

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Diabetes Mellitus

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit yang mengakibatkan kematian terbesar di Indonesia. *Institute for Health Metrics and Evaluation* (IHM) *Global Burden of Diseases* tahun 2021, diabetes termasuk ke dalam 7 dari 10 top penyakit yang menyebabkan kematian terbesar di Indonesia. Prevalensi diabetes di Indonesia diperkirakan meningkat dari 18,69 juta kasus di 2020 (9,19%) menjadi 40,7 juta kasus di 2025 (16,09%). Kematian akibat diabetes meningkat dari 433.752 ribu di 2020 menjadi 944.468 ribu di 2045 (Wahidin et al., 2024).

Diabetes melitus (DM) terjadi akibat hiperglikemia dalam tubuh, yaitu kondisi dimana tubuh kekurangan insulin, terjadi resistensi insulin, atau keduanya (Rachdaoui, 2020). DM dibagi menjadi dua tipe, diantaranya 1) DM tipe 1 yang disebabkan berkurangnya insulin karena adanya kerusakan pada sel β pankreas, yaitu sel yang berfungsi dalam memproduksi insulin; 2) DM tipe 2, disebabkan oleh resistensi terhadap insulin, akibat berkurangnya kemampuan insulin dalam merangsang penggunaan glukosa atau turunnya respon terhadap sel target, seperti otot, jaringan, dan hati terhadap kadar insulin fisiologis (Baynest, 2015).

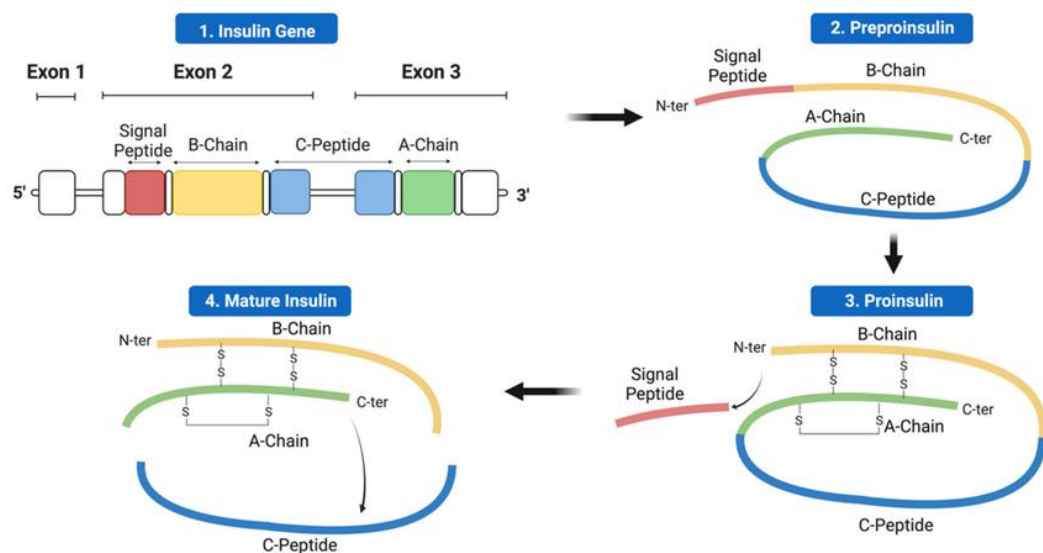
2.1.2 Insulin

Insulin merupakan hormon yang memiliki fungsi dalam mengontrol kadar glukosa dalam darah (Rahman et al., 2021). Insulin manusia merupakan dipeptida tidak terglukolisasi yang terdiri atas rantai peptida B yang mengandung 30 asam amino dan peptida A yang mengandung 21 asam amino yang dihubungkan dengan ikatan sulfida, dan memiliki berat molekul 5.808 Da (Shen et al., 2019).

