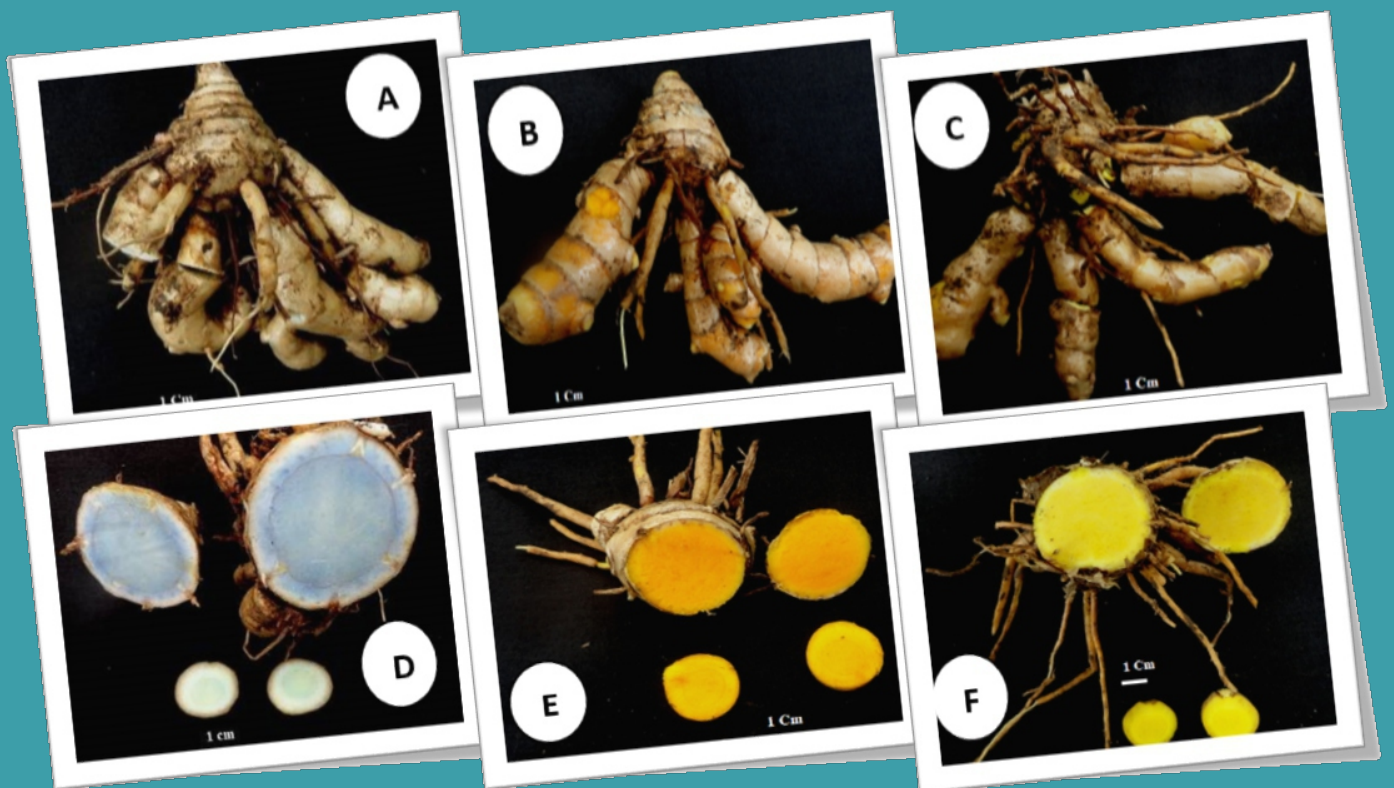


# Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



# BERITA BIOLOGI

Vol. 17 No. 2 Agustus 2018

Terakreditasi Berdasarkan Keputusan Kepala Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia  
No. 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018

---

## **Tim Redaksi (*Editorial Team*)**

Andria Agusta (Pemimpin Redaksi, *Editor in Chief*)  
(Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kusumadewi Sri Yulita (Redaksi Pelaksana, *Managing Editor*)  
(Sistematika Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Gono Semiadi  
(Mammalogi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Atit Kanti  
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Siti Sundari  
(Ekologi Lingkungan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Evi Triana  
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Kartika Dewi  
(Taksonomi Nematoda, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dwi Setyo Rini  
(Biologi Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

## **Desain dan Layout (*Design and Layout*)**

Muhamad Ruslan, Fahmi

## **Kesekretariatan (*Secretary*)**

Nira Ariasari, Enok, Budiarmo, Liana

## **Alamat (*Address*)**

Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)  
Jalan Raya Jakarta-Bogor KM 46,  
Cibinong 16911, Bogor-Indonesia  
Telepon (021) 8765066 - 8765067  
Faksimili (021) 8765059  
Email: [berita.biologi@mail.lipi.go.id](mailto:berita.biologi@mail.lipi.go.id)  
[jurnalberitabiologi@yahoo.co.id](mailto:jurnalberitabiologi@yahoo.co.id)  
[jurnalberitabiologi@gmail.com](mailto:jurnalberitabiologi@gmail.com)

---

Keterangan foto cover depan: Struktur Morfologi Rimpang. (A, D) *Curcuma aeruginosa*, (B, E) *C. longa*, dan (C, F) *C. heyneana*. (*Morphological structure of rhizome (A, D) Curcuma aeruginosa, (B, E) C. longa, dan (C, F) C. heyneana*) sesuai dengan halaman 123. (*as in page 123*).



**P-ISSN 0126-1754**  
**E-ISSN 2337-8751**  
**No. 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018**  
Volume 17 Nomor 2, Agustus 2018

# **Berita Biologi**

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

Berita Biologi	Vol. 17	No. 2	Hlm. 91 – 223	Bogor, Agustus 2018	ISSN 0126-1754
----------------	---------	-------	---------------	---------------------	----------------

**Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

Ucapan terima kasih kepada  
Mitra Bebestari nomor ini  
17(2) – Agustus 2018

Prof. Dr. Ir. Yohanes Purwanto  
(Etnobotani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Ir. Siti Susiarti  
(Etnobotani, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Sunaryo  
(Morfologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Andria Agusta  
(Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Kusumadewi Sri Yulita  
(Sistematika Molekuler Tumbuhan, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Dwi Astuti  
(Genetika, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Mohammad Irham M.Sc  
(Ekologi & taksonomi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Amir Hamidy  
(Herpetologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI)

Dr. Ir. Maya Melati, MS, MSc  
(Argonomi, Departemen Agronomi dan Hortikultura - IPB)

Dr. Yuyu Suryasari M.Sc.  
(Genetika, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Iman Hidayat  
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dra. Djamhuriyah S. Said M.Si.  
(Limnologi, Pusat Penelitian Limnologi- LIPI)

Prof. Dr. I Made Sudiana, M.Sc.  
(Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi - LIPI)

Dr. Ireng Darwati  
(Fisiologi tanaman, Balai Penelitian Rempah dan Obat - Badan Litbang Pertanian)

Ir. Yadi Suryadi, MSc.  
(Hama dan Penyakit Tanaman BB Biogen, Badan Litbang Pertanian)

Dr. Ir. Chaerani, MSc.  
(Hama dan Penyakit Tanaman, BB Biogen, Badan Litbang Pertanian)

Dr. Darkam Mussadad  
(Teknologi Pascapanen, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Bengkulu)

Ir. Sulusi Prabawati, MS  
(Pascapanen, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura– Badan Litbang Pertanian)

# *Pichia pastoris*: SEL RAGI UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN

[*Pichia pastoris*: Cell Yeast for Production of Recombinant Proteins]

Neng Herawati, Arizah Kusumawati dan Adi Santoso✉

Pusat penelitian Bioteknologi - LIPI Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong Science Center, 16911  
email: adi.santoso1960@gmail.com

## ABSTRACT

*Pichia pastoris* is a group of methylotrophic yeast known as a host of expression and protein production which is widely used for biopharmaceutical-based drug production. This yeast can grow fast with a high cell density. Its genetic stability, high cell density, and stress resistance make the development process and scale-up of *P. pastoris* can increase to a scale of 200,000 liters of culture. In contrast to the expensive and complex development of recombinant protein production in mammalian cells, the development of production in *P. pastoris* is relatively simple and cheaper. The advantage of *P. pastoris* as an expression system is that it is able to use methanol as a carbon source by inducing the expression of alcohol oxidase oxidase (AOX) enzyme. Promoter used by this enzyme is also used as a strong promoter for the expression of proteins that we want. Unlike in bacterial and mammalian systems, recombinant protein production in *Pichia* cells is not contaminated with endotoxins or viruses so it is safer and simplifies the downstream processes in bioproduction. The level of endogenous protein in the low supernatant allows *Pichia* to cultivate with a high volumetric productivity, therefore the process of protein production becomes very economical. This review provides an overview of several things that must be considered in utilizing *P. pastoris* as an expression system including the selection of vectors, strains, vector integration mechanisms into the genome, glycosylation processes, and applications in industry.

**Key words:** *Pichia pastoris*, expression system, glycosylation, vector, AOX promoter

## ABSTRAK

*Pichia pastoris* adalah kelompok ragi metilotropik yang dikenal sebagai inang ekspresi dan produksi protein yang banyak digunakan untuk produksi obat berbasis biofarmasi. Ragi ini mampu tumbuh cepat dengan kepadatan sel yang cukup tinggi. Stabilitas genetik, kerapatan sel yang tinggi, dan tahan *stress* membuat proses pengembangan dan *scale-up* *P. pastoris* meningkat hingga skala 200.000 liter kultur. Berbeda dengan pengembangan produksi protein rekombinan pada sel mamalia yang mahal dan kompleks, pengembangan produksi pada *P. pastoris* relatif sederhana dan lebih murah. Keunggulan *P. pastoris* sebagai sistem ekspresi yaitu mampu menggunakan metanol sebagai sumber karbon dengan cara menginduksi ekspresi enzim alkohol oksidase (AOX). Promoter yang digunakan oleh enzim ini juga digunakan sebagai promoter yang kuat untuk ekspresi protein yang kita inginkan. Tidak seperti pada sistem bakteri dan mamalia, produksi protein rekombinan pada sel *Pichia* tidak terkontaminasi dengan endotoksin atau virus sehingga lebih aman dan menyederhanakan proses hilirisasi dalam bioproduksi. Tingkat protein endogen dalam supernatan yang rendah memungkinkan *Pichia* untuk proses kultivasi dengan produktivitas volumetrik tinggi, serta proses produksi protein menjadi sangat ekonomis. Review ini memberikan gambaran beberapa hal yang harus dipertimbangkan dalam memanfaatkan *P. pastoris* sebagai sistem ekspresi diantaranya pemilihan vektor, galur, mekanisme integrasi vektor ke dalam genom, proses glikosilasi, serta aplikasi pada industri.

