

Desain Peta Plasmid Pengkode α -Amilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Mutan dan Pemodelan Struktur Protein

Umi Baroroh^{1,*}, Shinta Kusumawardhani², Mia Tria Novianti², Muhammad Yusuf^{2,3}, Irma Mardiah¹, Ridha Nurfadillah Azhari²

¹Departemen Bioteknologi, Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia, Bandung, Jawa Barat, 40266, Indonesia

²Pusat Riset Bioteknologi Molekuler dan Bioinformatika, Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat, 40133, Indonesia

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Jawa Barat, 45363, Indonesia

*Penulis korespondensi: umibaroroh@stfi.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n3.42053>

Abstrak: Enzim α -amilase merupakan enzim yang banyak digunakan pada industri berbasis pati, diantaranya industri pangan, farmasi, tekstil, dan detergen. Enzim ini bahkan semakin dikembangkan di bidang biomedis, bioanalitik, dan kesehatan. α -Amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera* R64 (Sfamy R64) merupakan enzim dari isolat lokal yang memiliki aktivitas amilolitik yang terbaik dari isolat lainnya, meskipun kemampuan adsorptivitasnya masih rendah. α -Amilase dengan adsorptivitas yang baik sangat diperlukan dalam industri pengolahan pati karena dapat mengurangi penggunaan energi dan biaya produksi melalui penghilangan proses gelatinisasi. Dengan menambahkan sisi pengikatan di permukaan enzim melalui pergantian asam amino serin menjadi tirosin dan triptofan sehingga bersifat lebih aromatik telah dilakukan secara *in silico* dan menunjukkan hasil yang positif, mutan Sfamy R64 (sfamy R64 mut11). Protein ini dirancang pada sistem ekspresi *Pichia pastoris* secara ekstraseluler dengan alfa-faktor sebagai sinyal peptida, promotor AOX1, dan penanda poli glisin dan histidine. Penelitian ini menggunakan berbagai web server online untuk merancang konstruksi gen dan pemodelan protein. Hasil perancangan didapatkan dengan mensubstitusi K48Q untuk menghindari pengenalan sisi Kex2 dan urutan nukleotidanya menunjukkan kandungan basa GC 38%, CAI 0,94, dan enzim restriksi yang digunakan adalah EcoR1 dan Not1. Hasil pemodelan struktur menunjukkan bahwa penanda poli glisin dan histidine terpapar keluar struktur dengan nilai DOPE sebesar -57260. Hasil perancangan ini diharapkan mampu mengekspresikan α -amilase rekombinan secara optimal.

Kata kunci: α -amilase, *Pichia pastoris*, konstruksi gen, pemodelan homologi, DNA rekombinan

Abstract: α -amylase is an enzyme that is widely used in starch-based industries, including the food, pharmaceutical, textile, and detergent industries. These enzymes are even increasingly being developed in the biomedical, bioanalytic, and health fields. α -Amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* R64 (Sfamy R64) is an enzyme from local isolates that has the best amylolytic activity from other isolates, although its adsorption ability is still low. α -Amylases with good adsorptivity are needed in the starch processing industry because they can reduce energy use and production costs through the elimination of the gelatinization process. By adding a binding site on the surface through the substitution of amino acids from serine to tyrosine and tryptophan so that it is more aromatic has been carried out *in silico* and showed positive results, the Sfamy R64 mutant (sfamy R64 mut11). This protein is designed extracellularly on the *Pichia pastoris* expression system with alpha factor as a signal peptide, AOX1 promoter, and poly glycine and histidine markers. This study uses various online web servers to design gene construction and protein modeling. The design results were obtained by substituting K48Q to avoid the introduction of the Kex2 site and its nucleotide sequence showed a base content of 38% GC, CAI 0.94, and the restriction enzymes used were EcoR1 and Not1. The modeling results showed that poly glycine and histidine markers were exposed outside the structure with a DOPE value of -57260. The results of this design are expected to be able to produce recombinant α -amylase optimally.