Insulin dibentuk oleh sel β *Langhernas* di pankreas yang berfungsi penting dalam mengontrol metabolisme dan penyerapan karbohidrat serta lemak pada tubuh manusia. Sel β pankreas mensintesis insulin dalam bentuk polipeptida tunggal yang disebut dengan preproinsulin, yang terdiri atas peptida sinyal, rantai B, peptida C (C-peptide), dan rantai A (Lemus & Wolf, 2022). Proses biosintesis insulin ditampilkan dalam Gambar 2.1, proses ini dimulai di dalam retikulum endoplasma (RE), di mana preproinsulin ditranslokasikan melewati membran RE. Selama translokasi ini, peptida sinyal dengan panjang 24 asam amino dipotong oleh signal peptidase, membentuk prekursor insulin (proinsulin). Proinsulin mengalami pelipatan molekular dan membentuk tiga ikatan disulfida di dalam lumen RE, dua di antaranya menghubungkan rantai A dan B, dan satu ikatan disulfida intra-rantai pada rantai A (Dodson & Steiner, 1998). Prekursor insulin yang terlipat kemudian diangkut ke kompleks trans-Golgi dan masuk ke dalam vesikel sekretorik imatur. Proinsulin diproses lebih lanjut di dalam vesikel dengan menggunakan enzim endopeptidase yaitu *prohormon convertase* (PC1 dan PC2) yang berfungsi memotong pada dua situs spesifik sehingga menyebabkan pelepasan peptida C dan *exoprotease carboxypeptidase* kemudian memotong sisa asam amini bermuatan pada ujung C sehingga membentuk insulin aktif (Steiner, 2011). Setelah *mature*, insulin yang terbentuk mengandung rantai peptida A yang mengandung 21 asam amino dan rantai peptida B yang mengandung 30 asam amino. Kedua rantai polipeptida dihubungkan dengan dua ikatan disulfida inter-rantai dan rantai polipeptida A mengandung 19-20 ikatan intra disulfida yang penting untuk struktur tiga dimensi yang stabil (Datta, 2023).

Insulin akan berikatan dengan reseptor yang spesifik pada sel hati, lemak, dan otot sebagai respon yang terjadi akibat peningkatan kadar glukosa dalam darah (Jahangir et al., 2017). Hal ini akan memicu translokasi intraseluler glukosa, dan meningkatkan pengambilan glukosa oleh jaringan perifer seperti otot dan lemak (Jahangir et al., 2017). Insulin memicu terjadinya reaksi glikolisis dalam hati dan menghambat sekresi

glukagon dengan cara memberikan sinyal dalam menghentikan produksi glukosa melalui glikogenolisis dan glukoneogenesis yang mengakibatkan kadar glukosa dalam darah menjadi berkurang (Shen et al., 2019).



Gambar 2.1 Biosinteis Insulin

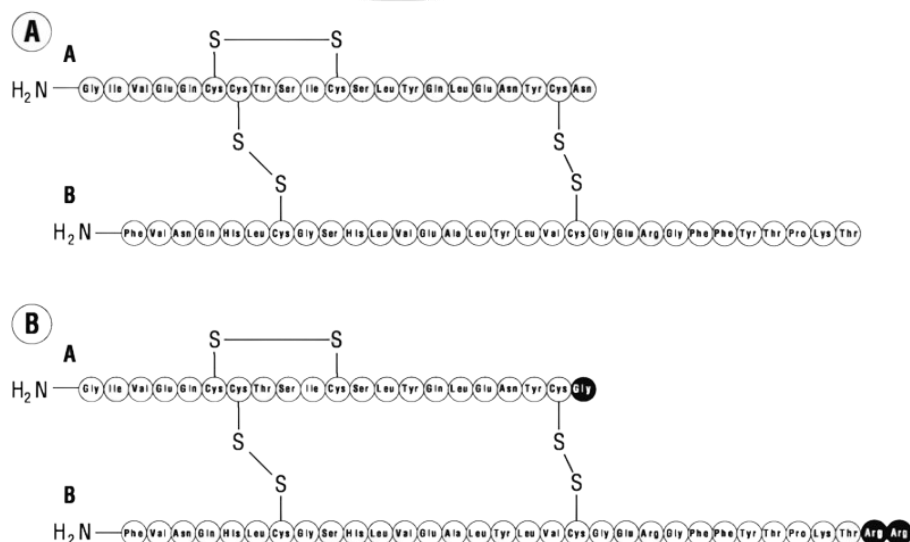
Sumber: Mukhopadhyay & Sen, (2023)