**Kata kunci:** *Pichia pastoris*, sistem ekspresi, glikosilasi, vektor, promoter AOX

## PENDAHULUAN

Ragi metilotropik *Pichia pastoris* saat ini direklasifikasikan sebagai *Komagataella pastoris* yang telah berperan besar dalam bidang bioteknologi terutama untuk produksi protein heterolog (Kurtzman, 2009). Phillips Petroleum Company merupakan perusahaan pertama yang mengembangkan media dan protokol untuk menanam *P. pastoris* pada metanol secara berkelanjutan sampai mencapai kepadatan sel yang tinggi yaitu > 130 g / berat sel kering (Cereghino dan Cregg, 2000). Perusahaan tersebut juga menjadi perusahaan pertama yang berhasil membawa riset *P. pastoris* menjadi salah satu sistem ekspresi protein yang sangat berhasil di dunia. Walaupun terdapat beberapa ragi yang mampu tumbuh dengan

baik dengan menggunakan metanol tetapi perusahaan ini tetap menggunakan *P. pastoris* untuk dikomersialkan (Ingund, 2012). Perusahaan ini mempelajari *P. pastoris* sebagai sumber potensial protein sel tunggal karena kemampuannya memanfaatkan metanol sebagai sumber karbon. Namun kenyataan berbicara lain krisis pada tahun 1973 saat minyak yang menyebabkan biaya produksi metana meningkat drastis sehingga, pada saat yang bersamaan harga kedelai yang merupakan sumber pakan yang lain menjadi sangat rendah. Hal ini membuat produksi protein dari sel tunggal [*single cell protein* (SCP)] dengan menggunakan metanol secara ekonomi menjadi sangat tidak menguntungkan. Teknik molekular biologi yang berkembang drastis pada pertengahan tahun 1980an

\*Diterima: 31 Oktober 2017 - Diperbaiki: 8 Maret 2018 - Disetujui: 23 Agustus 2018

membuat perusahaan Phillips Petroleum bekerja sama dengan Salk Institute Biotechnology/ Industrial Associates Inc. (SIBIA, La Jolla, CA, USA) mempelajari *P. pastoris* sebagai sistem untuk produksi protein secara heterolog. Gen dan promoter untuk enzim alkohol oksidase diisolasi oleh SIBIA yang juga menghasilkan vektor, galur dan protokol yang sesuai untuk manipulasi dan produksi protein rekombinan pada *P. pastoris* (Macauley *et al.*, 2005).

*Pichia* telah menjadi pusat perhatian sebagai sistem ekspresi karena kemampuannya dalam mengekspresikan protein rekombinan dengan efisiensi yang tinggi. Akibatnya konstruksi vektor rekombinan, metode untuk transformasi, marker penanda yang dapat dipilih, dan metode fermentasi telah dikembangkan dengan sangat pesat untuk mengeksploitasi potensi produktif pada sistem ini (Rosenfeld *et al.*, 1999). Research Corporation Technologies (Tucson, AZ, USA) adalah pemegang paten saat ini untuk sistem ekspresi *P. pastoris* sejak 1993, dan sistem ekspresi *P. pastoris* tersedia dalam bentuk kit dari Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, AS).

Sistem ekspresi *P. pastoris* mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan sistem ekspresi lain dalam produksi protein heterolog, diantaranya yaitu protein heterolog yang disekresikan oleh *P. pastoris* akan lebih dominan karena ragi jenis ini hanya mengeluarkan sedikit protein endogen. Kondisi ini dapat memudahkan dalam proses panen (*harvesting*) protein yang diharapkan. Metode transformasi dan seleksi pada *P. pastoris* cukup mudah untuk dilakukan seperti pada sistem bakteri. Selain itu, sistem ekspresi pada *P. pastoris* juga menghilangkan kemungkinan kontaminasi endotoksin dan bakteriofag (Li *et al.*, 2007; Weinacker *et al.*, 2013, Cereghino dan Cregg, 2000) Keberadaan *alpha mating* menjadi salah satu alasan utama penggunaan sistem ekspresi ini. Penggunaan promoter AOX1 (alkohol oksidase 1) sangat mempermudah pengontrolan ekspresi protein rekombinan yang dikehendaki melalui mekanisme induksi (Skoko *et al.*, 2003, Cereghino dan Cregg, 2000). *P. pastoris* dapat melakukan proses modifikasi pasca-translasi, seperti glikosilasi, metilasi, asilasi, regulasi proteolitik yang dapat ditargetkan pada kompartemen subselular tertentu

(Jahic *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2014; Schwarzahns *et al.*, 2016). *Pichia pastoris* mudah tumbuh dengan kepadatan sel yang tinggi (> 100 g/l berat sel kering) dalam kultur fermentor dan media yang relatif sederhana (Brierley, 1998; Li *et al.*, 2007).

### **Gambaran umum tentang kloning pada *P. pastoris***

Secara umum strategi untuk merancang studi ekspresi protein secara heterolog memerlukan banyak pertimbangan. Informasi pada Tabel 1 menunjukkan komponen vektor yang relevan digunakan untuk ekspresi protein pada *P. pastoris* termasuk diantaranya adalah signal sekresi gen penanda (marker) dan promoter. Dengan menggunakan promoter alkohol oksidase (AOX1), sistem ekspresi protein pada *Pichia pastoris* memiliki kelebihan dimana promoter ini diatur secara ketat oleh keberadaan metanol sebagai penginduksi (Skoko *et al.*, 2003, Cereghino dan Cregg, 2000). Dengan memisahkan fase pertumbuhan sel dari fase produksi protein maka biomassa dapat terakumulasi terlebih dahulu dengan efektif sebelum akhirnya ekspresi protein dilakukan dengan penambahan metanol. Pengaturan semacam ini membuat sel yang terakumulasi pada fase pertumbuhan tidak mengalami *stress* (Ahmad *et al.*, 2014).

Selain penggunaan promoter yang dapat diinduksi (*inducible promoter*), promoter lain yang juga dapat digunakan dalam sistem ekspresi protein pada *P. pastoris* adalah promoter yang bersifat konstitutif (*constitutive promoter*). Secara umum penggunaan sistem ekspresi yang bersifat konstitutif memudahkan dalam proses penanganannya. Selain menghilangkan penggunaan inducer berpotensi berbahaya, keuntungan lain penggunaan promoter konstitutif adalah memberikan transkripsi terus menerus dari gen yang diinginkan (Ahmad *et al.*, 2014). Untuk kepentingan ini, promoter yang banyak digunakan adalah promoter glyceraldehyde-3-phosphate (PGAP) (Waterham *et al.*, 1997).

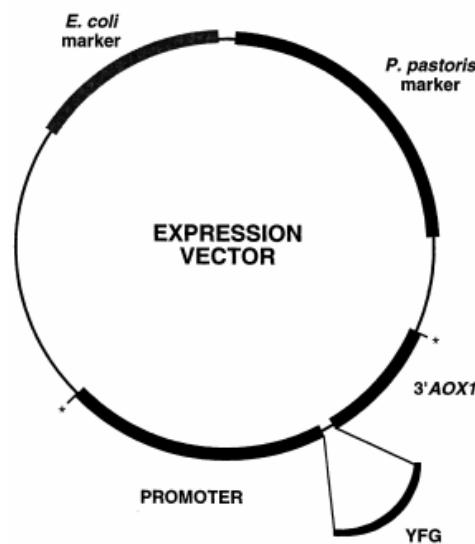
Tiga langkah dasar dalam proses ekspresi gen asing pada ragi *P. pastoris* yaitu: (1) penyisipan gen ke dalam vektor ekspresi; (2) introduksi vektor ekspresi ke dalam genom *P. pastoris*; dan (3) seleksi galur yang potensial untuk menghasilkan produk gen asing tersebut (Cereghino dan Cregg, 2000). Fitur-

fitur utama yang harus dimiliki oleh vektor ekspresi *P. Pastoris* diantaranya promotor (AOX1), sekuens terminasi transkripsi AOX1 yang efisien, poliadenilasi mRNA, dan situs kloning tunggal atau ganda (MCS/multiple cloning site) untuk menyisipkan gen asing (Cereghino dan Cregg, 2000). Selain beberapa fitur diatas, fitur seleksi untuk bakteri *E. coli* dan *P. pastoris* juga harus terdapat pada vektor ekspresi. Umumnya, vektor dirancang sebagai shuttle vector yang sesuai untuk propagasi dalam sel *E. coli* dan ekspresi pada *P. pastoris*. Gambaran umum komponen-komponen pada vektor yang digunakan untuk ekspresi pada sistem *P. pastoris* dan promotor secara umum adalah seperti terlihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Semua galur ekspresi *P. pastoris* berasal dari NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL). Berbagai galur *P. pastoris* tersedia untuk optimasi dan perolehan kembali protein heterolog. Tabel 2 menunjukkan beberapa informasi umum tentang jenis-jenis galur *P. Pastoris*.