Keywords: α -amylase, *Pichia pastoris*, gene construction, homology modeling, DNA recombinant

PENDAHULUAN

α -Amilase (EC 3.2.1.1) adalah salah satu enzim yang banyak digunakan di industri, khususnya industri berbasis pati dan menguasai sekitar 65% dari total enzim dunia (Homaei *et al.* 2013; Rodrigues & Emeje 2012; Simair *et al.* 2017). Beberapa pemanfaatan dari enzim ini adalah untuk memproduksi maltodekstrin, pati termodifikasi, glukosa, sirup fruktosa, dan lebih lanjut lagi digunakan sebagai aditif dalam makanan dan farmasi. α -Amilase juga digunakan dalam penghantaran terapi obat sebagai alat bantu pencernaan dan dipasarkan karena efek antiinflamasi dan antieudemonnya. Selain itu, α -amilase juga memiliki berbagai aplikasi dalam bidang biomedis dan bioanalitik serta diaplikasikan pada berbagai industri, seperti makanan, fermentasi, tekstil, dan detergen (de Souza & e Magalhães. 2010; Abdel-Mageed *et al.* 2019).

α -Amilase (1,4- α -D-glukan glukanohidrolase) merupakan enzim yang memecah ikatan α -1,4-glikosida pada pati. Degradasi pati dilakukan melalui proses pemanasan pada suhu tinggi (105°C), gelatinisasi, yang dibutuhkan untuk membuka struktur kristal pati sehingga enzim dapat bekerja. Namun, proses ini memerlukan energi dan biaya yang besar (Sun *et al.* 2010). Oleh karena itu, α -amilase yang mampu memecah pati mentah pada suhu yang lebih rendah diperlukan untuk menurunkan biaya produksi. Di Indonesia, galur *Saccharomycopsis fibuligera* R64 telah teridentifikasi sebagai ragi penghasil α -amilase (Sfamy R64) yang memiliki aktivitas amilolitik terbaik (dari 136 isolat lokal), sayangnya belum mampu mendegradasi pati mentah (Hasan *et al.* 2008). Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah membuat enzim ini memiliki adsorptivitas yang tinggi terhadap substrat. Baroroh *et al.* (2019) mendesain struktur Sfamy R64 dengan menambahkan sisi pengikatan di permukaan secara in silico. Hasil simulasi dinamika molekul menunjukkan bahwa mutan Sfamy R64 memiliki energi interaksi yang lebih baik daripada natif sehingga mampu meningkatkan adsorptivitasnya. Hasil desain ini sangat potensial untuk diproduksi agar dapat diaplikasikan pada proses pemecahan pati mentah.

Pemanfaatan teknologi DNA rekombinan dapat digunakan untuk memproduksi enzim. Enzim yang dimodifikasi sehingga memiliki sifat-sifat yang unggul adalah salah satu pemanfaatan teknologi DNA rekombinan. *Pichia pastoris* merupakan ragi yang telah populer digunakan sebagai sistem produksi protein (Santoso *et al.* 2012). *P. pastoris* menawarkan beberapa keuntungan, diantaranya: kemudahan manipulasi genetik, ketersediaan vektor yang efisien, termasuk promotor AOX1 yang diregulasi ketat dan sangat mudah diinduksi, serta kemampuannya untuk memproduksi protein yang terlipat dengan baik melalui pembentukan ikatan disulfida yang benar dan terdapat modifikasi pasca-translasi (Bollok *et al.* 2009). Fleksibilitas sistem ekspresi *P. pastoris* menjadikannya alat yang ideal

untuk penelitian laboratorium yang ditunjukkan untuk aplikasi industri (Gaffar 2010). Pada penelitian ini, peta plasmid yang sesuai dengan sistem ekspresi *P. pastoris* dirancang dan pemodelan struktur dilakukan untuk memastikan bahwa protein dapat melipat dengan benar dan tetap mempertahankan fungsinya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini sekuen asam amino Sfamy R64 mut11 yang diperoleh dari penelitian Baroroh *et al.* (2019).

Prediksi Sisi Pengenalan Kex2 dan Ste13

Sekuen asam amino Sfamy R64 mut11 diprediksi sisi pengenalan Kex2 dan Ste13 secara manual dengan mencari urutan sekuen asam amino RR, KK, RK, dan KR untuk pengenalan Kex2 dan asam amino EAEA untuk pengenalan Ste13.