2.1.3 Insulin Glargin

Insulin glargin merupakan salah satu insulin analog yang dikategorikan sebagai insulin kerja panjang. Tidak seperti insulin manusia pada umumnya, insulin glargin mengalami modifikasi spesifik yang menjadikannya memiliki sifat yang berbeda yang ditampilkan pada Gambar 2.2 (Heise et al., 2017). Struktur glargin memiliki dua modifikasi dengan perpanjangan rantai peptida C terminal dari rantai B dengan penambahan dua residu arginin setelah posisi B30 dan pergantian asparagin dengan glisin pada posisi A21 (Owens, 2011). Modifikasi yang terjadi menyebabkan perubahan titik isoelektrik molekul insulin dan menggesernya dari pH 5,4 (insulin manusia) menjadi pH 6.7 (insulin glargin) (Owens, 2011). Dampak dari modifikasi ini menjadikan glargin kurang larut dalam lingkungan pH jaringan subkutan tetapi lebih larut dalam kondisi yang sedikit asam. Insulin

glargin diformulasikan sebagai larutan pada pH 4, namun setelah injeksi subkutan pada pH fisiologis 7, mengalami pengendapan dan membentuk partikel padat atau endapan (Heise et al., 2017).

Struktur fisik insulin glargin berbentuk heksametrik dan memiliki ion seng, sehingga mempengaruhi proses pengendapan dan kinetika penyerapan dan pemotongan selanjutnya (Mane et al., 2012). Pengendapan insulin glargin setelah dilakukan injeksi menyebabkan penyerapan menjadi tertunda dan berkepanjangan dari tempat suntikan ke dalam aliran darah (Owens, 2011). Karakteristik unik ini berkontribusi dalam durasi kerja yang lebih lama, sehingga cocok dalam terapi penggantian insulin basal sekali sehari pada pasien diabetes (Hardianto et al., 2021). Pelepasan insulin yang terjeda dan berkelanjutan dari tempat suntikan dapat membantu menyediakan pasokan insulin yang konsisten dan berkelanjutan sepanjang hari, sehingga mendukung dalam kontrol gula darah yang lebih baik (Rosenstock et al., 2000). Glargin memiliki masa pelepasan selama 90 menit dan durasi kerja yang lebih lama yaitu 24 jam sehingga dalam sehari hanya diperlukan sekali suntikan dalam 24 jam (Hardianto et al., 2021).



Gambar 2.2 Struktur Human Insulin (A) dan Insulin Glargin (B)

Sumber: Agin et al.(2007)

2.1.4 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris merupakan sel inang yang berasal dari kelompok ragi metilotropik atau memiliki kemampuan dalam menggunakan metanol sebagai sumber karbon dan energi utama sehingga umum digunakan dalam produksi insulin manusia dan insulin analog. Ketika ditumbuhkan dengan menggunakan metanol, ragi dengan kuat mengaktifkan dua alkohol oksidase yaitu AoX 1 dan AoX 2 yang diperlukan dalam fase awal jalur konsumsi metanol (Polez et al., 2016). *Pichia pastoris* menunjukkan sejumlah karakteristik menarik dalam produksi protein heterolog berdasarkan kapasitasnya mencapai kepadatan sel tertinggi dan mengekspresikan sejumlah besar protein rekombinan di bawah kendali promotor yang kuat dan diatur dengan ketat (Ahmad et al., 2014).

Pichia pastoris sering digunakan dalam penelitian karena memiliki kemiripan dengan *E. coli* yang tumbuh dengan cepat dan mudah ditangani. *P. pastoris* memiliki beberapa keunggulan dalam produksi protein, diantaranya jumlah produksi yang lebih tinggi dan biaya yang rendah (Daly & Hearn, 2005). Ragi ini juga memiliki pola glikosilasi yang lebih pendek dan kurang imunogenik dibandingkan sistem ekspresi lainnya (Ahmad et al., 2014). *P. pastoris* menunjukkan pertumbuhan kepadatan sel yang lebih tinggi dan peningkatan hasil protein yang diekskresikan dibandingkan dengan sel lainnya yang memungkinkan pertumbuhan kepadatan sel yang lebih tinggi dan meningkatkan hasil protein yang diekskresikan serta mudah dalam purifikasi protein rekombinan (Hardianto et al., 2023). Kelebihan dan kekurangan *P. pastoris* dengan sistem rekombinan protein lainnya seperti *E. coli* dan *S. cerevisiae* dirangkum dalam Tabel 2.1 berikut.