**Promoter terinduksi**

Penggunaan promotor AOX1 untuk ekspresi gen heterolog pada *P. pastoris* pertama kali digunakan oleh Tschopp et al. (1987) dan merupakan promotor yang paling sering digunakan dimana aktivitasnya akan terinduksi oleh metanol (Gasser et al., 2013; Vogl dan Glieder, 2013; Yu et al., 2013). Promotor AOX1 akan tertekan jika sel *P. pastoris* ditumbuhkan pada media yang mengandung glukosa, gliserol atau



**Gambar 1.** Fitur umum vektor ekspresi *P. pastoris* (Common feature expression vector of *P. pastoris*) YFG (Your Favorit Gene) \* merupakan situs amplifikasi (Cereghino dan Cregg, 2000)

**Tabel 1.** Komponen vektor yang relevan untuk ekspresi protein pada *P. pastoris*(The relevant vector component for protein expression in *P. pastoris*) . (Cereghino dan Cregg, 2000)

Signal sekresi ( <i>secretion signal</i> )	none, PHO1, $\alpha$ -MF, SUC2, PHA-E
Gen penanda ( <i>marker gene</i> )	ADE1, ARG4, G418, HIS4, URA3, Zeo <sup>r</sup>
Promoter ( <i>promoter</i> )	AOX1, GAP, FLD1, PEX8, YPT1

**Tabel 2.** Galur sel *P. pastoris* (*P. pastoris* Strains)

Galur ( <i>Strain</i> )	Genotip ( <i>Genotype</i> )	Aplikasi ( <i>Application</i> )
GS115	<i>His4</i>	Seleksi vektor ekspresi yang mengandung HIS4 ( <i>Selection of expression vectors containing HIS4</i> )
X33	<i>Wild type</i>	Seleksi vektor ekspresi yang resisten terhadap Zeocin™ ( <i>Selection of expression vectors that is resistant to Zeocin™</i> )
KM71H	<i>His4, aox1:ARG, arg</i>	Seleksi vektor ekspresi yang mengandung HIS4 untuk menghasilkan galur-galur dengan fenotip Mut <sup>s</sup> ( <i>Selection of expression vectors containing HIS4 to produce strains with Mut<sup>s</sup> phenotype</i> )
SMD1168	<i>His4, pep4</i>	Seleksi vektor ekspresi yang mengandung HIS4 untuk menghasilkan galur-galur tanpa aktivitas enzim protease ( <i>Selection of expression vectors containing HIS4 to produce strains without protease enzyme activity</i> )
SMD1168H	<i>Pep4</i>	Seleksi vektor ekspresi yang resisten terhadap Zeocin untuk memperoleh galur-galur tanpa aktivitas enzim protease A ( <i>Selection of expression vectors that are resistant to Zeocin to obtain strains without activity of Protease A</i> )

etanol (Inan dan Meagher 2001). Seiring dengan berkurangnya sumber karbon maka fungsi promoter akan menjadi aktif dan akhirnya akan bekerja secara penuh dengan penambahan metanol (Shen *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2014). Walaupun AOX1 promoter sangat dikenal dan mempunyai implikasi yang tinggi pada industri tetapi penelitian yang mendalam tentang bagaimana mekanisme promoter ini bekerja belum banyak di pelajari. Mengerti secara detil tentang mekanisme promoter ini dan memanipulasinya dengan benar dapat mejadikan salah satu jalan terbaik untuk meningkatkan ekspresi. Beberapa studi terdahulu mengenai optimasi promoter AOX terfokus pada delesi dan duplikasi pada *transcription factor-binding site* dan identifikasi posisi upstream pada promoter AOX1 (Vogl dan Glieder, 2013; Portela *et al.*, 2017; Hartner *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2009). Studi lain mengenai optimasi promoter AOX dilakukan dengan memodifikasi poly dA:dT pada promoter ini (Jun *et al.*, 2018). Dari hasil penelitian ini didapatkan 34 varian pada promoter AOX yang kemudian masing-masing di analisa dengan menggunakan gen reporter hormon pertumbuhan dari babi [*porcine growth hormone (pGH)*]. Hasil yang didapat menunjukkan

peningkatan yang bervariasi, berkisar antara 0.4 – 3.5 kali lebih kuat dari promoter *wild-type*. Hasil penelitian ini memberikan informasi yang lebih dalam bahwa modifikasi secara sistemik pada poly (dA:dT) dapat digunakan untuk memanipulasi tingkat ekspresi gen yang kita inginkan (Jun *et al.*, 2018).

Metanol merupakan zat yang sangat mudah terbakar dan berbahaya, oleh karena itu kurang diinginkan untuk fermentasi dalam skala besar (Zhang *et al.*, 2010 dan Krasovska *et al.*, 2007) sehingga kurang cocok untuk menghasilkan produk seperti produk makanan atau obat-obatan. Selain itu, hasil sampingan dari metabolisme metanol adalah hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) yang dapat menimbulkan oksidatif dan akhirnya dapat menyebabkan degradasi pada protein rekombinan yang dihasilkan (Xiao *et al.*, 2006). Untuk memecahkan masalah ini harus didapatkan promoter terinduksi lainnya atau varian pAOX1 yang dapat diinduksi tanpa metanol dengan tingkat ekspresi yang tinggi.

#### Promoter konstitutif

Seperti yang telah diuraikan sebelumnya, produksi protein menggunakan promoter konstitutif



prosesnya lebih mudah karena sama sekali tidak dibutuhkan molekul inducer. Sel *Pichia* dapat tumbuh tanpa adanya perubahan sumber karbon seperti halnya yang terjadi pada ekspresi yang menggunakan metanol (Qin *et al.*, 2011). Selain lebih efisien, metode ini juga dapat mempercepat proses produksi dan murah karena tidak membutuhkan metanol. Promoter konstitutif yang umum digunakan adalah promoter *glyceraldehyde-3-phosphate* (pGAP) (Waterham *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009). Melalui penambahan glukosa, penggunaan promoter GAP mempunyai tingkat ekspresi hampir sama dengan promoter AOX1.

Selain promoter GAP, promoter konstitutif lain yang dipelajari adalah promoter pGKI. Promoter ini adalah merupakan promoter dari gen 3-fosfoglisarat kinase. Walaupun promoter ini tidak sekuat promoter pGAP tetapi promoter pGKI ini sangat layak untuk digunakan sebagai alternatif apabila hipereksresi bukan merupakan pilihan utama (Andreliisse *et al.*, 2015; De Almeida *et al.*, 2005). Selain pGAP dan pGKI, promoter konstitutif lain yang sering digunakan adalah promoter pGCW14 (Liang *et al.*, 2013). Promoter konstitutif pGCW14 merupakan promoter yang lebih kuat bila dibandingkan dengan promoter GAP. Studi

ekspresi protein EGFP dengan menggunakan promoter pGCW14 menunjukkan adanya peningkatan 10 kali lipat bila dibandingkan dengan menggunakan promoter GAP pada sel yang ditumbuhkan pada gliserol atau metanol. Tetapi jika sel ditumbuhkan pada glukosa, maka terjadi peningkatan ekspresi protein sekitar 5 kali lipat (Mudassar *et al.*, 2014). Promoter konstitutif lainnya yang sering digunakan adalah promoter TEF1. Promoter ini merupakan promoter untuk translasi elongasi faktor 1- (TEF1) yang kekuatannya sebanding dengan promoter pGAP. Tetapi promoter ini mempunyai karakteristik dimana pertumbuhannya lebih terkontrol dan menunjukkan aktivitas 2 kali lipat lebih kuat pada kultur *fed-batch* dibandingkan dengan pGAP (Jungoh *et al.*, 2007).

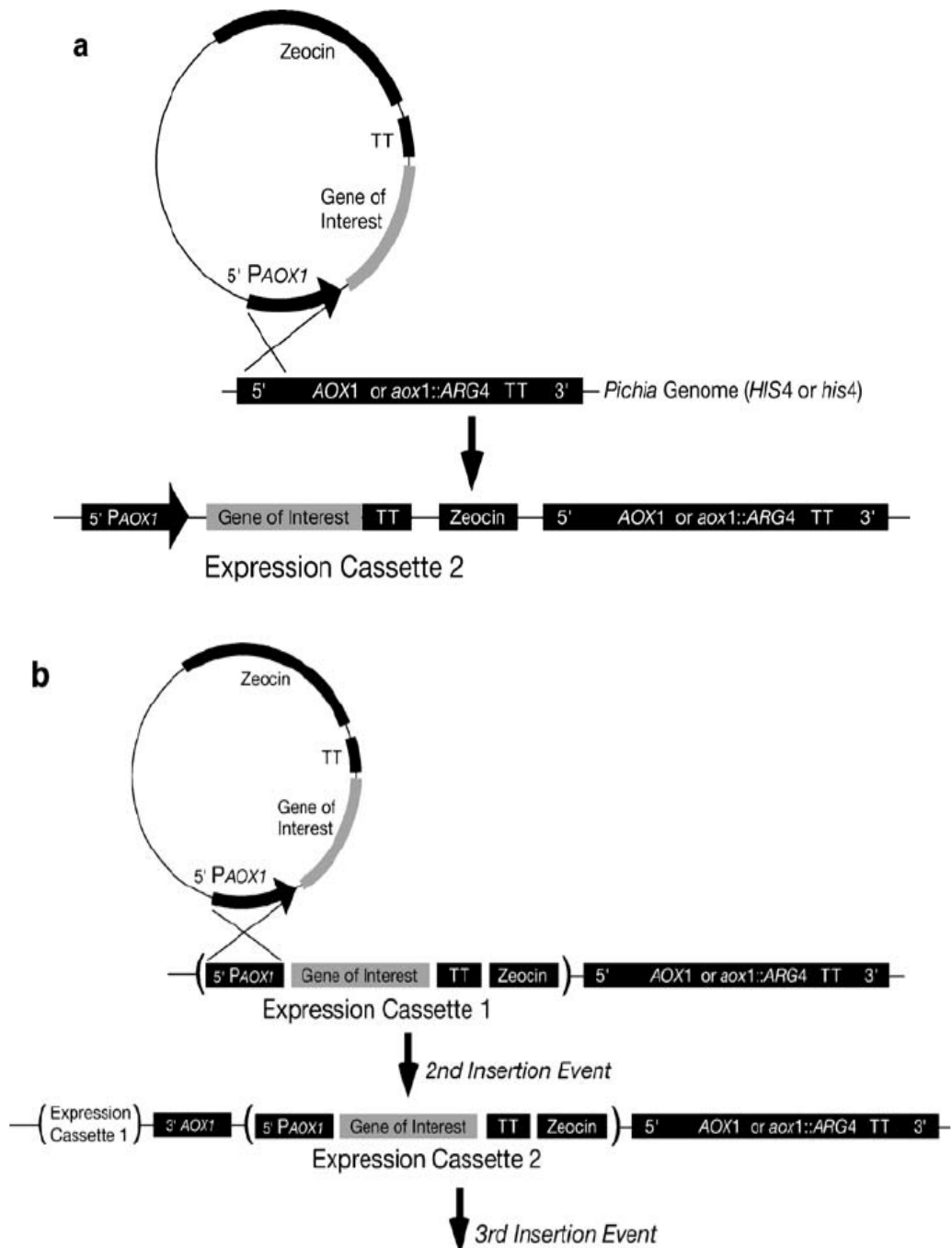
#### **Integrasi vektor ke dalam genom *P. pastoris***