Transkripsi Balik dan Analisis

Untuk mendapatkan urutan nukleotida, maka sekuen asam amino Sfamy R64 mut11 ditranslasi balik menggunakan web server Sequence Manipulation Suite (SMS) (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Sekuen yang ditranslasi digunakan sebagai input dan SMS mentranslasi balik menggunakan kodon prevalensi *Escherichia coli*. Setelah itu, hasil sekuen nukleotida yang diperoleh disesuaikan dengan kodon prevalensi *P. pastoris* menggunakan web server Graphical Codon Usage Analyser (GCUA) (<https://gcu.schoedl.de/>). Beberapa analisis sekuen dilakukan, diantaranya adalah kandungan basa nitrogen GC, *Codon Adaptation Index* (CAI), dan sisi pemotongan enzim restriksi menggunakan web server <https://www.biologicscorp.com/tools/> dan <https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

Pemodelan Protein

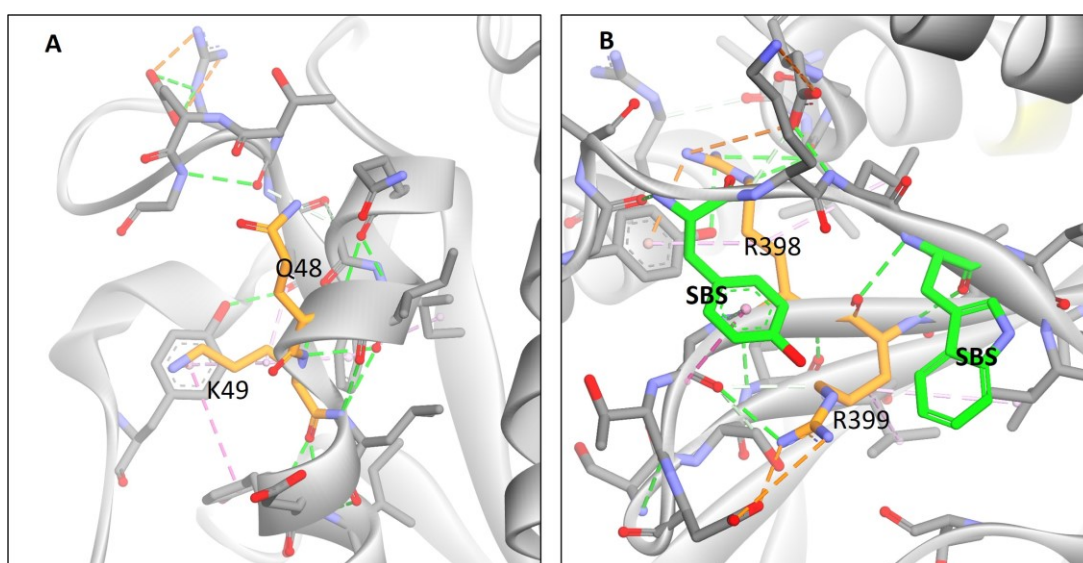
Penanda poli glisin dan histidine ditambahkan pada ujung C-terminal untuk proses pemurnian protein menggunakan kolom nikel-nitritriacetic acid (Ni-NTA). Sekuen asam-amino Sfamy R64 mut11 diinputkan ke dalam web server Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) untuk mendapatkan struktur cetakan dan prediksi energi pada model. Pemodelan dilakukan dengan menggunakan metode homologi dengan program MODELLER 9.19 (Fiser & Šali 2003). Model yang dihasilkan kemudian dievaluasi nilai energi dan plot Ramachandran yang dihasilkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sekuen asam amino Sfamy R64 mut11 dicek sisi pemotongan Kex2 dan Ste13. Sisi pemotongan Kex2 adalah dua asam amino basa yang secara berurutan (lisin, histidin, dan/atau arginin) membentuk urutan

	10	20	30	40	50
SfamyR64_mut11	ETNADKWRSSQSIYQIVTDRFARTDGDTSASCNTEDRLYCGGSFQGI	KKL			
	60	70	80	90	100
SfamyR64_mut11	DYIKDMGFTA IWISPVVENIPDNTAYGYAYHGYWMKNIYKINENFGTADD				
	110	120	130	140	150
SfamyR64_mut11	LKSLAQELHDRDMLLMVDIVTNHYGSGSGDSVDYSEYTFPNDQKYFNY				
	160	170	180	190	200
SfamyR64_mut11	CLISNYDDQAQVQNCWEGDSSVALPDLRTEDSDVASVFNSWVKDFVGNYS				
	210	220	230	240	250
SfamyR64_mut11	IDGLRIDSAKHVNQGFDPFVSASGVYSVGEVFGQDPAYTCPYQNYIPGV				
	260	270	280	290	300
SfamyR64_mut11	SNYPLYPTTRFFKTTDSTSSSELTQMINSVKSSCSDPTLLTNFVENHDNE				
	310	320	330	340	350
SfamyR64_mut11	RFASMTSDQSLISNAIAFVLLGDGIPVIYYGQEQGLSGKSDPNNREALWL				
	360	370	380	390	400
SfamyR64_mut11	SGYNKESDYKLI AKANAARNAAVYQDSSYATYKLWVIFSNHVIATRRG				
	410	420	430	440	450
SfamyR64_mut11	TDGSSVVSVFNNLGSSGSSDVTISGTGYSSGEDLVEVLTCSTVSGSSDLQ				
	460	470	480	490	500
SfamyR64_mut11	VSIQGGQPQIFVPAKYASDICS				

Gambar 1. Pencarian sisi pemotongan Kex2 dan Ste13. Sekuen pengenalan Kex2 ditunjukkan dengan garis bawah berwarna merah.



