

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi insulin merupakan kegagalan respons seluler terhadap hormon insulin karena terjadi gangguan pada jalur sinyal insulin, sehingga tubuh tidak dapat menggunakan insulin (Sukarno, 2021). Insulin merupakan hormon peptida yang dilepaskan oleh sel β pankreas untuk mengontrol kadar glukosa dalam darah maupun penyerapan glukosa darah ke dalam sel lemak, hati, dan otot rangka (Vecchio et al., 2018). Jika pankreas tidak menghasilkan insulin, maka *free fatty acid* (FFA) akan meningkat dan menyebabkan penyerapan glukosa di otot menurun serta penyerapan glukosa pada hati bertambah, oleh karena itu dibutuhkan insulin dari luar tubuh untuk membantu proses penyerapan glukosa (DiPiro et al., 2020).

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia karena resistensi insulin serta terjadi kelainan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang diakibatkan kelainan sekresi insulin, kerja insulin maupun keduanya (World Health Organization, 2019). Menurut Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS), prevalensi diabetes penduduk di Indonesia pada tahun 2018 rata-rata telah mencapai 1,5 % dari populasi penduduk. Tim Riskesdas tahun 2019 memperkirakan penderita yang didiagnosa diabetes akan terus bertambah setiap tahunnya dari waktu ke waktu seiring bertambahnya populasi dan bertambahnya usia (Tim Riskesdas, 2019). Selain itu, nilai impor non migas menurut komoditas untuk bahan baku farmasi di Indonesia pada tahun 2021 diketahui mencapai 4,191,418 ribu USD, dimana bahan dasar produksi insulin merupakan salah satu yang termasuk didalamnya (Bank Indonesia, 2023).

DM diklasifikasikan ke dalam dua tipe, yaitu diabetes tipe 1 yang disebabkan insulin dibawah batas normal, dan diabetes tipe 2 yang disebabkan kegagalan tubuh dalam merespons insulin (World Health Organization, 2019). Kondisi kronis diabetes dapat menyebabkan komplikasi berupa kerusakan pada vaskular dan saraf, komplikasi mikrovaskular, makrovaskular, serta neuropatik (DiPiro et al., 2020).

Human Insulin (HI) merupakan terapi lini pertama untuk pasien diabetes melitus tipe 1. Pada tahun 1921, Frederick Banting dan Charles Best menemukan insulin dari ekstraksi sel-sel pankreas dari babi menggunakan enzim tripsin. Tahun 1922, insulin pertama kali digunakan untuk menolong pasien diabetes (Pathak et al., 2019). Produksi HI melalui proses bioteknologi tradisional mengalami beberapa kendala seperti ketersediaan sumber bahan baku yang terbatas dan biaya yang tinggi. Pada tahun 1978, untuk pertama kalinya insulin dihasilkan melalui teknologi rekayasa genetik (Alyas et al., 2021).

Salah satu bagian dari rekayasa genetika yang digunakan pada penelitian ini yaitu DNA rekombinan untuk mengubah DNA makhluk hidup dengan memasukkan/menggabungkan gen dari satu organisme ke organisme lain dengan tujuan memberikan kemampuan khusus yang sebelumnya tidak dimiliki (Kotijah & Ventyrina, 2019). Jenis inang yang umum digunakan adalah bakteri (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), ragi (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), atau sel invertebrata, dan sel mamalia. Salah satu hasil dari DNA rekombinan adalah insulin rekombinan (Endah Rita et al., 2021).

Pichia pastoris merupakan ragi metilotropik yang mampu untuk mengekspresikan protein rekombinan dalam jumlah yang tinggi, memiliki tingkat protein asli yang rendah, serta dapat memudahkan pemurnian protein rekombinan yang disekresikan. Pada penelitian ini, akan digunakan transforman *Pichia pastoris* yang membawa kaset ekspresi protein prekursor human insulin yang menggunakan sinyal sekresi α -factor penuh (*full-length α -factor secretory signal*). Sebagai pembanding, digunakan *Pichia pastoris* Wild-Type (WT) yang merupakan galur liar tanpa modifikasi genetik (Herawati, 2015; Karbalaei et al., 2020).

Produksi insulin yang menggunakan *Pichia pastoris* sebagai sel inang lebih unggul dan disukai dalam produksi protein insulin rekombinan dari pada *E. coli* dan *S. cerevisiae* (Lee, 2015). Produksi insulin yang melibatkan *E. coli* memerlukan prosedur solubilisasi dan pelipatan ulang (*re-folding*), karena protein yang dihasilkan akan membentuk badan inklusi di dalam sel (Polez et al. 2016). Produksi insulin yang menggunakan *S. cerevisiae* diketahui menghasilkan protein yang mengalami hiperglikosilasi dengan protein terglukosilasi memiliki ikatan α 1,3 glikan yang bersifat hiperantigenik sehingga mengakibatkan protein tersebut tidak terlalu cocok sebagai terapeutik bagi manusia (Baeshen MN et al., 2016).

Dalam sistem ekspresi *yeast*, proses produksi dilakukan dengan meningkatkan volume kultur dengan cara menggunakan labu kocok besar atau dengan fermentor. Hasil protein biasanya lebih tinggi dalam kultur fermentor. Produksi insulin rekombinan penting dilakukan untuk membantu penderita DM dalam mengontrol kadar glukosa darah dengan bantuan insulin dari luar tubuh. Selain itu, insulin rekombinan juga lebih aman dan efektif dibandingkan dengan insulin yang diperoleh secara konvensional dari sumber ekstrak pankreas hewan (Darmayani et al., 2021).