Vektor ekspresi diintegrasikan ke dalam

genom *P. pastoris* dengan tujuan memaksimalkan stabilitas galur ekspresi. Dengan menggunakan metode ini, dapat dihasilkan galur yang mengandung satu atau beberapa salinan dari kaset ekspresi (Damasceno *et al.*, 2012). Seperti dalam *S. cerevisiae*, DNA vektor linear dapat menghasilkan transforman stabil *P. pastoris* melalui rekombinasi homolog antara sekuens sekuens yang homolog dari vektor dan genom inang (Gambar 2a). Rekombinasi homolog terminal DNA bebas selanjutnya akan menghasilkan integrasi tipe tunggal ke dalam lokus ini. Sebagian besar transforman-transforman *P. pastoris* akan berisi 1 salinan vektor ekspresi, namun untuk memperoleh transforman dengan level ekspresi protein yang tinggi, maka dilakukan seleksi integrasi multikopi (Du *et al.*, 2012).

#### **GLIKOSILASI**

Glikosilasi adalah proses penambahan gugus-gugus gula pada struktur protein. Glikosilasi termasuk salah satu proses modifikasi pasca translasi yang memberikan keragaman besar terhadap proteomik jika dibandingkan dengan modifikasi-modifikasi pasca translasi lainnya (Weerapana *et al.*, 2006; Walsh, *et al.*, 2005). Glikosilasi memegang peran penting untuk berbagai proses biologis, termasuk pelekatan sel pada matrik ekstraseluler dan interaksi protein-ligan dalam sel (Uematsu *et al.*, 2005). Secara struktural, glikosilasi adalah hal yang sangat kompleks karena adanya heterogenitas yang berhubungan dengan situs dimana gugus glikan akan menempel (*macroheterogeneity*) dan heterogenitas yang berhubungan dengan struktur dari glikannya (*microheterogeneity*). Meskipun banyak residu protein yang ditemukan terlikosilasi dengan berbagai macam glikan (Sears dan Wong, 1998), tetapi pada manusia situs glikosilasi paling umum terjadi pada residu asparagin (glikosilasi N-link dengan urutan pengenalan Asn-X-Thr/Ser) dan serine atau residu treonin (glikosilasi O-link) dengan gugus monosakarida sebagai berikut: *fucose*, *galactose*, *manosa* (Man), *N-acetylglucosamine* (GlcNAc), *N-acetylgalactosamine*, dan asam sialat (*N-acetylneuraminic acid*) (Hossler *et al.*, 2007).



**Gambar 2.** Peta integrasi gen heterolog ke dalam genom *P. pastoris*. a) Integrasi salinan tunggal, b) integrasi multikopi. (Invitrogen, 2001) (*Map of integration of heterologous gene into the genome of P. pastoris. a) single copy integration, b) multicopy integration*).

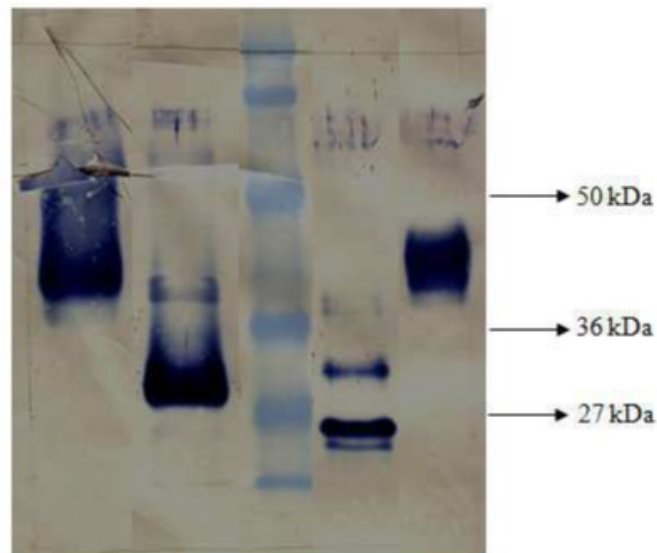
Glikosilasi memainkan peranan penting dalam jalur biosintesis - sekresi pada retikulum endoplasma (ER) dan badan golgi. Glikosilasi adalah kunci untuk menghasilkan protein terapeutik yang dapat ditoleransi oleh tubuh manusia tanpa reaksi antigenik.

Dalam proses produksi obat berbasis protein, sebagian besar protein terapeutik membutuhkan modifikasi pasca-translasi tambahan, seperti proses *N*-glikosilasi yang tidak dapat disediakan oleh sel prokariotik (Helenius dan Aebi, 2001). Proses *N*-glikosilasi memastikan akan struktur protein, fungsi dan stabilitas selanjutnya dalam serum manusia. Untuk memfasilitasi kebutuhan kompleks proses glikosilasi dan mempunyai kemiripan dengan protein pada manusia maka saat ini sebagian besar obat berbasis terapeutik protein (sekitar 70%) diproduksi dengan menggunakan sel mamalia CHO (Matasci *et al.*, 2008). Namun, karena biaya yang tinggi untuk media pertumbuhan yang kompleks, maka sistem alternatif lain yang lebih murah harus menjadi pilihan.

Produksi glikoprotein manusia oleh *P. pastoris* dapat menimbulkan masalah karena pola glikosilasi yang dihasilkan berbeda dengan sel mamalia (Davis, 2002). Pembentukan gugus glikan (Man)<sub>8</sub>- (GlcNAc)<sub>2</sub> di retikulum endoplasma pada manusia dan ragi sangat mirip. Namun, keragaman struktur glikan yang diproduksi pada sel mamalia jauh lebih tinggi. Pada ragi sebaliknya yaitu menghasilkan struktur glikan manosa yang tinggi yang mana dapat menyebabkan penurunan waktu paruh serum dan dapat memicu reaksi alergi dalam tubuh manusia (Ballou, 1990). Studi pada ekspresi protein rekombinan *human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), obat yang digunakan untuk penderita yang mengalami kelainan sel neutrofil, menunjukkan bahwa penggunaan *P. pastoris* menghasilkan protein GM-CSF yang lebih aktif dan efek imunogenik yang lebih rendah bila dibandingkan dengan penggunaan *Saccharomyces cerevisiae*. Hal ini menunjukkan bahwa kadar manosa yang tinggi (*hiper-mannosylation*) pada *S. cerevisiae* dapat memberikan efek yang serius pada aktivitas biologis dan reaksi imunogenik protein yang dihasilkan (Anh *et al.*, 2017). Meskipun

*hiper-mannosylation* pada *P. pastoris* tidak begitu menonjol seperti di *S. cerevisiae*, kondisi ini masih tetap menghadirkan masalah pada manusia (De Pourcq *et al.*, 2010). *N*-glikosilasi yang terjadi pada *P. pastoris* juga berbeda dari eukariot lainnya. Penelitian menggunakan protein yang mempunyai pola glikosilasi yang sangat tinggi sebagai contoh *erythropoietin* dengan berat molekul sekitar 38 kDa menunjukkan dengan jelas bahwa protein yang diproduksi oleh *P. pastoris* masih mengandung lebih banyak karbohidrat yang mengalami hiperglikosilasi seperti yang terlihat pada Gambar 3 (baris 1 dan 2) apabila dibandingkan dengan protein yang diproduksi pada sel mamalia (misal sel CHO) (baris 4 dan 5) (Santoso *et al.*, 2013). Untuk menunjukkan bahwa protein *backbone* pada *erythropoietin* ini mempunyai ukuran seperti yang diharapkan, enzim PNGase F digunakan untuk memotong ikatan antara gugus glikan dan asam amino asparagin pada protein *erythropoietin*. Pada gambar tersebut terlihat jelas bahwa *backbone* protein yang dihasilkan mempunyai ukuran yang sama sekitar 27 kDa.