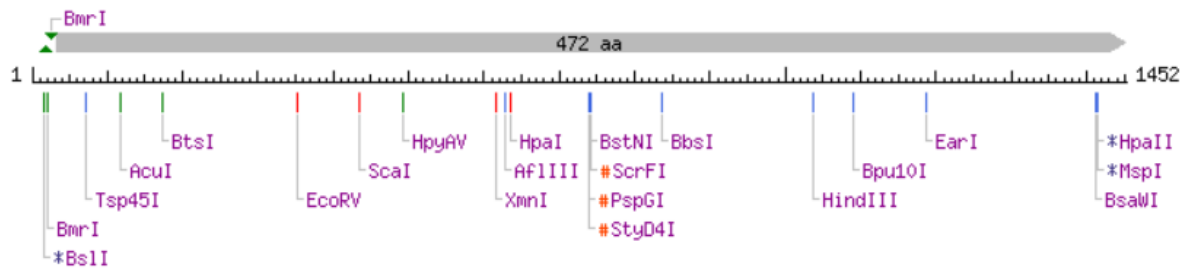
Gambar 2. Asam amino pengenalan Kex2. (A) Perubahan K48Q berada di permukaan struktur dan tetap membentuk struktur helix. (B) Posisi 398-399 berperan menjaga kestabilan SBS dan R398 berada di bagian dalam struktur dan membentuk interaksi yang padu dengan asam amino di sekitarnya.

KK, RR, KR, atau RK. Gen Kex2 mengkodekan serin yang bergantung pada Ca^{2+} endoprotease yang memotong ragi endogen pra-protein untuk pematangan (Yang *et al.* 2013). Sisi pemotongan Ste13 adalah pengulangan asam glutamat-alanin (EAEA) untuk menghasilkan protein α -mating factor. Hasilnya menunjukkan bahwa Sfamy R64 mut11 memiliki 2 sisi pengenalan Kex2 dan tanpa ada sisi pengenalan Ste13 (Gambar 1). Kedua sisi pemotongan ini harus dihindari karena dapat mengganggu struktur Sfamy mut11 secara keseluruhan. Asam amino ini dapat diganti dengan asam amino lain yang memiliki kesamaan bentuk.

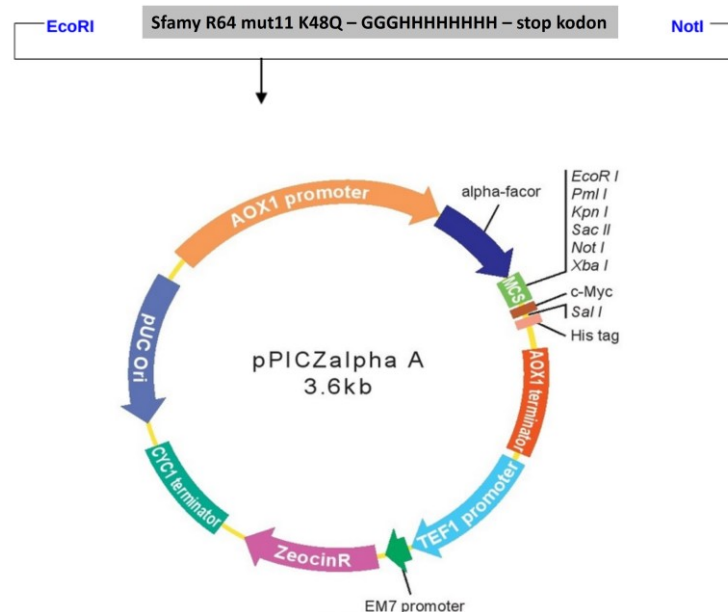
Sisi pengenalan Kex2 ditemukan pada urutan 48-49 dan 398-399. Kedua sisi pengenalan ini dapat disubstitusi dengan asam amino lain yang memiliki bentuk serupa. Namun, pergantian asam amino ini tidak dapat dilakukan sembarangan, ada beberapa hal yang perlu diperhatikan. Posisi 48-49 berada di

