....	14
4.1 Uji Aktivitas menggunakan metode fuwa dengan konsentrasi 0,75%.....	20
4.2 Uji Aktivitas menggunakan metode fuwa dengan konsentrasi 1%.....	21

DAFTAR GRAFIK

Grafik	Halaman
4.5 Grafik Aktivitas Sampel dengan penginduksi metanol 0,75%.....	20
4.6 Grafik Aktivitas Sampel dengan penginduksi metanol 1%.....	21

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gel Karakterisasi Menggunakan SDS-PAGE.....	28
2. Perhitungan Uji Aktivitas Dengan Metode Fuwa.....	29

DAFTAR PUSTAKA

- Abootalebi, S. N., Saeed, A., Gholami, A., Mohkam, M., Nezafat, N., Mousavi, S. M., & Hashemi, S. A. (2020). 'Screening , Characterization and Production of Thermostable Alpha-Amylase Produced by a Novel Thermophilic Bacillus megaterium Isolated from Pediatric Intensive Care Unit'. *Journal of Environmental Treatment Techniques*. 8(3), 952–960.
- Abrar, T. (2017). 'Bacterial Protease Enzyme : Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use'. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*. 3(1):2351-7372, pp. 1-10
- Baroroh, U., et al. (2022). 'Desain Peta Plasmid Pengkode α -Amilase Saccharomycopsis fibuligera R64 Mutan dan Pemodelan Struktur Protein'. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 3:100-105.
- Bollag, D.M, Royzycki, M.D., and Edelstein, S.J. (1996). 'Protein Methods'. *Willey-Liss, inc*
- Bollag, D.M., Michael, R.D., and Stuwart, E.J. (1997). 'Protein Methods (Second ed)'. *Willey-Liss, Inc*
- Bradford, M. M. (1976). 'A Rapid and Sensitive Method fot the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding'. *Crop Journal*, 5(5), 248–254.
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). 'Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris'. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
- Gaffar, S. (2010). 'Produksi Protein Rekombinan dalam Sistem Ekspresi Pichia pastoris'. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* (Vol. 53, Issue 9).
- Glick, B.R dan J.J. Pasternak. (2003). 'Molecular Biotechnology'. *ASM Press: Washington, DC* 20036-2904
- Fuwa, H. (1954). 'A New Method for Microdetermination of Amylase Activitu by the Use of Amylase as the Substrate'. *The Journal of Biochemistry*. 41(5):583-603
- Hamdani, (2008). 'Deteksi dan Produksi Amilase'. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2), 1022-1029.
- Hasan, K., Ismaya, W.T., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Subroto, T., Soemitro, S. (2008). 'Proteolysis of α -amylase from Saccharomycopsis fibuligera: characterization of digestion products'. *Biologia*. 63(6): 1044-1050.
- Herawati, N., Arizah, K, dan Adi, S., (2018). 'Pichia Pastoris : Sel Ragi Untuk Produksi Protein Rekombinan'. *Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Indonesia*, 17(2)
- Inan, M., Meagher, M.M. (2001). 'Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of Pichia pastoris'. *J. Biosci. Bioengng* 92: 585–

589.

- Invitrogen. (2014). 'EasySelect™ Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in Pichia pastoris'. *Life Technologies*, 25, 1–95
- Irdawati, dan Mades Fifendy. (2011). 'Isolasi Bakteri Termofilik Penghasil Amilase dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman'. *Skripsi, Universitas Negeri Padang*.
- Karnwal, A., & Nigam, V. (2013). 'Production of Amylase Enzyme by Isolate Microorganisms and it's Application'. *Research Article Biological Sciences* 3(4):354-360
- Kit, T. A. E. (2004). 'Expression Kit'. *Control, May*.
- Kumar, P. and Satyanarayana, T. (2014). 'Microbial Glucoamylases: Characteristics and Applications'. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29(3): 225-255
- Lebendiker, M. (2002). 'Bradford-Protein Determination'. *Faculty of Science, The Hebrew University of Jerusalem*
- Manns, J.M. (2001). 'SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Protein. Current Protocols in Microbiologi', 22(1), A.3M.1-A.3M.13. doi:10.1002/9780471729259.mca03
- Nangin, D., & Sutrisno, A. (2015). 'Enzim Amilase Pemecah Pati Mentah dari Mikroba : Kajian Pustaka Raw Starch Degrading Amylase Enzyme from Microbes'. *A Review*. 3(3), 1032–1039.
- Pangastuti, A, Wahjuningrum, D, & Suwanto, A, (2002). 'Isolasi, karakterisasi dan kloning gen penyandi alfa-amilase bakteri halofil moderat asal bledug kuwu'. *Hayati*. 9(1). hh. 10-14.
- Patrick, S.M., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M., (2005). 'Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system'. *Yeast*, 22, pp. 249–270.
- Pingzuo, L., Anukanth, A., Xiu, GG., Kuppusamy, I., Vincent, VS., Nejat, D., V. Renugopalakrishnan. (2006). 'Expression of recombinant Proteins in Pichia pastoris'. *Appl Biochem Biotechnol*, 142, 105-124
- Setiasih, S., Wahyuntari, B., Trismilah, dan Apriliani, D., (2007). 'Karakterisasi Enzim α -Amilase Ekstrasel dari Isolat Bakteri Termofil SW2'. *Jurnal Kimia Indonesia*, 1(1), 22-27.
- Shen, W., Xue, Y., Liu, Y., Kong, C., Wang, X., Huang, M., Cai, M., Zhou, X., Zhang, Y. and Zhou, M., (2016). 'A novel methanol free Pichia pastoris system for recombinant protein expression'. *Microbial Cell Factories*, 15 (178), pp. 1–11
- Stoscheckk. C.M. (1990). Increased Uniformity in the Response of the Coomassie Blue Protein Assay to Different Protein. *Analytical Biochemistry*. 18(4):111-116
- Sumardjo, D. (2009). 'Pengantar Kimia Buku Panduan Kuliah Mahasiswa

- Kedokteran dan Program Strata 1 Fakultas Bioeksakta'. Jakarta: EGC
- Trabelsi, S., Sahnoun, M., Elgharbi, F., Ameri, R., Ben Mabrouk, S., Mezghani, M., Hmida-Sayari, A., & Bejar, S. (2019). *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 921–932. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4548-2>
- Westirmeier. (2004). 'Electrophoresis in Practice : A Guide to theory and Practice'. *New –Jersey : John Wiley and Sons inc.*
- Winarno, F. (2010). 'Enzim Pangan'. M-Brio Press.
- Wink, M. (2006). An Introduction to Molecular Biotechnology. *Molecular*. 131-137.
- Wilson. K, Walker J. (2000). 'Principles and Techniques of Practical Biochemistry Fihth Edition'. *Unted Kingdom : Cambridge University Press*. <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bmb.2002.494030030062>
- Yanti, T. R., Jurnal, Y. D., Oenzil, F., & Lubis, G. (2017). 'Pengaruh Pemberian. Amylase Resistant Starch Terhadap Durasi Diare dan Kadar Secretary Immunoglobulin A pada Anak dengan Diare Akut'. *Sari Pediatri*, 19(4) : 226-30