Kandungan gugus *N* - oligosakarida manosa yang tinggi pada protein hasil sekresi *P. pastoris* menjadi masalah signifikan ketika protein tersebut diproduksi dalam industri farmasi, karena dapat menyebabkan reaksi antigenik dan dengan cepat akan dibersihkan dari darah oleh hati (Anh *et al.*, 2017). Oleh karena itu menghilangkan tingginya kandungan gugus manosa pada protein yang diproduksi oleh *P. pastoris* adalah menjadi salah satu tujuan utama dalam penelitian pada *P. pastoris* (Hamilton dan Gerngross, 2007). Menghadapi kenyataan ini, salah satu hal yang harus diselesaikan adalah bagaimana menghilangkan ekstensi  $\alpha$ -1,6 manosa yang dapat menyebabkan *hypermannosylation* dalam ragi. Aksi enzim *1,6 mannosyltransferase* (OCH1) menyebabkan meningkatnya jumlah glikan dengan lebih dari 30 residu manosa tambahan. Memblokir penambahan manosa oleh enzim *1,6 mannosyltransferase* (OCH1) ini merupakan langkah yang sangat penting dalam mencegah *hypermannosylation* seperti yang jelaskan oleh Hamilton dan Gerngross (2007). Studi oleh (Nakanishi *et al.*, 1993) menunjukkan bahwa eliminasi OCH1 dan MNN1



**Gambar 3.** Hasil analisa Western blot protein rekombinan human *erythropoietin* (rhEPO). [Result of analysis Western blot of recombinant human *erythropoietin* (rhEPO) protein]. Baris 1 : rhEPO dari *P. pastoris*, baris 2 : rhEPO dari *P. pastoris* setelah perlakuan dengan enzim PNGase F. Baris 3 : Marker (b-galaktosidase 118 kDa; BSA 90 kDa; ovalbumin 50 kDa; karbonik anhidrase 36 kDa; beta-laktoglobulin 27 kDa dan lysozyme 20 kDa). Baris 4 : rhEPO dari sel mamalia CHO setelah perlakuan dengan enzim PNGase F. Baris 5 : rhEPO dari sel mamalia CHO (Santoso *et al.*, 2013). [Line 1: rhEPO from *P. pastoris*, Line 2: rhEPO from *P. pastoris* after treatment with PNGase F enzyme, Line 3: Marker (b-galaktosidase 118 kDa; BSA 90 kDa; ovalbumin 50 kDa; carbonic anhidrase 36 kDa; beta-laktoglobulin 27 kDa dan lysozyme 20 kDa. Line 4: rhEPO from mammalian cell CHO after treatment with PNGase F enzyme. Line 5: rhEPO from mammalian cell CHO (Santoso *et al.*, 2013)].

pada *S. cerevisiae* menghasilkan galur dengan glikan tunggal yang merupakan langkah penting untuk produksi glikoprotein mamalia. Studi ini akhirnya berujung pada tahap yang sangat kritikal pada humanisasi glikosilasi pada ragi yaitu tahap bagaimana melakukan transfer asam sialat ke terminal b-1,4 galaktosa gula glikoprotein yang sangat kompleks. Langkah ini dipandang sebagai yang paling sulit untuk dilakukan dalam proses humanisasi glikosilasi pada ragi karena minimal harus memenuhi 4 kriteria, yaitu: (i) ketersediaan gugus terminal b-1,4 galaktosa pada golgi, (ii) kemampuan untuk mensintesis asam CMP-sialic, (iii) kemampuan untuk mengangkut asam CMP-sialic ke golgi dan (iv) kemampuan untuk mentransfer asam sialat ke terminal  $\beta$ -1,4 galaktosa residu. Dengan mengintroduksi 4 step ini, Hamilton *et al.* (2006) mampu mensintesa glikoprotein *sialylated* pertama yang kompleks dalam ragi.

### Pentingnya pengembangan transforman yang diinginkan

Pengembangan teknologi rekayasa genetika untuk produksi protein terapeutik, telah dilakukan pada suatu mikroorganisme atau organisme. Sistem prokariotik (bakteri) dan eukariotik (misal: ragi, mamalia, serangga, dan tumbuhan) telah banyak digunakan sebagai organisme inang (*host*) untuk memproduksi protein terapeutik dan vaksin. Protein dengan ukuran lebih dari 100 kDa umumnya diekspresikan dalam sel eukariotik sedangkan protein kecil 30 kDa diproduksi pada sel prokariota. Lebih dari 500 protein, dari enzim industri hingga biofarmasi, telah diproduksi dalam *P. pastoris* (Patrick *et al.*, 2005). Banyak protein rekombinan telah berhasil diekspresikan pada *P. pastoris* (Shi *et al.*, 2007). Tabel 3 menunjukkan beberapa protein yang sukses diekspresikan pada sel *P. pastoris*.

**Tabel 3.** Tingkat ekspresi beberapa protein heterolog oleh *Pichia pastoris* (g/L) yang diproduksi dalam skala fermentor dan digunakan untuk kebutuhan industri farmasi (Julien, 2006). [*The expression level of several heterologous proteins by Pichia pastoris (g / L) produced in a fermentor scale which is used for the needs of the pharmaceutical industry* ] (Julien, 2006).

Protein yang diekspresikan ( <i>Expression of protein</i> )	Titer (g/L)
Vaksin ( <i>Vaccine</i> )	
Tetanus toxin fragment C	12
Heavy chain botulinum neurotoxin serotype A	1.72*
Fragmen Antibodi ( <i>Antibody fragment</i> )	
A33scFv	4
Anti-HB Fab	0.05
Anti-HbsAg Fab	0.46
Hormon ( <i>Hormone</i> )	
Human parathyroid hormone	0.3
Sitokinin ( <i>Cytokines</i> )	
Human tumor necrosis factor	10
Bovine interferon gamma	1.0
Ovine interferon tau	0.4
Protein matriks ( <i>Matrix protein</i> )	
Mouse gelatin	14.8
Human collagen I-III	0.2-0.6

\*protein intraseluler, level ekspresi per gram sel  
(*intracellular protein, expression level per gram cell*)

Optimasi produksi protein suatu sistem ekspresi sangat ditentukan oleh tingkat ekspresi proteinnya. Karena hal ini sangat berhubungan dengan efisiensi biaya yang dibutuhkan maka tahapan untuk mendapatkan transforman yang sesuai dengan yang diinginkan adalah sangat kritis. Selain produksi yang tinggi, transforman yang diinginkan juga harus mempunyai karakteristik yang spesifik juga. Masalah yang kompleks ini akhirnya berujung pada metode skrining yang digunakan. Metode skrining klon yang tepat akan sangat membantu dalam proses selanjutnya yang semakin rumit. Skrining klon *P. pastoris* pada umumnya menggunakan antibiotik (misal: Zeocin) dan dikombinasikan dengan teknik *Western blot* dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Selain skrining yang tepat, transforman yang unggul juga sangat dipengaruhi oleh pemilihan vektor ekspresi dan galur inang yang tepat. Transforman dengan salinan (*copy*) tunggal dapat dihasilkan melalui pentargetan kaset ekspresi linear ke lokus AOX1 sehingga terjadi penggantian gen. Hasil transformasi melalui

penggantian gen di lokus AOX1 memiliki fenotip penggunaan metanol lambat (*Mut<sup>S</sup>*) dan dapat dengan mudah diidentifikasi melalui replika plating pada media minimal metanol (Aw dan Polizzi, 2013).

Skrining klon transforman *P. pastoris* dengan tingkat ekspresi tinggi difokuskan pada pemilihan klon yang memiliki integrasi multikopi pada kaset ekspresi (Aw dan Polizzi, 2013). Berbagai sumber publikasi menjelaskan metode yang dapat digunakan untuk memperoleh galur yang mengandung kaset ekspresi multikopi dan menunjukkan adanya korelasi antara jumlah salinan dan tingkat ekspresi intraseluler dengan protein yang disekresikan. Permasalahan ketidakstabilan genetik dapat dijumpai pada integrasi kaset ekspresi multikopi. Hal ini dikarenakan tingginya rekombinasi pada *P. pastoris* sehingga kaset ekspresi mungkin dipotong melalui rekombinasi *loop-out* (Aw dan Polizzi 2013; Marx et al., 2009). Metode yang umumnya digunakan untuk menghasilkan galur *P. pastoris* dengan ekspresi multikopi yaitu melalui seleksi klon

transformasi pada media seleksi yang mengandung antibiotik dengan konsentrasi bertingkat (misalnya dari 100 µg/ml sampai 2.000 µg/ml Zeocin™). Pada umumnya transforman hanya memiliki satu salinan gen yang terintegrasi ke dalam genom inang sehingga banyak klon yang harus diseleksi untuk mendapatkan klon transforman multikopi (Lin-Cereghino dan Lin-Cereghino, 2007). Untuk mempercepat mendapatkan transforman multikopi, beberapa metode terbaru (*high-throughput*) telah digunakan untuk menskrining klon dalam jumlah yang banyak melalui kultur skala kecil pada *deep well plates* (Mellitzer *et al.*, 2012; Weinhandl *et al.*, 2012; Weis *et al.*, 2004).

Rumitnya penentuan transforman yang akan digunakan dalam proses produksi protein adalah kadang transforman yang terpilih belum tentu memiliki pertumbuhan yang baik pada saat dikultivasi dalam fermentor. Selain itu proses skrining dengan menggunakan penanda resistensi terhadap antibiotik tertentu mempunyai prevalensi tinggi adanya koloni positif-palsu. Hal ini mungkin dapat disebabkan oleh pecahnya sel yang tertransformasi sehingga dapat menyebabkan sel yang tidak tertransformasi menjadi resisten terhadap antibiotik yang digunakan untuk proses skrining. Untuk seleksi transforman yang memiliki gen tunggal atau multikopi, konsentrasi antibiotik (misal: Zeocin) dapat di atur secara bertingkat, misal: misalnya 25 µg/ml untuk salinan tunggal dan 400 µg/ml untuk transforman multikopi. Setelah potensial transforman yang sesuai telah didapatkan biasanya proses selanjutnya yang dilakukan adalah stabilitas sel dan pengaruhnya pada produksi. Analisa awal yang dilakukan termasuk diantaranya adalah analisis RT-PCR secara kuantitatif, *Southern blot* dan uji produksi pada bioreaktor. Uji skala kecil dapat dilakukan dalam skala kecil pada *deep well plates* atau *shake flasks* (Ahmad *et al.*, 2014).

