

KARAKTERISASI DAN PENETAPAN KADAR PREKURSOR INSULIN YANG DIPRODUKSI OLEH REKOMBINAN *Pichia pastoris*

Fahroziah Assyifa^{1*}, Dudi Hardianto², Efrida Martius², Dihan Laziba¹, Juwartina Ida Royani³, Triyani Sumiati⁴, Anna Safarrida⁵

¹Laboratorium Bioteknologi, Deputi Bidang Fasilitas Riset dan Inovasi, BRIN, Laboratorium Bioteknologi G630 Puspiptek, Tangerang Selatan, Indonesia, 15314

²Pusat Riset Vaksin dan Obat, Organisasi Riset Kesehatan, BRIN, Laptiab G610-614 Puspiptek, Tangerang Selatan, Indonesia, 15314

³Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Organisasi Riset Pertanian, BRIN, Laptiab G610-614 Puspiptek, Tangerang Selatan, Indonesia, 15314

⁴Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor, Jalan Kumbang No. 23, Bogor, Indonesia, 15314

⁵Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, BRIN, Bioteknologi G630 Puspiptek, Tangerang Selatan, Indonesia, 15314

*Korespondensi: Fahr009@brin.go.id

ABSTRAK

Jumlah penderita diabetes melitus meningkatkan setiap tahunnya sehingga kebutuhan insulin meningkat. Insulin merupakan obat utama untuk pasien diabetes mellitus tipe 1 (DMT1). Dalam beberapa kasus, diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) memerlukan insulin untuk pengobatannya. Saat ini, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, dan *Hansenula polymorpha* merupakan sistem ekspresi yang digunakan secara luas untuk memproduksi prekursor insulin. Prekursor insulin diubah menjadi insulin secara enzimatis. Pada penelitian ini, digunakan *Pichia pastoris* untuk memproduksi prekursor insulin karena mampu memproduksi prekursor insulin dalam jumlah besar dan disekresikan ke luar sel *Pichia pastoris* sehingga mempermudah proses pemurnian. Penelitian diawali dengan regenerasi dan seleksi *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* terpilih ditumbuhkan dalam media fermentasi kemudian prekursor insulin yang dihasilkan dikarakterisasi dengan elektroforesis SDS-PAGE dan kadar insulin diukur dengan Elisa. Hasil karakterisasi menunjukkan prekursor insulin berupa pita berukuran sekitar 7 KDa dengan kadar prekursor insulin 6,88 μ UI/mL.

Kata kunci: Diabetes melitus, *Pichia pastoris*, prekursor insulin.

ABSTRACT

The number of people with diabetes mellitus increases every year so that the need of insulin increases. Insulin is the main drug for patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM). In some cases, type 2 diabetes mellitus (T2DM) requires insulin for its treatment. Currently, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Hansenula polymorpha* are expression systems that are widely used to produce insulin precursor. Insulin precursor is converted to insulin enzymatically. In this study, *Pichia pastoris* was used to produce insulin precursor because it is capable of producing large amounts of insulin precursor and secreted out of *Pichia pastoris* cells that simplifies the purification process. The study began with the regeneration and selection of *Pichia pastoris*. Selected *Pichia pastoris* was grown in fermentation media and then the insulin precursor produced was characterized by SDS-PAGE electrophoresis and insulin levels was determined by Elisa. The results of the characterization showed that the insulin precursor was in the form of a band measuring about 7 KDa with an insulin precursor level of 6,88 μ UI/mL.

Keywords: Diabetes mellitus, *Pichia pastoris*, insulin precursor

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan penyakit kronis (menahun) akibat gangguan metabolisme yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah akibat kekurangan insulin, resistensi insulin, atau keduanya [1-3]. Pada tahun 2019, penderita DM mencapai 463 juta di dunia dan diprediksi akan meningkat menjadi 700 juta pada tahun 2045. Total biaya kesehatan global untuk DM mencapai US\$ 760 miliar [4-5]. Prevalensi DM dan usia harapan hidup DM akan terus meningkatkan kebutuhan insulin [6-7].