Tabel 2.1 Perbandingan *P. pastoris* dengan sistem rekombinan protein lain dalam ekspresi insulin glargin

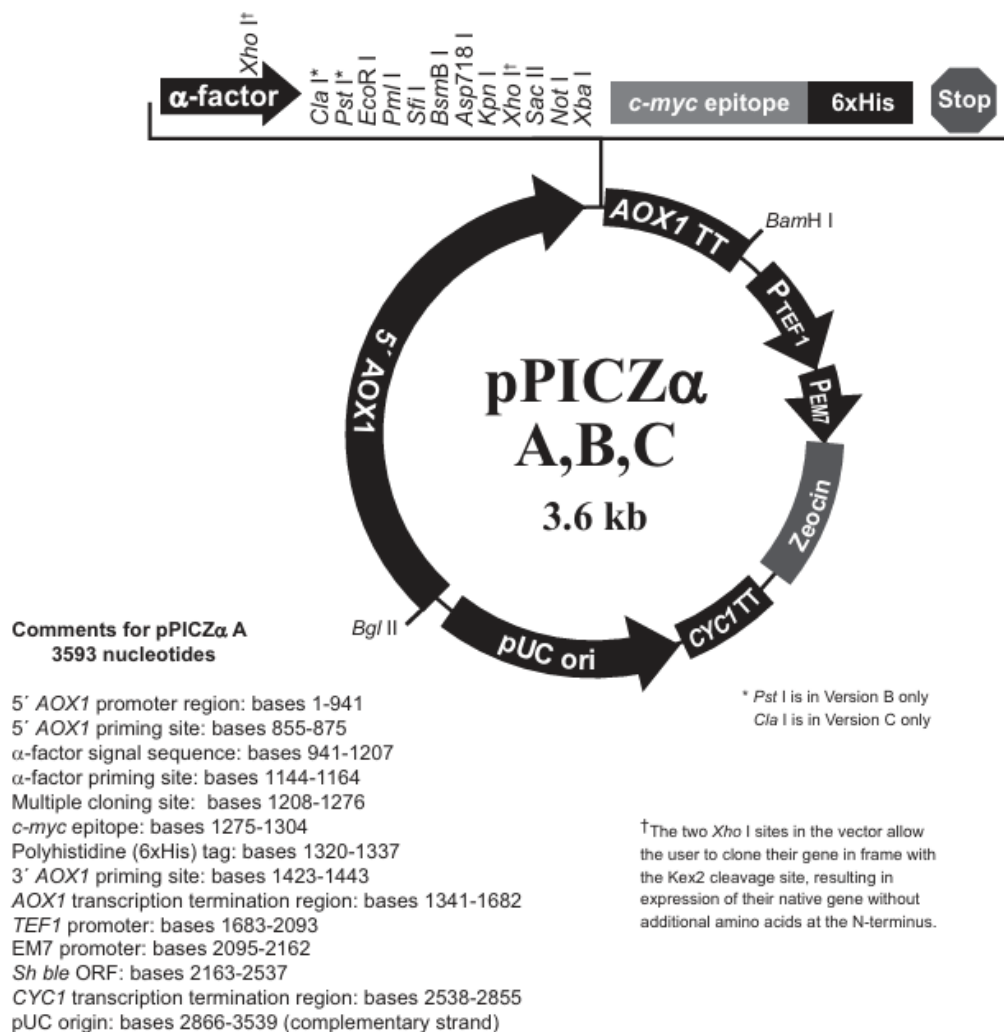
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>
Kelebihan	• Transformasi cepat dan mudah • Biaya Produksi murah	• Proses fermentasi mudah • Posttranslati-onal mirip dengan manusia	• Produksi protein Tinggi • Tidak menghasilkan endotoksin • Mudah dilakukan purifikasi karena ekstraseluler
Kekurangan	• Beberapa menghasilkan endotoksin purifikasi sedikit panjang karena harus dilakukan lisis sel	• Produksi protein lebih rendah	Proses transformasi dan seleksi lebih lama