## KESIMPULAN

*Pichia pastoris* adalah host ekspresi protein yang sudah terbukti banyak digunakan untuk menghasilkan produk-produk biofarmasi dan enzim. Ragi ini mempunyai beberapa keunggulan sebagai sistem ekspresi diantaranya: kemampuan

tumbuh mencapai tingkat densitas sel yang cukup tinggi, memiliki promotor yang diregulasi kuat dengan induser metanol, serta mampu melakukan ekspresi sampai level gram per liter media baik secara intraseluler maupun ekstraseluler. Selain mempunyai banyak keunggulan, salah satu kelemahan pada *P. pastoris* adalah pola glikosilasinya yang berbeda dengan pola glikosilasi pada sel mamalia. Walaupun studi tentang humanisasi pola glikosilasi pada *P. pastoris* telah banyak dilakukan tetapi belum membuahkan hasil seperti yang diharapkan. Hal ini membuat produksi glikoprotein masih harus dilakukan dengan menggunakan sel mamalia.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia yang telah mendanai riset tentang *Pichia*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievement and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp. 5301–5317.
- Anh, M.T., Thanh, N.T., Cong, N., Xuan, M.H.T., Cao, T.N., Minh, T.T., Linh, T.T., Stephanie, P.C., Roslyn, M.B. and Hieu, T.V., 2017. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: A case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Res Notes*, 10(148), pp 1–8.
- Aw, R. and Polizzi, K.M., 2013. Can too many copies spoil the broth. *Microbial Cell factories*, 12(128), pp. 1–9.
- Ballou, L., Hernandez, L.M., Alvarado, E. and Ballaou, C.E., 1990. Revision of the oligosaccharide structures of yeast carboxy peptidase Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, pp. 3368–3372.
- Brierley, R.A., 1998. Secretion of recombinant human insulin like growth factor I (IGF-1). *Methods in Molecular Biology*, 103, pp. 149–177.
- Cereghino, J.I. and Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, pp. 45–66.
- Ciofalo, V., Barton, N., Kreps, J., Coats, I. and Shanahan, D., 2006. Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45(1), pp. 1–8.
- Cregg, J. and Tolstorukov, I., 2012. *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins. *United States Patent US*, No. 8222386.
- Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. and Madden K.R., 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), pp. 3376–3385.
- Damasceno, L.M., Huang, C.J. and Batt, C.A., 2012. Protein

- secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, pp. 31–39.
- Davis, B.G., 2002. Synthesis of glycoproteins. *Chemical Reviews*, 102(2), pp. 579–601.
- De Almeida, J.R., de Moraes, L.M. and Torres, F.A., 2005. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast*, 22, pp. 725–737.
- De Pourcq, K., De Schutter, K. and Callewaert, N., 2010. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, pp. 1617–1631.
- De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Van de Peer, Y. and Callewaert, N., 2009. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27(6), pp. 561–566.
- Du, M., Battles, M.B. and Nett, J.H., 2012. A color-based stable multi-copy integrant selection system for *Pichia pastoris* using the attenuated *ADE1* and *ADE2* genes as auxotrophic markers. *Bioengineered*, 3, pp. 32–37.
- Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M. and Mattanovich, D., 2013. *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiology*, 8, pp. 191–208.
- Hamilton, S.R. and Gerngross, T.U., 2007. Glycosylation engineering in yeast: The advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5), pp. 387–392.
- Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H. and Choi, B.K., 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313, pp. 1441–1443.
- Hartner, F.S., Ruth, C., Langenegger, D., Johnson, S.N., Hyka, P., Lin-Cereghino, G.P., Lin-Cereghino, J., Kovar, K., Cregg, J.M. and Glieder, A., 2008. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 36(12), pp. 1–15.
- Helenius, A. and Aebi, M., 2001. Intracellular function of N-linked glycans. *Science*, 291(5512), pp. 2364–2369.
- Hossler, P., Mulukutla, B.C. and Hu, W.S., 2007. Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells. *PLoS ONE*, 2(1), e713, pp. 1–17.
- Inan, M. and Meagher, M.M., 2001. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), pp. 585–589.
- Ingund, R.R., 2012. Improvement of *Pichia pastoris* AOX1 Promoter Expression System. Institute für Molekulare Biotechnologie. *Dissertation*, Technische Universität, Graz.
- Invitrogen, 2001. Easysselect™ *Pichia* expression kit: A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1740-01.
- Jahic, M., Rotticci, M.J., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S.O., 2002. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24, pp. 385–393.
- Julien, C., 2006. Production of humanlike recombinant proteins in *Pichia pastoris*: From expression vector to fermentation strategy. *Bioprocess Technical*, 4(1) pp. 22–31.
- Jun, Y., Cai, H., Liu, J., Zeng, M., Chen, J., Cheng, Q. and Zhang, L., 2018. Controlling AOX1 promoter strength in *Pichia pastoris* by manipulating poly (dA:dT) tracts. *Scientific Reports*, 8(1401), pp. 1–11. doi:10.1038/s41598-018-19831-y.
- Jungoh, A., Jiyeon, H., Hyeokweon, L., Myongsoo, P., Eungyo, L., Chunsuk, K., Euisung, C., Joonki, J. and Hongweon, L., 2007. Translation elongation factor 1-α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, pp. 601–608.
- Krasovska, O.S., Stasyk, O.G., Nahorny, V.O., Stasyk, O.V., Granovski, N., Kordium, V.A., Vozianov, O.F. and Sibiry, A.A., 2007. Glucose induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, pp. 858–870.
- Küberl, A., Schneider, J., Thallinger, G.G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., Jaenicke, S., Brinkroff, K., Goesmann, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Schwab, H., Glieder, A. and Pichler, H., 2011. High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal of Biotechnology*, 154(4), pp. 312–320.
- Kurtzman, C.P., 2009. Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(11), pp. 1435–1438.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao X.G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N. and Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 142, pp. 105–124.
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzana, V.V., Duzgunes, N. and Renugopa, L.V., 2007. Expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 142, pp. 105–124.
- Liang, S., Lin, Y., Chengjuan, Z. and Ye, Y., 2013. Identification and characterization of PGCW14: A novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 35(11), pp. 1865–1871.
- Lin Cereghino, J. and Lin Cereghino, G.P., 2008. Vectors and strains for expression. *Methods in Molecular Biology*, 389, pp. 11–26.
- Macauley, P.S., Fazenda, M.L., McNeil, B. and Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22, pp. 249–270.
- Marx, H., Mecklenbrauker A., Gasser, B., Sauer, M. and Mattanovich, D., 2009. Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Research*, 9(8), pp. 1260–1270.
- Matasci, M., Hacker, D.L., Baldi, L. and Wurm, F.M., 2008. Protein therapeutics recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: Current status and future prospects. In: *Drug Discovery Today: Technologies*, 5, pp. 37–42.
- Mellitzer, A., Weis, R., Glieder, A. and Flicker, K., 2012. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 11(61), pp. 1–11.
- Mudassar, A., Melanie, H., Harald, P. and Helmut S., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp. 5301–5317.
- Nakanishi, S.Y., Nakayama, K., Tanaka, A., Toda, Y. and Jigami, Y., 1993. Structure of the N-linked oligosaccharides that show the complete loss of alpha-1,6-polymannose outer chain from och1, och1 mnn1, and och1 mnn1 alg3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, pp. 26338–26345.

- 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.
- Portela, R.M.C., Vogl, T., Kniely, C., Fischer, J.E., Oliveira, R. and Glieder, A., 2017. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species. *ACS Synthetic Biology* Portela, 6(3), pp. 471–484.
- Qin, X., Qian, J., Yao, G., Zhuang, Y., Zhang, S. and Chu, J., 2011. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), pp. 3600–3608.
- Rosenfeld, S.A., Nadeau D., Tirado, J., Hollis, G.F., Knabb, R.M. and Jia, S., 1999. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*, 306, pp. 154–169.
- Santoso, A., Rubiyana, Y., Wijaya, S.K., Herawati, N., Wardiana, A. and Ningrum, R.A., 2013. Heterologous expression and characterization of human erythropoietin in *Pichia pastoris*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4 (4), pp. 187–196.
- Schwarzans, J.P., Wibberg, D., Winkler, A., Luttermann, T., Kalinowski, J. and Friehs, K., 2016. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microbial Cell Factories*, 15(84), pp. 1 – 15.
- Sears, P. and Wong, C.H., 1998. Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54 (3), pp. 223 – 252.
- 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.
- Shi, L., Wang, D., Chan, W. and Cheng, L., 2007. Efficient expression and purification of human interferon alpha2b in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 54, pp. 220–226.
- Skoko, N., Argamante, B., Grujicić, N.K., Tisminetzky, S.G., Glisin, V. and Ljubijankić, G., 2003. Expression and characterization of human interferon-beta 1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(3), pp. 257–265.
- Takagi, S., Tsutsumi, N., Terui, Y. and Kong, X.Y., 2008. Method for methanol independent induction from methanol inducible promoters in *Pichia*. *United States patent US*, No 8143023.
- Thompson, C.A., 2010. FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(93), pp. 93–94. doi:10.2146/news100005.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L. 1987. High-Level secretion of Glycosylated invertase in the Methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 5, pp. 1305–1308.
- Uematsu, R., Furukawa, J., Nakagawa, H., Shinohara, Y., Deguchi, K., Monde, K. and Nishimura, S.I., 2005. High throughput quantitative glycomics and glycoform-focused proteomics of murine dermis and epidermis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4, pp. 1977–1989.
- Vogl, T. and Glieder, A., 2013. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), pp. 385–404.
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S. and Jr. Gatto G.J., 2005. Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 44(45), pp. 7342–7372.
- Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J., Lair, S.V. and Cregg, J.M., 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, 186(1), pp. 37–44.
- Weerapana, E. and Imperiali, B., 2006. Asparagine-linked protein glycosylation: From eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, 16(6), pp. 91–101.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A.B., Figueroa, C.A., Pessoa, A. and Farias, J.G., 2013. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), pp. 1043–1048.
- Weinhandl, K., Winkler, M., Glieder, A. and Camattari, A., 2012. A novel multienzymatic high throughput assay for transaminase activity. *Tetrahedron*, 68, pp. 7586–7590.
- Weis, R., Luiten, R., Skranc, W., Schwab, H., Wubbolts, M. and Glieder, A., 2004. Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Research*, 5(2), pp. 179–189.
- Xiao, A., Zhou, X., Zhou, L. and Zhang, Y., 2006. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72, pp. 837–844.
- Xuan, Y., Zhou, X., Zhang, W., Zhang, X., Song, Z. and Zhang, Y., 2009. An upstream activation sequence controls the expression of AOX1 gene in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 9, pp. 1271–1282.
- Yu, X.W., Sha C., Guo, Y.L., Xiao, R. and Xu, Y., 2013. High level expression and characterization of a chimeric lipase from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production. *Biotechnol Biofuels*, 6(29), pp. 1–12. doi:10.1186/17546834-6-29.
- Zhang, A.L., Luo, J.X., Zhang, T.Y., Pan, Y.W., Tan, Y.H., Fu, C.Y. and Tu, F.Z., 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep*, 36, pp. 1611–1619.
- Zhang, P., Zhang, W., Zhou, X., Bai, P., Cregg, J.M. and Zhang, Y., 2010. Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy. *Appl Environ Microbiol*, 76, pp. 6108–6118.