Salah satu penyebab DM adalah defisiensi insulin akibat rusaknya sel pankreas, yaitu sel yang berfungsi untuk memproduksi insulin. Kondisi ini dikenal sebagai DM tipe 1 (T1DM). Selain itu, DM juga dapat disebabkan oleh resistensi insulin yang dikenal dengan DM tipe 2 (T2DM). Resistensi insulin adalah penurunan kemampuan insulin untuk merangsang penggunaan glukosa atau penurunan respon sel target, seperti otot, jaringan, dan hati terhadap kadar insulin fisiologis. Insulin telah digunakan untuk pengobatan orang dengan T1DM sejak tahun 1922 [8-10]. Insulin diberikan juga pada DM T2 yang mempunyai kadar glukosa puasa >250 mg/dL, riwayat pankreatektomi, penderita DM T2 selama 10 tahun atau lebih, penderita hepatitis kronik, tuberkulosis paru, kanker, dan penurunan efek samping obat oral [13-14].

Insulin adalah hormon untuk mengubah glukosa menjadi energi dan mempertahankan atau mengontrol kadar glukosa darah. Insulin manusia disintesis oleh sel pankreas dalam bentuk 3 peptida, yaitu peptida B, C, dan A (prekursor insulin). Prekursor insulin diubah menjadi insulin oleh enzimatis untuk menghilangkan peptida C. Insulin manusia adalah dipeptida non-glikosilasi yang terdiri dari peptida B yang mengandung 30 asam amino dan peptida A yang mengandung 21 asam amino, dihubungkan oleh ikatan sulfida, dan memiliki berat molekul 5.808 Da [2, 14-18].

Pada tahun 1922 insulin yang berasal dari hewan (sapi dan babi) digunakan untuk pengobatan DM [19-21]. Perkembangan Teknik rekayasa genetika memungkinkan insulin manusia diproduksi menggunakan bakteri *Escherichia coli* (1978). Insulin manusia yang diproduksi *Escherichia coli* beredar di Amerika Serikat sejak tahun 1982 [16, 19, 21-23]. Setelah itu beredar insulin analog Glargine pada tahun 1992. Insulin analog merupakan insulin yang berasal dari insulin manusia yang mengalami modifikasi struktur atau asam amino secara

minor dengan Teknik rekayasa genetika sehingga mengubah farmakokinetika, profil penyerapan, dan durasi kerja insulin [19, 22]. Sekarang ini insulin manusia dan insulin analog diproduksi menggunakan sistem ekspresi *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, dan *Hansenula polymorpha* [16, 24-29]. Dalam penelitian ini, *Pichia pastoris* digunakan untuk memproduksi prekursor insulin.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme dan Bahan

Rekombinan *Pichia pastoris* penghasil prekursor insulin, zeosin (Invitrogen), media YPD yang mengandung zeosin 100 µg/mL (yeast extract 1%, pepton 1%, dekstroza 2%, zeosin 100 µg/mL, bakteriologikal agar 2%), media BMGY (YNB 1,34%, gliserol 1%, biotin 4X10⁵%, histidine 0,004%), media BMMY (yeast extract 1%, pepton 2%, kalium fosfat pH 6,0 100 mM, YNB 1,34%, biotin 4X10⁵%, metanol 0,5%), kits SDS-Page (Biorad), Marker protein (PM1500 Smobio), Elisa kits (DRG), dan kits pewarnaan perak nitrat (Biorad).

Alat

Laminar air flow (Gelaire Pty Ltd), *deep freezer* (Thermo Fisher Scientific), mikro sentrifuge (Tommy), *shaker incubator* (New Brunswick Scientific Innova44), mesin elektroforesis untuk protein (Atto), spektrofotometer (Shimadzu UV2700), dan *mikroplate Reader* (SpectraMax Paradigm).