Penelitian Nurdiani et al., (2018) yang menggunakan *Pichia pastoris* dengan kaset ekspresi pD902-IP, memanfaatkan rantai DNA C-peptida pendek (DGK), dan sinyal sekresi *truncated α -factor*, menunjukkan hasil protein rekombinan *human* insulin yang disekresikan keluar sel *Pichia pastoris* yang diperkirakan sebanyak 63 asam amino dengan berat molekul 7.053 Da (Nurdiani et al., 2018). Penelitian Utami et al., (2021) telah melakukan sub kloning sinyal sekresi *full length α -factor* pada kaset ekspresi pD902-IP, menunjukkan bahwa

induksi metanol terbaik untuk protein rekombinan *human* insulin yaitu metanol 2-3%. Penelitian Nurdiani et al., (2022) telah melakukan modifikasi kondisi ekspresi dengan menggunakan fase kultivasi gliserol dan fase induksi metanol untuk meningkatkan sekresi protein prekursor insulin. Dari hasil penelitian diketahui bahwa parameter (fase induksi metanol, kepadatan inokulum, konsentrasi metanol, titik waktu induksi metanol, pH, serta suhu) sangat berpengaruh dalam peningkatan sekresi protein prekursor insulin (Nurdiani et al., 2022). Penelitian Utami et al., (2023) telah membandingkan ekspresi protein prekursor *human* insulin antara *Pichia pastoris* rekombinan klon CL4 menggunakan sinyal sekresi α -factor terpotong (*truncated α -factor*) dengan klon HF7 yang menggunakan sinyal sekresi α -factor penuh (*full-length α -factor*). Dari hasil penelitian diketahui bahwa ekspresi protein prekursor *human* insulin dari klon HF7 lebih rendah dibandingkan dengan klon CL4, maka dibutuhkan strategi optimasi fermentasi untuk meningkatkan ekspresi protein prekursor insulin klon rekombinan HF7 yang menggunakan sinyal sekresi *full-length α -factor*.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini melakukan optimasi fermentasi klon HF7 yang menggunakan sinyal sekresi *full-length α -factor* untuk meningkatkan hasil ekspresi protein prekursor *human* insulin. Optimasi yang dilakukan yaitu dengan penambahan sorbitol sebagai Co-Substrat dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 g/L (Azadi et al., 2017; Chen et al., 2017) dan penggunaan 2 jenis labu kocok (*baffled flask* dan *erlenmeyer flask*) sebagai optimasi aerasi fermentasi. Penggunaan *baffled flask* lebih disarankan daripada *erlenmeyer flask* untuk meningkatkan kualitas aerasi (invtrogen, 2010).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, masalah pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh penambahan Co-Substrat sorbitol terhadap ekspresi protein prekursor *human* insulin pada *host Pichia pastoris* X-33 klon HF7?
2. Bagaimana pengaruh metode aerasi dengan dua macam jenis labu kocok yaitu *erlenmeyer flask* dan *baffled flask* terhadap ekspresi protein prekursor *human* insulin pada *host Pichia pastoris* X-33 klon HF7?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum pada penelitian ini adalah untuk meningkatkan ekspresi protein prekursor *human* insulin dengan melakukan optimasi penambahan Co-Substrat sorbitol pada proses fermentasi *Pichia pastoris* X-33 klon HF7.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus pada penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh penambahan Co-Substrat sorbitol terhadap ekspresi protein prekursor *human* insulin pada klon HF7.
2. Untuk mengevaluasi pengaruh metode aerasi dengan dua macam jenis labu kocok yaitu *erlenmeyer flask* dan *baffled flask* terhadap ekspresi protein prekursor *human* insulin pada *host Pichia pastoris* X-33 klon HF7.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Untuk Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang optimasi penambahan Co-Substrat sorbitol serta penggunaan *erlenmeyer flask* dan *baffled flask* pada proses fermentasi klon *Pichia pastoris* rekombinan HF7 dalam rangka meningkatkan ekspresi protein *human* insulin. Selain itu, dapat membantu dalam meningkatkan pemahaman tentang mekanisme ekspresi protein dalam sistem *Pichia pastoris* sehingga dapat digunakan sebagai platform untuk produksi protein lainnya.

1.4.2 Manfaat Untuk Universitas

Diharapkan dengan adanya penelitian ini dapat memberikan informasi baru dan ilmu pengetahuan serta menambah *networking* dalam penelitian bersama BRIN (Badan Riset Inovasi Nasional).

1.4.3 Manfaat Untuk Masyarakat

Diharapkan riset ini dapat memberikan informasi pengetahuan bagi pengembangan riset insulin rekombinan, serta mendukung terwujudnya kemandirian bangsa Indonesia dalam pemenuhan penyediaan insulin bagi penderita Diabetes Mellitus.

1.5 Hipotesis

Penambahan Co-Substrat sorbitol serta penggunaan dua macam jenis labu kocok yaitu *erlenmeyer flask* dan *baffled flask* untuk metode aerasi pada fermentasi *Pichia pastoris* X-33 klon HF7 berpengaruh dalam peningkatan ekspresi protein prekursor *human* insulin.