# Pedoman Penulisan Naskah Berita Biologi

**Berita Biologi** adalah jurnal yang menerbitkan artikel kemajuan penelitian di bidang biologi dan ilmu-ilmu terkait di Indonesia. Berita Biologi memuat karya tulis ilmiah asli berupa makalah hasil penelitian, komunikasi pendek dan tinjauan kembali yang belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain. Masalah yang diliput harus menampilkan aspek atau informasi baru.

## Tipe naskah

### 1. Makalah lengkap hasil penelitian (*original paper*)

Naskah merupakan hasil penelitian sendiri yang mengangkat topik yang *up to date*, tidak lebih dari 15 halaman termasuk tabel dan gambar. Pencantuman lampiran seperlunya, namun redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.

### 2. Komunikasi pendek (*short communication*)

Komunikasi pendek merupakan makalah hasil penelitian yang ingin dipublikasikan secara cepat karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar dapat segera diketahui oleh umum. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Hasil dan pembahasan boleh digabung.

### 3. Tinjauan kembali (*review*)

Tinjauan kembali merupakan rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik penelitian tertentu. Hal yang ditinjau meliputi segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan yang memberikan gambaran '*state of the art*', meliputi temuan awal, kemajuan hingga issue terkini, termasuk perdebatan dan kesenjangan yang ada dalam topik yang dibahas. Tinjauan ulang ini harus merangkum minimal 30 artikel.

## Struktur naskah

### 1. Bahasa

Bahasa yang digunakan adalah Bahasa Indonesia atau Inggris yang baik dan benar.

### 2. Judul

Judul diberikan dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Judul harus singkat, jelas dan mencerminkan isi naskah dengan diikuti oleh nama serta alamat surat menyurat penulis dan alamat email. Nama penulis untuk korespondensi diberi tanda amplop cetak atas (*superscript*).

### 3. Abstrak

Abstrak dibuat dalam dua bahasa, bahasa Indonesia dan Inggris. Abstrak memuat secara singkat tentang latar belakang, tujuan, metode, hasil yang signifikan, kesimpulan dan implikasi hasil penelitian. Abstrak berisi maksimum 200 kata, spasi tunggal. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci yang terdiri atas maksimum enam kata, dimana kata pertama adalah yang terpenting. Abstrak dalam Bahasa Inggris merupakan terjemahan dari Bahasa Indonesia. Editor berhak untuk mengedit abstrak demi alasan kejelasan isi abstrak.

### 4. Pendahuluan

Pendahuluan berisi latar belakang, permasalahan dan tujuan penelitian. Perlu disebutkan juga studi terdahulu yang pernah dilakukan terkait dengan penelitian yang dilakukan.

### 5. Bahan dan cara kerja

Bahan dan cara kerja berisi informasi mengenai metoda yang digunakan dalam penelitian. Pada bagian ini boleh dibuat sub-judul yang sesuai dengan tahapan penelitian. Metoda harus dipaparkan dengan jelas sesuai dengan standar topik penelitian dan dapat diulang oleh peneliti lain. Apabila metoda yang digunakan adalah metoda yang sudah baku cukup ditulis sitasinya dan apabila ada modifikasi maka harus dituliskan dengan jelas bagian mana dan hal apa yang dimodifikasi.

### 6. Hasil

Hasil memuat data ataupun informasi utama yang diperoleh berdasarkan metoda yang digunakan. Apabila ingin mengacu pada suatu tabel/grafik/diagram atau gambar, maka hasil yang terdapat pada bagian tersebut dapat diuraikan dengan jelas dengan tidak menggunakan kalimat 'Lihat Tabel 1'. Apabila menggunakan nilai rata-rata maka harus menyertakan pula standar deviasinya.

### 7. Pembahasan

Pembahasan bukan merupakan pengulangan dari hasil. Pembahasan mengungkap alasan didapatkannya hasil dan arti atau makna dari hasil yang didapat tersebut. Bila memungkinkan, hasil penelitian ini dapat dibandingkan dengan studi terdahulu.

### 8. Kesimpulan

Kesimpulan berisi informasi yang menyimpulkan hasil penelitian, sesuai dengan tujuan penelitian, dan penelitian berikutnya yang bisa dilakukan.

### 9. Ucapan terima kasih

Bagian ini berisi ucapan terima kasih kepada suatu instansi jika penelitian ini didanai atau didukung oleh instansi tersebut, ataupun kepada pihak yang membantu langsung penelitian atau penulisan artikel ini.

### 10. Daftar pustaka

Pada bagian ini, tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses *peer review*. Apabila harus menyitir dari "laporan" atau "komunikasi personal" dituliskan '*unpublished*' dan tidak perlu ditampilkan di daftar pustaka. Daftar pustaka harus berisi informasi yang *up to date* yang sebagian besar berasal dari *original papers* dan penulisan terbitan berkala ilmiah (nama jurnal) tidak disingkat.

## Format naskah

- Naskah diketik dengan menggunakan program Microsoft Word, huruf New Times Roman ukuran 12, spasi ganda kecuali Abstrak. Batas kiri-kanan atas-bawah masing-masing 2,5 cm. Maksimum isi naskah 15 halaman termasuk ilustrasi dan tabel.
- Penulisan bilangan pecahan dengan koma mengikuti bahasa yang ditulis menggunakan dua angka desimal di belakang koma. Apabila menggunakan Bahasa Indonesia, angka desimal ditulis dengan menggunakan koma (,) dan ditulis dengan menggunakan titik (.) bila menggunakan bahasa Inggris. Contoh: Panjang buku adalah 2,5 cm. Length of the book is 2.5 cm. Penulisan angka 1-9 ditulis dalam kata kecuali bila bilangan satuan ukur, sedangkan angka 10 dan seterusnya ditulis dengan angka. Contoh lima orang siswa, panjang buku 5 cm.
- Penulisan satuan mengikuti aturan international system of units.
- Nama takson dan kategori taksonomi ditulis dengan merujuk kepada aturan standar yang diakui. Untuk tumbuhan menggunakan *International Code of Botanical Nomenclature* (ICBN), untuk hewan menggunakan *International Code of Zoological Nomenclature* (ICZN), untuk jamur *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plant* (ICFAFP), *International Code of Nomenclature of Bacteria* (ICNB), dan untuk organisme yang lain merujuk pada kesepakatan Internasional. Penulisan nama takson lengkap dengan nama author hanya dilakukan pada bagian deskripsi takson, misalnya pada naskah taksonomi. Penulisan nama takson untuk bidang lainnya tidak perlu menggunakan nama author.
- Tata nama di bidang genetika dan kimia merujuk kepada aturan baku terbaru yang berlaku.
- Ilustrasi dapat berupa foto (hitam putih atau berwarna) atau gambar tangan (*line drawing*).
- Tabel  
Tabel diberi judul yang singkat dan jelas, spasi tunggal dalam bahasa Indonesia dan Inggris, sehingga Tabel dapat berdiri sendiri. Tabel diberi nomor urut sesuai dengan keterangan dalam teks. Keterangan Tabel diletakkan di bawah Tabel. Tabel tidak dibuat tertutup dengan garis vertikal, hanya menggunakan garis horisontal yang memisahkan judul dan batas bawah. Paragraf pada isi tabel dibuat satu spasi.
- Gambar  
Gambar bisa berupa foto, grafik, diagram dan peta. Judul gambar ditulis secara singkat dan jelas, spasi tunggal. Keterangan yang menyertai gambar harus dapat berdiri sendiri, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Gambar dikirim dalam bentuk .jpeg dengan resolusi minimal 300 dpi, untuk *line drawing* minimal 600dpi.

9. Daftar Pustaka

Sitasi dalam naskah adalah nama penulis dan tahun. Bila penulis lebih dari satu menggunakan kata 'dan' atau et al. Contoh: (Kramer, 1983), (Hamzah dan Yusuf, 1995), (Premachandra *et al.*, 1992). Bila naskah ditulis dalam bahasa Inggris yang menggunakan sitasi 2 orang penulis maka digunakan kata 'and'. Contoh: (Hamzah and Yusuf, 1995). Penulisan daftar pustaka, sebagai berikut:

a. **Jurnal**

Nama jurnal ditulis lengkap.