Regenerasi dan Seleksi Koloni

Stok rekombinan *Pichia pastoris* dari *deep freezer* -80°C diambil dan di simpan pada suhu ruang sampai mencair. Kemudian ditumbuhkan dalam media YPD agar yang mengandung zeosin 100 µg/mL, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24-48 jam. Koloni tunggal yang tumbuh setelah 48 jam, dipilih, diregenerasi dengan cara menggoreskan dalam media YPD agar yang mengandung zeosin 100 µg/mL, diinkubasi pada suhu 28°C selama 24-48 jam.

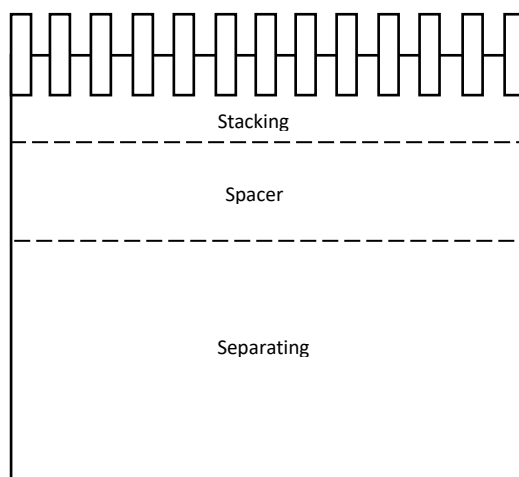
Produksi Prekursor Insulin

Koloni tunggal rekombinan *Pichia pastoris* hasil regenerasi, diinokulasi dalam 10 mL BMGY dalam erlenmeyer 100 ml, ditumbuhkan pada suhu 28-30° C dalam *shaker incubator* (250 rpm) sampai mencapai OD600 = 2-6 (sekitar 16-18 jam). Sel-sel di sentrifugasi pada 1.500-3.000 × g selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang dan pelet sel (OD600 dari 1,0) disuspensikan kembali ke dalam media BMMY.

Kdalam labu baffle 250 mL. Labu ditutup dengan 2 lapis kain kasa steril dan ditumbuhkan pada suhu 28-30° C dalam inkubator gemetar (250 rpm) selama semalam. Metanol ditambahkan ke konsentrasi akhir metanol 0,5% setiap 24 jam untuk mempertahankan induksi. Setelah 72 jam kultur dipanen, disentrifugasi pada 1500 – 3000 x g selama 5 menit pada suhu kamar, dan prekursor insulin manusia dalam supernatan dikarakterisasi dengan elektroforesis gel SDS-PAGE.

Elektroforesis Gel SDS-PAGE

Buffer Anoda 1X sebanyak ± 400 mL dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan Gel SDS dimasukkan ke dalam alat elektroforesis yang sudah berisi buffer anoda 1X, Buffer Katoda 1X sebanyak 70-80 mL dimasukkan ke alat elektroforesis hingga gel terendam, dan sisir cetakan dilepas secara perlahan. Sampel dan marker dimasukkan ke dalam tiap sumuran (Gambar 1), dilektroforesis pada 21 mA/gel selama 180 menit. Kemudian gel dilepaskan dari cetakan dan diwarnai dengan kits perak nitrat, dan diamati pita yang terbentuk pada gel hasil SDS-PAGE.



Gambar 1. Gel SDS-PAGE yang digunakan untuk karakterisasi ukuran protein

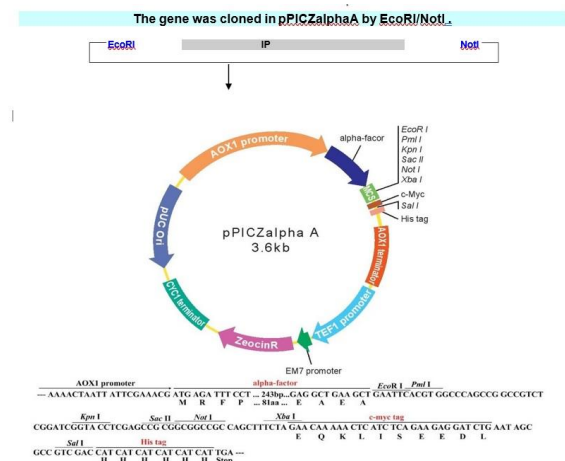
Elisa

Sebanyak 25 µL standar insulin dan sampel dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran di microplate, ditambahkan 25 µL *Enzyme conjugate* pada masing-masing sumuran, diaduk selama 10 detik, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar tanpa menutupi *microplate*. Isi *microplate* dibaung dengan cepat, dibilas masing-masing sumuran 3 kali dengan *Wash Solution* yang telah diencerkan (400 µL).