2.1.5 Vektor Ekspresi

Plasmid menjadi elemen DNA ekstrakromosomal yang umum dijadikan sebagai vektor dalam teknik rekombinasi genetik. Plasmid berfungsi sebagai alat dalam membawa dan mengarahkan ekspresi gen target ke dalam sel inang. *Pichia pastoris* menjadi salah satu sistem ekspresi yang sering digunakan dalam produksi protein terapeutik karena memiliki kemampuan tinggi dalam mengekspresikan dan menskresikan

protein asing (Cereghino & Cregg, 2000). Vektor ekspresi pada *Pichia pastoris* dikonstruksi berdasarkan *shuttle* yang bisa bereplikasi dalam *Escherichia coli* untuk amplifikasi dan manipulasi genetik, serta mempunyai elemen-elemen yang memungkinkan integrasi ke dalam genom *P. pastoris* (Ahmad et al., 2014). Promotor alkohol oksidase (AoX 1) menjadi salah satu elemen penting dalam vektor yang dibantu oleh induksi metanol dan sangat kuat, sehingga memungkinkan ekspresi tinggi dari protein target (Macauley-Patrick et al., 2005).

Gen yang dikodekan untuk pro-glargin dapat disintetis atau dioptimasi berdasarkan kodon *Pichia pastoris* yang disisipkan ke dalam vektor ekspresi seperti pPICZ α A, pPIC3.5K, atau varian lain dalam produksi insulin glargin (Ahmad et al., 2014). Vektor pPICZ α A pada gambar 2.3, mengandung sekuens sinyal seperti α -factor dari *Saccharomyces cerevisiae* dalam mensekresikan protein ke dalam medium kultur, serta marker seleksi seperti gen resisten terhadap Zeocin atau HIS4 untuk seleksi koloni transforman (Ahmad et al., 2014). Integrasi plasmid ke dalam kromosom *Pichia pastoris* banyak dilakukan secara homolog pada lokus AOX1 atau HIS4, tergantung pada vektor yang dipakai. Proses tersebut memungkinkan ekspresi stabil jangka panjang tanpa memerlukan plasmid bebas. Setelah terintegrasi, koloni yang didapatkan akan diinduksi dengan metanol untuk memulai ekspresi protein. Penggunaan *P. pastoris* sebagai inang ekspresi memiliki kelebihan dalam kemampuan glikolisasi yang lebih sederhana dibanding sel mamalia, kecepatan pertumbuhan tinggi, dan kemudahan dalam skala produksi (Çelik & Çalık, 2012).



Gambar 2.3 Vektor pPICZαA

Sumber: Thermo Fisher Scientifi (2010)

2.1.6 Purifikasi Protein

Purifikasi memiliki peran penting dalam proses produksi protein rekombinan, karena menentukan tingkat kemurnian dan aktivitas biologis dari protein target (Putro et al., 2021). Tujuan purifikasi adalah untuk memisahkan protein target dari berbagai pengotornya, termasuk protein sel inang, asam nukleat, endotoksin, serta varian produk yang tidak diinginkan atau bukan protein target. Oleh karena itu, purifikasi umumnya menggunakan beberapa tahap seperti penangkapan protein target, pemisahan intermediat, dan pemolesan (Jungbauer & Hahn, 2009). Tahap

penangkapan ditujukan untuk memekatkan dan menstabilkan protein target dengan menghilangkan kontaminasi seperti protease. Tahap pemisahan intermediat ditujukan untuk memisahkan protein target dengan pengotor sisa seperti asam nukleat, endotoksin, dan virus (Shukla et al., 2007). Langkah pemolesan ditujukan untuk menghilangkan sejumlah pengotor kecil dari protein target sehingga yang tersisa hanya protein yang ditargetkan saja (Putro et al., 2021).