Agusta, A., Maehara, S., Ohashi, K., Simanjuntak, P. and Shibuya, H., 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(12), pp.1565-1569.

b. **Buku**

Merna, T. and Al-Thani, F.F., 2008. *Corporate Risk Management*. 2nd ed. John Welly and Sons Ltd. England.

c. **Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya.**

Fidiana, F., Triyuwono, I. and Riduwan, A., 2012. Zakah Perspectives as a Symbol of Individual and Social Piety: Developing Review of the Meadian Symbolic Interactionism. *Global Conference on Business and Finance Proceedings. The Institute of Business and Finance Research*, 7(1), pp. 721 - 742

d. **Makalah sebagai bagian dari buku**

Barth, M.E., 2004. Fair Values and Financial Statement Volatility. Dalam: Borio, C., Hunter, W.C., Kaufman, G.G., and Tsatsaronis, K. (eds.) *The Market Discipline Across Countries and Industries*. MIT Press. Cambridge.

e. **Thesis, skripsi dan disertasi**

Williams, J.W., 2002. Playing the Corporate Shell Game: The Forensic Accounting and Investigation Industry, Law, and the Management of Organizational Appearance. *Dissertation*. Graduate Programme in Sociology. York University. Toronto. Ontario.

f. **Artikel online.**

Artikel yang diunduh secara online ditulis dengan mengikuti format yang berlaku untuk jurnal, buku ataupun thesis dengan dilengkapi alamat situs dan waktu mengunduh. Tidak diperkenankan untuk mensitasi artikel yang tidak melalui proses peer review misalnya laporan perjalanan maupun artikel dari laman web yang tidak bisa dipertanggung jawabkan kebenarannya seperti wikipedia.

Himman, L.M., 2002. A Moral Change: Business Ethics After Enron. San Diego University Publication. <http://ethics.sandiego.edu/LMH/oped/Enron/index.asp>. (accessed 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa inggris atau (diakses 27 Januari 2008) bila naskah ditulis dalam bahasa indonesia

**Formulir persetujuan hak alih terbit dan keaslian naskah**

Setiap penulis yang mengajukan naskahnya ke redaksi Berita Biologi akan diminta untuk menandatangani lembar persetujuan yang berisi hak alih terbit naskah termasuk hak untuk memperbanyak artikel dalam berbagai bentuk kepada penerbit Berita Biologi. Sedangkan penulis tetap berhak untuk menyebarkan edisi cetak dan elektronik untuk kepentingan penelitian dan pendidikan. Formulir itu juga berisi pernyataan keaslian naskah yang menyebutkan bahwa naskah adalah hasil penelitian asli, belum pernah dan tidak sedang diterbitkan di tempat lain.

**Penelitian yang melibatkan hewan**

Setiap naskah yang penelitiannya melibatkan hewan (terutama mamalia) sebagai obyek percobaan / penelitian, wajib menyertakan 'ethical clearance approval' terkait animal welfare yang dikeluarkan oleh badan atau pihak berwenang. Penelitian yang menggunakan mikroorganisme sebagai obyek percobaan, mikroorganisme yang digunakan wajib disimpan di koleksi kultur mikroorganisme dan mencantumkan nomor koleksi kultur pada makalah.

**Lembar ilustrasi sampul**

Gambar ilustrasi yang terdapat di sampul jurnal Berita Biologi berasal dari salah satu naskah yang dipublikasi pada edisi tersebut. Oleh karena itu, setiap naskah yang ada ilustrasinya diharapkan dapat mengirimkan ilustrasi atau foto dengan kualitas gambar yang baik dengan disertai keterangan singkat ilustrasi atau foto dan nama pembuat ilustrasi atau pembuat foto.

**Proofs**

Naskah *proofs* akan dikirim ke penulis dan penulis diwajibkan untuk membaca dan memeriksa kembali isi naskah dengan teliti. Naskah *proofs* harus dikirim kembali ke redaksi dalam waktu tiga hari kerja.

**Naskah cetak**

Setiap penulis yang naskahnya diterbitkan akan diberikan 1 eksemplar majalah Berita Biologi dan *reprint*. Majalah tersebut akan dikirimkan kepada *corresponding author*

**Pengiriman naskah**

Naskah dikirim secara online ke website berita biologi: [http://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita\\_biologi](http://e-journal.biologi.lipi.go.id/index.php/berita_biologi)

**Alamat kontak**

Redaksi Jurnal Berita Biologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI  
Cibinong Science Centre, Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911  
Telp: +61-21-8765067, Fax: +62-21-87907612, 8765063, 8765066,  
Email: [berita.biologi@mail.lipi.go.id](mailto:berita.biologi@mail.lipi.go.id), [jurnalberitabiologi@yahoo.co.id](mailto:jurnalberitabiologi@yahoo.co.id) atau  
[jurnalberitabiologi@gmail.com](mailto:jurnalberitabiologi@gmail.com)

# BERITA BIOLOGI

Vol. 17 (2)

Isi (*Content*)

Agustus 2018

P-ISSN 0126-1754  
E-ISSN 2337-8751

## TINJAUAN ULANG (REVIEW)

- Pichia pastoris*: SEL RAGI UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN [*Pichia pastoris*: Cell Yeast for Production of Recombinant Proteins]  
Neng Herawati, Arizah Kusumawati dan Adi Santoso ..... 91 – 102

## MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

- PAKET PEMUPUKAN WORTEL PADA TANAH LEMPUNG LIAT BERPASIR DATARAN RENDAH DI PALANGKA RAYA - KALIMANTAN TENGAH [The Fertilizer Packages of Carrots in Sandy Clay Loam of Lowland Areas Palangka Raya of Central Kalimantan]  
M. Anang Firmansyah, Wiwik Rahayu dan Twenty Liana ..... 103 – 114
- KERAGAMAN GENETIK ALANG-ALANG (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) BERDASARKAN MARKA INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEATS (ISSR) [Genetic Diversity of Alang-alang (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) Based on Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers]  
Dyah Subositi dan Harto Widodo ..... 115 – 122
- MORFOLOGI, ANATOMI DAN UJI HISTOKIMIA RIMPANG *Curcuma aeruginosa* Roxb; *Curcuma longa* L. DAN *Curcuma heyneana* Valetton dan Zijp. [Morphology, Anatomical and Histochemical Rhizome of *Curcuma aeruginosa* Roxb; *Curcuma longa* L. and *Curcuma heyneana* Valetton and Zijp.]  
Trimanto, Dini Dwiyaniti dan Serafinah Indriyani ..... 123 – 133
- KERAGAMAN BEBERAPA TUMBUHAN CIPLUKAN (*Physalis* spp.) DI LERENG GUNUNG KELUD, JAWA TIMUR [Diversity of Ciplukan (*Physalis* spp.) on the Gradient of Mt. Kelud, East Java]  
Nugraheni Hadiyanti, Supriyadi dan Pardono ..... 135 – 146
- PERTUMBUHAN DAN PRODUKSI TEBU (*Saccharum officinarum*; Poaceae) PADA BERBAGAI PAKET PEMUPUKAN DI LAHAN KERING BERPASIR [Sugarcane (*Saccharum officinarum*; Poaceae) Growth and Production on Several Fertilizer Packages in Sandy Upland]  
Supriyadi, Nunik Eka Diana dan Djumali ..... 147 – 156
- PROFITABILITAS DAN KERAGAAN PERTUMBUHAN BENIH IKAN *Tor tambroides* DENGAN FREKUENSI PEMBERIAN PAKAN YANG BERBEDA [Profitability and Growth Performance of *Tor tambroides* with Different Feeding Frequency]  
Jojo Subagja dan Deni Radona ..... 157 – 164
- BARKODING DNA BURUNG ELANG (FAMILI ACCIPITRIDAE) DI INDONESIA [DNA Barcoding of the Eagles (Family Accipitridae) in Indonesia]  
Moch Syamsul Arifin Zein ..... 165 – 173
- STUDI ETNOBOTANI JENIS REMPAH YANG DIGUNAKAN DALAM BUMBU MASAKAN TRADISIONAL ADAT DI KERAJAAN ROKAN KABUPATEN ROKAN HULU, RIAU [The Ethnobotanical Study of Spices on Traditional Food at Rokan Palace, Rokan Hulu Riau]  
Melly Tribudiarti, Nurainas dan Syamsuardi ..... 175 – 182
- KARAKTERISASI KERAGAMAN GENETIK 27 GENOTIPE CABAI BERDASARKAN MARKA SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEAT) [Genetic Diversity Characterization of 27 Chili Pepper Genotypes Based on SSR (Simple Sequence Repeat) Markers]  
Rerenstradika Tizar Terryana, Kristianto Nugroho, Habib Rijzaani dan Puji Lestari ..... 183 – 194
- HUBUNGAN PANJANG DAN BERAT, FAKTOR KONDISI, FEKUNDITAS, DAN PERKEMBANGAN TELUR IKAN TENGADAK (*Barbonymus schwanenfeldii*) DARI SAROLANGUN, JAMBI DAN ANJONGAN, KALIMANTAN BARAT, INDONESIA [The Length and Weight Relationship, Factor Conditions, Fecundity and Egg Development of Tinfoil Barb (*Barbonymus schwanenfeldii*) from Sarolangun, Jambi and Anjongan, West Kalimantan, Indonesia]  
Irin Iriana Kusmini, Jojo Subagja dan Fera Permata Putri ..... 195 – 203
- FISILOGI PERTUMBUHAN, POTENSI AKTIFITAS PRODUKSI N<sub>2</sub>O DAN GEN FUNGSIONAL PENYANDINYA PADA BEBERAPA ISOLAT BAKTERI DENITRIFIKASI [Physiological Growth, Potential Activity of N<sub>2</sub>O Production and Their Functional Gen of Some Isolat of Denitrifying Bacteria]  
Dwi Agustiyani, Nur Laili dan Sarjiya Antonius ..... 205 – 214

## KOMUNIKASI PENDEK (SHORT COMMUNICATION)

- HUBUNGAN KARAKTER FENOTIPIK DAN HASIL BIJI PLASMA NUTFAH KACANG TUNGGAK [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] MENURUT ANALISIS LINTASAN [The Relationships between Phenotypic Characters and Seed Yield of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Germplasm Using Path Analysis]  
Mastur, Mamik Setyowati, dan Dwi N. Susilowati ..... 215 – 221

CORRIGENDUM ..... 223