Microplate dikeringkan hingga tidak ada sisa larutan. Pada masing-masing sumuran di *microplate* ditambahkan 50 µL *Enzym Complex* ke masing-masing sumuran, diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Isi *microplate* dibaung dengan cepat, dibilas masing-masing sumuran 3 kali dengan *Wash Solution* yang telah diencerkan (400 µL). Pada masing-masing sumuran di *microplate* ditambahkan 50 µL *Substrate Solution* ke masing-masing sumuran, diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar. Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 50 µL *Stop Solution* ke masing-masing sumuran, standar insulin dan sampel segera dibaca pada 450 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Zeosin merupakan antibiotik golongan bleomisin atau fleomisin yang diisolasi dari *Streptomyces verticillus*. Antibiotik ini merupakan antibiotik yang bersifat toksik baik untuk bakteri, jamur (termasuk ragi), tanaman, dan sel mamalia sehingga digunakan untuk seleksi hasil transformasi gen ke dalam sel bakteri, jamur (termasuk ragi), tanaman, dan sel mamalia. Mekanisme kerja zeosin dengan cara berikatan dengan DNA dan memotong DNA tersebut sehingga sel mati [30].



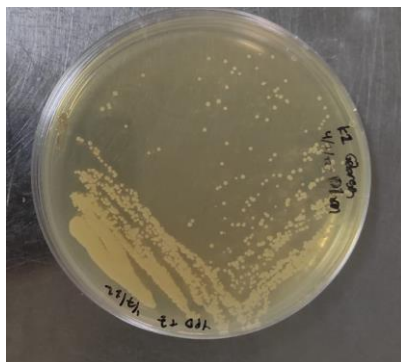
Gambar 2. Peta plasmid pICZαA-IP. Plasmid ini mempunyai gen penanda resistensi terhadap zeosin.

Plasmid pICZαA-IP terintegrasi ke dalam genom rekombinan *Pichia pastoris* sehingga rekombinan *Pichia pastoris* mempunyai gen resistensi terhadap zeosin (Gambar 2). Saat regenerasi dan seleksi koloni rekombinan *Pichia pastoris* dapat tumbuh dalam media seleksi YPA agar yang mengandung zeosin 100 µg/mL.

sedangkan kontaminan baik bakteri, ragi, ataupun jamur tidak akan tumbuh (Gambar 3 dan 4).