permukaan struktur dan tidak berinteraksi dengan asam amino lainnya. Posisi ini dapat dilakukan substitusi menjadi K48Q. Asam amino glutamin dipilih karena memiliki struktur yang mirip dan tetap mempertahankan struktur sekunder protein, struktur helix (Gambar 2A). Sedangkan, pada posisi 398 berada di bagian dalam dan membentuk interaksi yang padu dengan asam amino disekitarnya. Jika asam amino ini diganti dikhawatirkan dapat mengganggu kestabilan struktur dan merubah konformasi struktur secara keseluruhan. Asam amino posisi 399 juga tidak dapat disubstitusi karena berperan pada kestabilan SBS (Gambar 2B). Oleh karena itu, posisi ini tidak disubstitusi.

Sekuen asam amino Sfamy R64 dengan perubahan K48Q kemudian ditranslasi balik menjadi nukleotida. Awalnya, kodon prevalensi disesuaikan dengan *E. coli* karena server secara otomatis menggunakan kodon prevalensi tersebut. Setelah itu,



Gambar 3. Hasil analisis sisi enzim restriksi



Gambar 4. Peta plasmid pPICZ α -A-Sfamy R64 mut11 K48Q

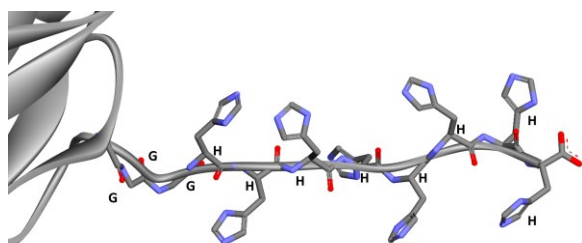
urutan nukleotida disesuaikan dengan kodon prevalensi *P. pastoris*. Proses optimasi kodon ini digunakan agar jumlah protein yang dihasilkan jauh lebih banyak dibandingkan jumlah protein yang tidak dioptimasi. Parameter penting yang perlu diperhatikan dalam proses optimisasi kodon diantaranya adalah kandungan basa nitrogen Guanin (G) dan Sitosin (C) yang harus berada pada kisaran 30-70%. Pada penelitian ini, kandungan GC setelah dioptimasi sebesar 38%. Nilai ini diharapkan mampu membuat untai DNA heliks ganda tidak mudah terlepas, karena ikatan hidrogen antara basa nitrogen G dan C sangat kuat, apabila kandungan basa nitrogen GC kurang dari 30% dikhawatirkan untai DNA heliks ganda mudah terlepas sehingga kestabilan DNA berkurang. Selain itu, kandungan CAI menunjukkan nilai 0,94 dan nilai ini mendekati nilai 1 yang diindikasikan sebagai nilai yang sempurna untuk ekspresi pada organisme yang digunakan. Nilai ini merupakan prediksi keberhasilan ekspresi gen berdasarkan urutan kodon relatif dari inang yang digunakan. Selain itu, sekuen nukleotida yang digunakan tidak boleh mengandung sekuen yang dikenali oleh enzim restriksi yang digunakan,

EcoRI dan NotI. Hal ini dilakukan agar sekuen tidak terpotong-potong dan dapat diekspresikan menjadi protein utuh. Hasil analisis sisi ekspresi menunjukkan bahwa sekuen tidak mengandung pengenalan enzim EcoRI dan NotI (Gambar 3).

Vektor yang digunakan adalah pPICZ α -A dan protein ekspresi protein dirancang secara ekstraselular. vektor ini memberikan sejumlah keuntungan dalam proses seleksi dan ekspresi gen target, serta proses deteksi dan pemurnian protein yang dihasilkan. Vektor ini membawa marker Zeocin, sehingga seleksi dapat dilakukan secara langsung dan integran multi-kopi dapat diketahui langsung tanpa menggunakan banyak medium. Zeocin merupakan antibiotik yang bersifat toksik bagi sel bakteri, fungi, tanaman, dan mamalia. Zeocin ini juga dapat digunakan untuk *E. coli*, sehingga mengurangi penggunaan antibiotik lain dan mengurangi ukuran vektor. Sehingga, peta konstruksi plasmid yang dirancang ditunjukkan oleh Gambar 4.