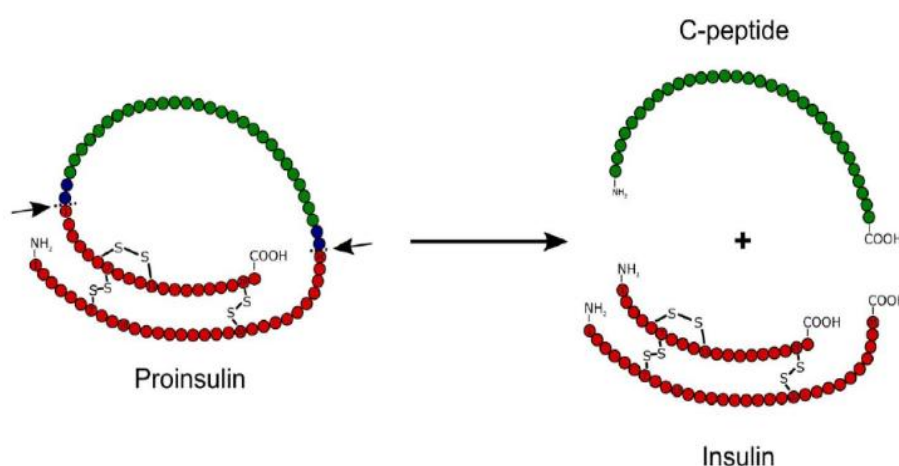
Berdasarkan evaluasi teoritis ilmu pemisahan, kromatografi menjadi metode pemisahan paling efisien dalam penggunaan preparatif dan aplikasi industri (Carta & Jungbauer, 2010). Kromatografi *ion exchange* (IEC) menjadi metode umum dalam langkah penangkapan protein. Metode ini dipilih karena kolom memiliki kapasitas pengikatan yang tinggi, memungkinkan laju aliran yang tinggi, dan tahan terhadap kondisi pembersihan kolom yang keras dan mungkin diperlukan setelah purifikasi sampel mentah (Putro et al., 2021). IEC bekerja melalui pemisahan protein berdasarkan muatan bersih permukaan pada pH tertentu, menggunakan resin bermuatan positif (*anion exchange*) dan negatif (*cation exchange*). Metode *cation exchange* telah diterapkan secara luas dalam purifikasi pro-glargin yang diproduksi oleh *Pichia pastoris*. Resin pertukaran kation digunakan dalam menangkap protein bermuatan positif seperti pro-glargin, terutama pada pH yang sesuai dengan titik isoelektrik protein (PI) tersebut. Optimasi dalam proses ini melibatkan parameter penting seperti pH buffer, pH elusi dan *flow rate*. Pengaruh parameter ditentukan dengan mengukur pemulihan pro-glargin dengan HPLC dan mengukur intensitas pita yang dihasilkan berdasarkan metode SDS-PAGE (Moser et al., 2019).

2.1.7 Biokonversi Protein

Insulin merupakan hormon utama yang mengatur metabolisme glukosa dan secara alami di sintesis oleh sel β pankreas sebagai preproinsulin, suatu rantai polipeptida tunggal, yang memiliki tiga domain: rantai B, peptida C, dan rantai A (Steiner, 2011). Prekursor insulin dikonversi menjadi insulin secara enzimatik dengan menghilangkan bagian

rantai peptida C seperti pada Gambar 2.4. Proses pematangan insulin secara fisiologis melibatkan penghilangan sinyal peptida pada *reticulum endoplasma* (RE), pembentukan jembatan disulfida antara rantai A dan B, serta pemotongan peptida C oleh enzim *prohormon convertase* (PC1 dan PC2) dan carboxypeptidase E di kelompok Golgi (Steiner et al., 2000).

Rekombinan produksi insulin dan analog insulin bergantung pada konversi prekursor insulin yang diekspresikan berlebih dalam bentuk rantai tunggal menjadi bentuk matang dua rantai secara invitro melalui reaksi kimia dan/atau enzimatik tergantung pada strategi yang telah ditentukan sebelumnya (Brubaker & Drucker, 2004). Pendekatan ini ditiru secara *in vitro* dengan produksi prekursor insulin atau enalognya seperti pro-glargin di sel melalui ekspresi sel, seperti *Pichia pastoris* atau *E. coli*, lalu dilakukan konversi enzimatik menjadi insulin aktif dalam produksi protein rekombinan (Given et al., 1985). Biokonversi *in vitro* dari proglargin menjadi insulin aktif sering dilakukan dengan menggunakan enzim *trypsin* dan *carboxypeptidase* B. Enzim *trypsin* akan memotong di sisi C-terminal dari residu arginin atau lisin, sedangkan *carboxypeptidase* B memotong residu terminal bermuatan positif untuk menghasilkan struktur insulin yang matang (Jonasson et al., 1996).