Gambar 3. Hasil regenerasi rekombinan *Pichia pastoris* dari kultur stok -80°C

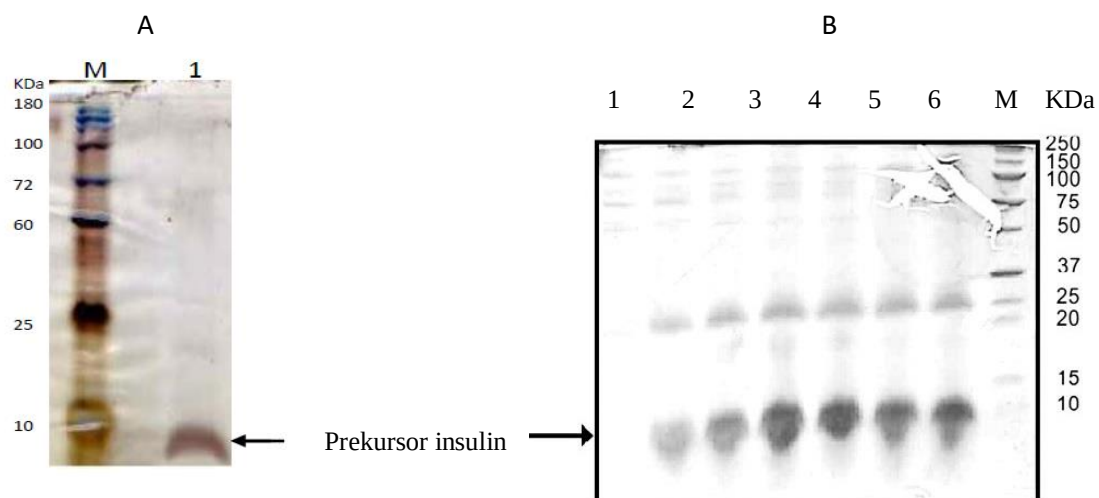


Gambar 4. Hasil regenerasi dari koloni tunggal rekombinan *Pichia pastoris*

Rekombinan *Pichia pastoris* memproduksi protein rekombinan secara intra sel atau ekstraselular. Untuk sekresi memerlukan urutan protein tertentu yang berfungsi sebagai sinyal peptida sehingga rekombinan protein yang dihasilkan dapat keluar dari sel melalui jalur sekresi. Pada penelitian ini, rekombinan *Pichia pastoris* yang mengandung plasmid pICZαA-IP mempunyai sinyal peptida faktor α yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae*. Rekombinan *Pichia pastoris* mensekresikan prekursor insulin berupa fusi prekursor insulin dengan sinyal peptida faktor α.

Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa prekursor insulin yang disekresikan oleh rekombinan *Pichia pastoris* dapat dilihat pada Gambar 5. Prekursor insulin yang dihasilkan berukuran 7 KDa sesuai dengan yang diinginkan [27]. Untuk konfirmasi lebih lanjut, perlu dilakukan Western Blot.

Penentuan kadar prekursor insulin dapat menggunakan kromatografi, biosensor elektrokimia, dan immunoassay (14). Immunoassay dengan Elisa banyak digunakan untuk menentukan kadar insulin karena memerlukan waktu yang relatif singkat untuk menganalisis banyak sampel sampai 96 sampel dan spesifik. Pada penelitian ini digunakan Elisa untuk penentuan kadar prekursor insulin menggunakan kits dari BRG.

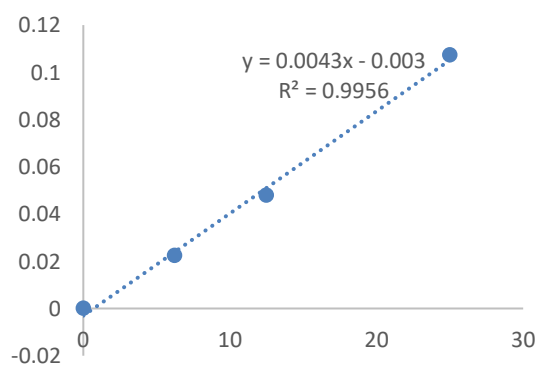


Gambar 5. A. Elektroforegram gel SDS-PAGE. M Marker protein 1. Prekursor insulin hasil fermentasi Rekombinan *Pichia pastoris* selama 72 jam. Gambar 5. B. Elektroforegram gel SDS-PAGE. Prekursor insulin hasil fermentasi Rekombinan *Pichia pastoris* selama 1. 24 jam, 2. 48 jam, 3. 72 jam, 4. 96 jam, 5. 120 jam, 6. 144 jam, M Marker protein [27]

Sebelum menentukan kadar prekursor insulin, dibuat kurva standar insulin dengan kadar insulin dari 0 sampai 25 $\mu\text{UI/ml}$ (Tabel 1). Dari kurva standar ini diperoleh persamaan garis $y = 0,0043x - 0,003$ dengan $R^2 = 0,9956$ (Gambar 6). Hasil pengukuran serapan prekursor insulin pada 450 nm diperoleh serapan 0,0266. 1 $\mu\text{UI/ml} = 6,00 \text{ pmol/L}$ [31]. Berdasarkan persamaan di atas kadar prekursor diperoleh kadar prekursor insulin sebesar 6,88 $\mu\text{UI/mL}$ atau 41,28 pmol/L .