Penanda poli glisin dan histidine ditambahkan pada ujung C-terminal agar mempermudah proses pemurnian protein menggunakan kolom Ni-NTA. Pemodelan protein dilakukan untuk memastikan

bahwa penanda ini terpapar keluar struktur dan mudah diakses di dalam kolom. Pemodelan diawali dengan penentuan struktur lain yang digunakan sebagai cetakan. Hasil pencarian menunjukkan bahwa struktur α -amilase dari *Aspergillus oryzae* dengan persentase sekuen identik 55,13% dan memiliki resolusi struktur 1,4Å dapat digunakan sebagai cetakan dengan prediksi nilai energi pada model sebesar GMQE 0,85 yang mengindikasikan model memiliki kualitas yang baik. Semakin tinggi nilai GMQE dan mendekati nilai 1 menunjukkan bahwa kualitas model yang dihasilkan semakin baik. Pemodelan dilakukan dengan program MODELLER dengan optimasi menggunakan dinamika molekul level lemah. Hasil pemodelan menunjukkan nilai DOPE -57260 dan lebih dari 90% asam amino berada pada daerah yang diizinkan pada plot Ramachandran. Posisi penanda poli glisin dan histidine juga terpapar keluar dan mengindikasikan bahwa bagian ini mudah dilalui pada kolom ketika proses pemurnian (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil pemodelan poli glisin dan histidin

KESIMPULAN

Desain peta plasmid merupakan tahap yang penting sebelum melakukan produksi protein secara rekombinan. Beberapa hal perlu diperhatikan agar protein yang diproduksi menghasilkan jumlah yang banyak, sesuai, dan memiliki pelipatan yang benar. Pada penelitian ini, Sfamy R64 mut11 mengalami perubahan pada posisi K48Q untuk menghindari adanya pemotongan protein oleh Kex2. Protein ini dirancang pada sistem ekspresi *P. pastoris* secara ekstraseluler dengan alfa-faktor sebagai sinyal peptida, promotor AOX1, dan penanda poli glisin dan histidine juga ditambahkan pada posisi C-terminal. Plasmid pPICZ α -A digunakan dengan sisi restriksi EcoR1 dan Not1. Hasil pemodelan protein menunjukkan bahwa model memiliki kualitas yang baik serta penanda poli glisin dan histidine terpapar keluar struktur, sehingga diharapkan dapat mempermudah proses pemurnian protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemdikbud atas hibah Penelitian Dosen Pemula (PDP) dengan Nomor Kontrak 156/E5/PG.02.00.PT/2022.

DAFTAR PUSTAKA

- Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*. **6(4)**: 185-205.
- Rodrigues, A. & Emeje, M. (2012). Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate Polymers*. **87(2)**: 987-994.
- Simair, A.A., Qureshi, A.S., Khushk, I., Ali, C.H., Lashari, S., Bhutto, M.A., Mangrio, G.S. & Lu, C. (2017). Production and partial characterization of α -amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International*. **2017**: 9173040.
- de Souza, P.M. & e Magalhães, P.D.O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 850-861.
- Abdel-Mageed, H.M., Fouad, S.A., Teaima, M.H., Abdel-Aty, A.M., Fahmy, A.S., Shaker, D.S. & Mohamed, S.A. (2019). Optimization of nano spray drying parameters for production of α -amylase nanopowder for biotherapeutic applications using factorial design. *Drying Technology*. **37(16)**: 2152-2160.
- Sun, H., Zhao, P., Ge, X., Xia, Y., Hao, Z., Liu, J. & Peng, M. (2010). Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **160(4)**: 988-1003.
- Hasan, K., Tirta Ismaya, W., 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.
- Baroroh, U., Yusuf, M., Rachman, S.D., Ishmayana, S., Hasan, K. & Subroto, T. (2019). Molecular dynamics study to improve the substrate adsorption of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase by designing a new surface binding site. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*. **12**: 1-13.
- Santoso, A., Herawati, N. & Rubiana, Y. (2012). Effect of methanol induction and incubation time on expression of human erythropoietin in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Makara Journal of Technology*. **16(1)**: 29-34.
- Bollok, M., Resina, D., Valero, F. & Ferrer, P. (2009). Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. *Recent Patents on Biotechnology*. **3(3)**: 192-201.
- Gaffar, S. (2010). *Produksi Protein Rekombinan dalam Sistem Ekspresi Pichia pastoris*. Unpad Press. Bandung.
- Fiser, A. & Šali, A. (2003). Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure

-
- models. *Methods in Enzymology*. **374**: 461-491.
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A. and Li, S. (2013). Enhanced production of recombinant secretory proteins in *Pichia pastoris* by optimizing Kex2 P1'site. *PloS one*. **8(9)**: e75347.
-