Gambar 2.4 Biokonversi Proinsulin menjadi Insulin

Sumber: Hardianto et al, (2021)

2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian terdahulu yang dijadikan referensi dalam penelitian ini disajikan dalam Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Penelitian Terdahulu

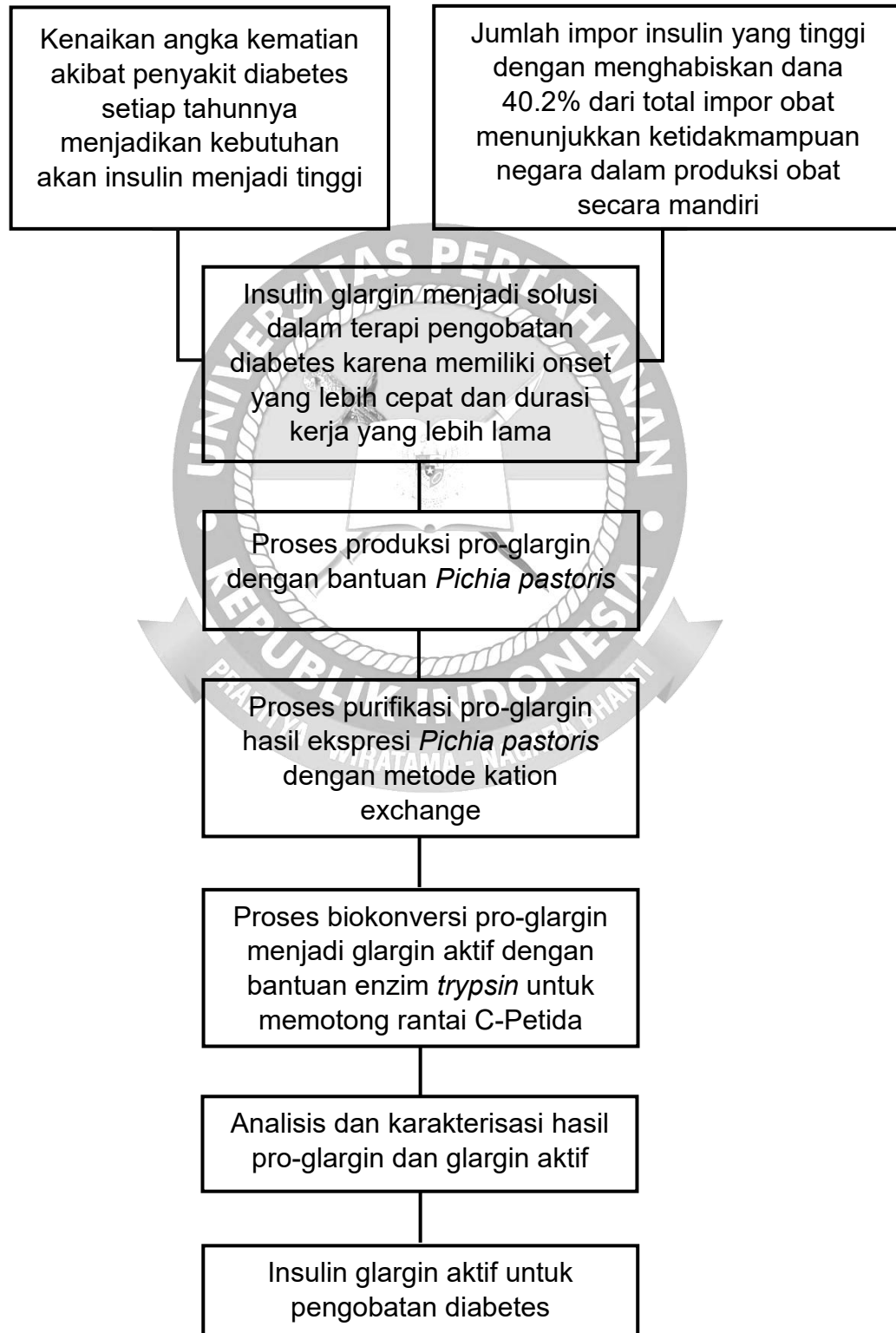
No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil	Persamaan	Perbedaan
1.	Dini et al.,2022	Enhancement in Human Insulin Precursor Secretion by <i>Pichia pastoris</i> through Modification of Expression Conditions	Melakukan modifikasi ekspresi, termasuk densitas inokulum, konsentrasi methanol, durasi induksi, pH, dan temperatur.	Peningkatan hasil tertinggi ekspresi didapatkan dengan penambahan 3% methanol, densitas inokulum 10 pada pengukuran (OD_{600}) dengan pengaturan induksi awal 0.5%.	Metode fermentasi dan pengaturan kondisi ekspresi	Penggunaan media fermentasi berupa $\frac{1}{2}$ BSM dan waktu lama induksi