Tabel 1. Serapan insulin dan prekursor insulin

Kadar ($\mu\text{UI/ml}$)	Serapan (450 nm)
Insulin standar 0	0
Insulin standar 6,25	0,0222
Insulin standar 12,5	0,0477
Insulin standar 25	0,1073
Sampel	0.0266



Gambar 6. Persamaan garis insulin standar

SIMPULAN

Rekombinan *Pichia pastoris* menghasilkan precursor insulin berukuran sekitar 7 kDa dengan kadar prekursor insulin sebesar 6,88 $\mu\text{UI/mL}$ atau 41,28 pmol/L .

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Hardianto, D. 2020. Telaah komprehensif Diabetes Melitus: Klasifikasi, Gejala, Diagnosis, Pencegahan, dan Pengobatan. Jurnal Biotechnologi dan Biosains Indonesia. 7(2): 304-317.
- [2] Mane, K., Chaluvvaraju K.C., Niranjan, M.S., Zaranappa, Manjuthaj, T.R. 2012.

Review of Insulin and Its Analogues in Diabetes Mellitus. Journal of Basic and Clinical Pharmacy. 003(002): 283-293.

- [3] Rachdaoui, N. 2020. Insulin: the Friend and the Foe in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus, International Journal of Molecular Sciences. 21: 1-21.
- [4] Demir, T., Serap, T., Kursad, U., Oya, T., Tufan, T., Dilek, G.Y. 2021. Use of Insulin Degludec/Insulin Aspart in the Management of Diabetes Mellitus: Expert Panel Recommendations on Appropriate Practice Patterns. Frontiers Endocrinology. 12: 1-11.
- [5] Ghosh, S., Romik, G. 2020. Glargine-300: an Updated Literature Review on Randomized Controlled Trials and Real-world Studies. World Journal of Diabetes. 11(4): 100-114.
- [6] Govender, K., Tricia, N., Johnson, L., Sooraj, B., Anil, A.C., Naeem, S.A., Taskeen, D., Hendrik, G.K., Thavendran G. 2020. A Novel and more Efficient Biosynthesis Approach from Human Insulin Production in *Escherichia coli* (*E. coli*). AMB Express. 10(43): 1-9.
- [7] Tibaldi, J.M. 2014. Evolution of Insulin: from Human to Analog. The American Journal of. Medicine. 127(10A): S25-S38.
- [8] Alkhatib, A.J., Amer, M.S., Eman, H.A. 2021. Insulin as a Predictor of Diabetes Type 2: a New Medical Hypothesis. Advances in Obesity, Weight Management and Control. 11(1): 1-3.
- [9] Cheng, AYY., Dhiren, K.P., Timothy, S.R., Kathleen, W. 2019. Differentiating Basal Insulin Preparations: Understanding How They Work Explains Why They are Different. Advances in Therapy. 36: 1018-1030.
- [10] Gotham, D., Melissa, J.B., Andrew, H. 2018. Production Costs and Potential Prices for Biosimilars of Human Insulin and Insulin Analogues. BMJ Global Health. 1-10.
- [11] Kasavadev, J., Banshi, S., Meera, B.K., Gopika, K. 2020. Evolution of Insulin

