

**PENGARUH VARIASI SUHU DAN KONSENTRASI METANOL
TERHADAP EKSPRESI PROGLARGINE SECARA
EKSTRASELULER OLEH *Pichia pastoris*
X33 REKOMBINAN**



**ISMIARTI
NIM.21032066/2021**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2025**

**PENGARUH VARIASI SUHU DAN KONSENTRASI METANOL
TERHADAP EKSPRESI PROGLARGINE SECARA
EKSTRASELULER OLEH *Pichia pastoris*
X33 REKOMBINAN**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar
Sarjana Sains*



**Oleh:
ISMIARTI
NIM.21032066/2021**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2025**

PERSETUJUAN SKRIPSI

PENGARUH VARIASI SUHU DAN KONSENTRASI METANOL TERHADAP EKSPRESI PROINSULIN GLARGINE SECARA EKSTRASELULER OLEH *Pichia pastoris* X33 REKOMBINAN

Nama : Ismiarti
NIM/TM : 21032066/2021
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 30 Januari 2025

Mengetahui:
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed.
NIP.197508152006042001

Disetujui oleh:

Pembimbing I



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed.
NIP.197508152006042001

Pembimbing II



Dr. Efrida Martius, M.Si.
NIP.197303141998032002

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

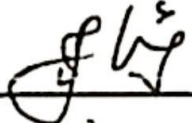
Nama : Ismiarti
NIM/TM : 21032066/2021
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

PENGARUH VARIASI SUHU DAN KONSENTRASI METANOL TERHADAP EKSPRESI PROGLARGINE SECARA EKSTRASELULER OLEH *Pichia pastoris* X33 REKOMBINAN

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang

Padang, 13 Februari 2025

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.	
2. Anggota	: Dr. Efrida Martius, S.TP, M.Si.	
3. Anggota	: Prof. Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si.	
4. Anggota	: Afifatul Achyar, S.Si., M.Si.	

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ismiarti
NIM/TM : 21032066/2021
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Pengaruh Variasi Suhu Dan Konsentrasi Metanol Terhadap Ekspresi Proglargine Secara Ekstraseluler Oleh *Pichia Pastoris* X33 Rekombinan” adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 13 Februari 2025

Diketahui oleh,
Kepala Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 197508152006042001

Saya yang menyatakan,



Ismiarti
NIM. 21032066

**PENGARUH VARIASI SUHU DAN KONSENTRASI METANOL
TERHADAP EKSPRESI PROGLARGINE SECARA EKSTRASELULER
OLEH *Pichia pastoris* X33 REKOMBINAN**

Ismiarti

ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan masalah kesehatan global yang membutuhkan terapi insulin yang efektif. Insulin glargine, sebagai analog insulin *long-acting*, menjanjikan dalam pengobatan diabetes, namun optimasi produksinya masih menjadi tantangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi suhu dan konsentrasi metanol terhadap ekspresi proglargine secara ekstraseluler oleh *Pichia pastoris* X33 rekombinan.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang dilaksanakan pada Februari - Desember 2024 di Laboratorium Balai Bioteknologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Gedung 630, KST BJ Habibie Serpong, Tangerang Selatan. Variasi optimasi ekspresi fermentasi yang dilakukan berupa variasi suhu (28°C dan 30°C) dan variasi konsentrasi metanol (1%, 2%, dan 6%). Protein hasil ekspresi dimurnikan menggunakan kromatografi penukar kation HiTrap™ SP HF yang berisi resin sulfopropil (SP Sepharose High Flow). Ekspresi protein dianalisis menggunakan spektrofotometer dan SDS-PAGE.

Hasil optimasi ekspresi protein proglargine terbaik diperoleh pada induksi ekspresi protein di suhu 28°C dengan konsentrasi metanol 2%. Analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada kondisi ekspresi protein optimum diperoleh berat protein proglargine sesuai dengan yang diharapkan (7kDa).

Kata Kunci: Ekspresi protein, Fermentasi, Insulin glargine, Kromatografi, Pichia pastoris

EFFECT OF TEMPERATURE VARIATION AND METHANOL CONCENTRATION ON EXTRACELLULAR EXPRESSION OF PROGLARGINE BY *Pichia pastoris* X33 RECOMBINANT

Ismiarti

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a global health problem that requires effective insulin therapy. Insulin glargine, as a long-acting insulin analog, is promising in the treatment of diabetes, but its production optimization is still a challenge. This study aims to determine the effect of temperature variation and methanol concentration on extracellular expression of proglargine by recombinant *Pichia pastoris* X33.