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil	Persamaan	Perbedaan
2.	Hardianto et al., 2024	Increasing the production of insulin glargine in <i>Pichia pastoris</i> through medium modification	Melakukan fermentasi Insulin glargin dari <i>Pichia pastoris</i> dengan media ½ BSM dan MM dengan menambahkan perlakuan vitamin	Vitamin meningkatkan pertumbuhan sell dan peningkatan pro insulin glargin	Penggunaan komposisi media dan pengaturan kondisi	Perbedaan metode dan strain inang yang digunakan
3.	Hazra et al., 2021	<i>A novel peptide design aids in the expression and its simplified process of manufacturing of Insulin Glargin in Pichia pastoris</i>	Melakukan biokonversi insulin dengan bantuan shaker untuk mengendapkan insulin sehingga pemotongan rantai C-peptida oleh <i>trypsin</i> dapat	Biokonversi insulin langkah menjadi insulin glargin, dimungkinkan oleh desain SCP yang unik dan pendekatan pemurnian yang berbeda, menghasilkan	satu metode biokonversi dengan bantuan enzim <i>trypsin</i> dalam memotong rantai C-peptida	Perbedaan media ekspresi pro-glargin dan melakukan optimasi pH, suhu dan konsentrasi <i>trypsin</i> untuk

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil	Persamaan	Perbedaan
			dilakukan secara maksimal	proses manufaktur yang disederhanakan dan ekonomis dari obat penting ini yang digunakan untuk mengobati diabetes	dengan kondisi pengadukan ringan dalam shaker untuk mengendapkan hasil ekspresi pro-glargin.	mendapatkan hasil konsentrasi glargin aktif terbaik.
4.	Putro et al., 2021	Capture and Intermediate Purification of Human Insulin Precursor from <i>Pichia pastoris</i> Culture Using Cation Exchange Chromatography	Melakukan purifikasi dengan sentrifugasi dan filtrasi melalui kolom pertukaran kation dan dilakukan dengan dua langkah elusi serta dipantau	Pemurnian dengan muatan 10% volume muatan 500 ml menghasilkan pemulihan HIP terbaik sebesar ~47% dari HIP yang dihasilkan.	Metode purifikasi dengan kolom pertukaran kation dan komposisi buffer yang sama	Sampel media fermentasi yang berbeda yaitu berupa media ½ BSM

No.	Peneliti	Judul	Metode	Hasil	Persamaan	Perbedaan
5.	Hardianto et al., 2024	Increasing the production of insulin glargin in <i>Pichia pastoris</i> through medium modification	berdasarkan absorbansi UV dan hasil SDS-PAGE Melakukan fermentasi Insulin glargin dari <i>Pichia pastoris</i> dengan media ½ BSM dan MM menambahkan perlakuan vitamin	Vitamin meningkatkan pertumbuhan sel dan peningkatan produksi insulin glargin	Penggunaan komposisi media dan penngaturan kondisi	Perbedaan metode dan strain inang yang digunakan

2.3 Kerangka Berpikir



Gambar 2.5 Kerangka Berpikir