- Delivery Devices: from Syringes, Pens, and Pumps to DIY Artificial Pancreas. *Diabetes Therapy*. 11: 1251-269.
- [12] Scholten, B.J., Frederik, F.K., Stephen CLG., Matthias, H. 2021. Current and Future Therapies for Type 1 Diabetes. *Diabetologia*. 64: 1037-1048.
- [13] Ahmad, K. 2014. Insulin Sources and Types: a Review of Insulin in Terms of Its Mode on Diabetes Mellitus. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 34(2): 234-237.
- [14] Shen, Y., Witoon, P., Zhimin, X. 2019. Insulin: a Review of Analytical Methods. *The Analyst*. 144: 4139-4148.
- [15] Allen, D., Ruan, C., King, B., Ruan, K. 2019. Recent Advances and Near Future of Insulin Production and Therapy. *Future Medicinal Chemistry*. 11(13): 1513-1517.
- [16] Baeshen, N.A., Mohammad, N.B., Abdullah, S., Roop, S.B., Mohamed, MMA., Hassan, AIR., Kulvinder, S.S., Elrashdy, M.R. 2014. Cell Factories for Insulin Production. *Microbial Cell Factory*. 13(141): 1-9.
- [17] Fu, Z., Elizabeth, R.G., Dongmin, L. 2013. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-cell Dysfunction in Diabetes. *Current Diabetes Reviews*. 9(1): 25-53
- [18] Kuhlmann, M., Andrea S. 2014. Production and Manufacturing of Biosimilar Insulin: Implications for Patients, Physicians, and Health Care System. *Biosimilars*. 4: 45-58.
- [19] Hardianto, D. 2021. Insulin: produksi, jenis, analisis, dan rute pemberian. *Jurnal Biotechnologi dan Biosains Indonesia*. 8(2): 321-331.
- [20] Pathak, V., Pathak, N.M., O'Neill, C.L., Guduric-Fuchs, J., Medina, RJ. 2019. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 12: 1-13.
- [21] Sandow, J., Wolfgang, L., Reinhard, B., Gerhard, S. 2015. Equivalent Recombinant Human Insulin Preparations and their Place in Therapy. *European Endocrinology*, 11(1): 10-16.
- [22] Riggs, A.D. 2021. Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: the Path to Humulin. *Endocrine Reviews*. 42(3): 374-380.
- [23] Stubbs, D.J., Levy, N., Dhatariya, K, 2017. Diabetes Medication Pharmacology. *BJA Education*. 17(6): 198-207.
- [24] Sekaringtyas, F.C., Dudi H., Karimah, N., Nida, V., Zahra, A. 2021. Transformation and Characterization of Human Insulin Precursor Gene in *Pichia pastoris* X-33. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 948 012084.
- [25] Jacob, S., Mohamed, A.M., Anroop, N. 2018. An Overview on the Insulin Preparation and Devices. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 52(4): 550-557.
- [26] Mansur, M., Cecilia, C., Lester, H., Jose, P., Laura, V., Jorge, V., Yanet, T., Abdel, H., Liuba, P., Vladimir, B., Liudys, G., Emilio, L., Lila, C., Eduardo, M. 2005. Multiple Gene Copy Number Enhances Insulin Precursor Secretion in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*. 27: 339-345.
- [27] Gurramkonda, C., Sulena, P., Natasa, S., Ahmad, A., Thomas, G., Dipti, C., Sathyamangalam, S., Navin, K., Sergio, T., Ursula, R. 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, *Microbial Cell Factories*. 9: 31.
- [28] Wang, Y., Zhen-He, L., You-Shang, Z., Shi-Yin, Y., Yin-Gao, X., Yue-Hua, T., Shang-Quan, Z., Da-Fu, C., You-Min, F. 2001. Human Insulin from a Precursor Overexpressed in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris* and a Simple Procedure for Purifying the Expression Product. *Biotechnology and Bioengineering*. 73(1): 74-79.

- [29] Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., Zhang, S. 2008. Efficient Generation of Multi-copy Strains for Optimizing Secretory Expression of Porcine Insulin Precursor in Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 954-963.
- [30] T, Trastoy, M.N., Martin, D., Florence, L. 2005. Resistance to the Antibiotic Zeocin by Stable Expression of the *sh ble* Gene Does Not Fully Suppress Zeocin-induced DNA Cleavage in Human Cells. *Mutagenesis*. 20(2): 111-114.
- [31] Knopp, J.L., Lui, H., Geoffrey, C. 2019. Insulin Units and Conversion Factors: A Story of Truth, Boots, and Faster Half-Truths. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 13(3): 597-600.