This research is a descriptive study conducted from February to December 2024 at the Laboratory of the Center for Biotechnology, National Research and Innovation Agency (BRIN) Building 630, BJ Habibie Serpong KST, South Tangerang. Fermentation expression optimization variations carried out in the form of temperature variations (28°C and 30°C) and variations in methanol concentration (1%, 2%, and 6%). Expression proteins were purified using HiTrap™ SP HF cation exchange chromatography containing sulfopropyl resin (SP Sepharose High Flow). Protein expression was analyzed using a spectrophotometer and SDS-PAGE.

The best proglargine protein expression optimization results were obtained in the induction of protein expression at 28°C with 2% methanol concentration. SDS-PAGE analysis showed that at the optimum protein expression conditions, the protein weight of proglargine was obtained as expected (7kDa).

Keywords: Protein expression, Fermentation, Insulin glargine, Chromatography, *Pichia pastoris*

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah Azza Wa Jalla yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Variasi Suhu Dan Konsentrasi Metanol Terhadap Ekspresi Proglargine Secara Ekstraseluler Oleh *Pichia pastoris* X33 Rekombinan”**, Shalawat beserta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad Shalallahu ‘alaihi wasallam.

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang. Keberhasilan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed. sebagai Kepala Departemen Biologi dan Program studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang sekaligus sebagai dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dr. Efrida Martius, S.TP., M.Si. sebagai dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Ibu Prof. Dr. Yuni Ahda, M. Si. Dan Ibu Afifatul Ahyar, M. Si. sebagai Dosen Penguji yang telah memberikan kritikan dan saran dalam penulisan skripsi ini.

4. Bapak Prof. Dr. Abdul Razak, M. Si. sebagai Penasihat Akademik yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan selama proses perkuliahan.
5. Bapak Dr. Dudi Hardianto, M.Si., Ibu Anna Saffarida, M.Si., Ibu Uli Julia Nasution, M. Biotech st. dan Ibu Dian Japany Puspitasari, yang telah memberikan arahan serta berbagi ilmu dan pengalaman selama penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioteknologi.
6. Kedua orang tua tercinta Bapak Mastar dan Ibu Radianis yang telah memberikan doa dan dukungan penuh dan selalu mengiringi setiap perjalanan penulis.
7. Kedua kakak kandung penulis Muhammad Yunus dan Salmiarti yang selalu memberikan semangat, dukungan serta doa dalam penulisan skripsi ini.
8. Teman-teman penelitian satu laboratorium (Kak Atika Aulia, Amelia Anggraeni Pramono dan Kak Anandhatika Dwi Ajatyani) yang telah membantu dan berbagi dukungan selama penelitian berlangsung.
9. Sahabatku (Annisa Syaifullah dan Siti Atika Salsabila) dan teman sebangkuan (Liza Febrianti dan Tesya Wulandari) terimakasih atas dukungan dan doanya dalam pembuatan skripsi ini.
10. Keluarga besar Biologi 2021 yang selalu memberikan dukungan serta doanya.

Semoga bantuan yang Bapak/Ibu serta rekan-rekan berikan, bernilai ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua orang yang membacanya.

Padang, 12 Januari 2025



Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Insulin	5
B. Insulin Glargine	8
C. Ekspresi Proglargine.....	12
D. Produksi Protein Rekombinan.....	15
E. Analisis Proinsulin Glargine.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	25
A. Jenis Penelitian	25
B. Waktu dan Tempat Penelitian	25
C. Alat dan Bahan	25
D. Prosedur Penelitian.....	26
E. Analisis Data	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
A. Hasil.....	35
B. Pembahasan	39
BAB V PENUTUP.....	47
A. Kesimpulan.....	47
B. Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Penelitian	29
2. Optimasi protein proglargine <i>P. pastoris</i> X33 rekombinan dengan Tricine SDS-PAGE.....	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rantai asam amino insulin	5
2. Struktur asam amino insulin glargine	9
3. Plasmid dari pPICZ α A-Glargine.....	10
4. Elektroforesis protein	22
5. Hasil Peremajaan dan Perbanyakan <i>P. pastoris</i> X33 rekombinan.....	35
6. Nilai absorbansi ekspresi proglargine.	36
7. Hasil elektroforesis protein standar glargine pada SDS-PAGE.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Pengukuran Nilai Absorbansi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	60
2. Komposisi media fermentasi.....	61
3. Komposisi pembuatan buffer untuk Purifikasi	62
4. Komposisi Elektroforesis Tricine SDS-PAGE.....	63
5. Komposisi silver staining (Pewarnaan perak).....	64
6. Ukuran marka protein	65
7. Dokumentasi kegiatan penelitian	66

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Insulin merupakan hormon yang diproduksi oleh pankreas yang memiliki peran mendasar dalam metabolisme lemak dan karbohidrat. Insulin berfungsi untuk mengontrol kadar glukosa darah dengan merangsang konversi glukosa menjadi glikogen (Rasool *et al.*, 2019). Insulin telah digunakan sejak tahun 1922 sebagai salah satu obat untuk penderita Diabetes Melitus (DM) (Assyifa *et al.*, 2022). Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF) (2021), jumlah penderita diabetes di Indonesia dapat mencapai 28,57 juta pada 2045, jumlah ini lebih besar 47% dibandingkan dengan jumlah 19,47 juta pada 2021. WHO (2016) menyebutkan bahwa peningkatan jumlah penderita diabetes harusnya sejalan dengan peningkatan ketersediaan insulin, namun menurut Wulandari (2021), kebutuhan insulin di Indonesia baru terpenuhi 74%.

Insulin dapat dibuat melalui rekayasa genetik dengan memasukkan protein fusi proinsulin ke dalam *host* spesifik (inang spesifik) (Alyas *et al.*, 2021). Proinsulin merupakan prekursor insulin yang terbentuk dari insulin yang belum matang sehingga perlu dilakukan proses pemurnian, kemudian dilakukan konversi secara enzimatik untuk menjadi insulin aktif. Insulin aktif ini nantinya siap digunakan untuk produk obat komersial (Kottaisamy *et al.*, 2021).

Jenis insulin yang dapat diproduksi melalui rekayasa genetik salah satunya adalah insulin analog glargine (Conacher, 2018). Insulin glargine merupakan insulin yang termasuk dalam jenis insulin analog (*long acting*) karena memiliki durasi kerja yang lama yaitu selama 24 jam dalam sekali injeksi, sehingga insulin

glargine ini sangat praktis digunakan untuk pengobatan DM (Hardianto *et al.*, 2024).

Produksi insulin sejauh ini telah diujicobakan menggunakan sistem ekspresi *Escherichia coli* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Baeshen *et al.*, 2014). Sistem ekspresi *E. coli* memiliki kekurangan karena tidak memiliki aktivitas pasca transkripsi, seperti glikosilasi, fosforilasi, dan pembentukan jembatan disulfida (Baeshen *et al.*, 2014). Demikian juga halnya dengan sistem ekspresi di *S. cerevisiae*, yang memerlukan penambahan perlakuan supaya proinsulin dapat diubah menjadi insulin. Protein yang diekspresikan oleh *S. cerevisiae* dilaporkan mengalami glikosilasi berlebih (Grinna & Tschopp, 1989). Selain itu, protein yang dihasilkan memiliki sambungan $\alpha 1,3$ glikan yang berperan dalam sifat hiperantigenik sehingga mengurangi nilai terapeutik dari protein tersebut (Higgms & Cregg, 2003).

Alternatif sistem ekspresi protein yang lebih baik adalah menggunakan inang *Pichia pastoris*. Ragi ini menawarkan beberapa keunggulan seperti memiliki kontrol promotor AOX yang kuat sehingga berpengaruh terhadap kuantitas dan kualitas protein yang diekspresikan (Baeshen *et al.*, 2014). Selain itu, protein yang dihasilkan oleh *P. pastoris* tidak mengalami glikosilasi berlebihan dibandingkan ekspresi protein di inang *S. cerevisiae* (Baeshen *et al.*, 2016).

Gurramkonda *et al.*, (2010) dalam penelitiannya berhasil mengekspresikan proinsulin manusia secara intraseluler menggunakan inang *P. pastoris*. Hasil penelitian menunjukkan optimasi suhu, pH dan konsentrasi induker methanol dapat mempengaruhi hasil. Penelitian juga dilakukan oleh Nurdiani *et al.*, (2018) berhasil merancang plasmid rekombinan pembawa gen pro-Human insulin sintetik

menggunakan *P. pastoris* sebagai *host* ekspresi dengan bantuan insulin manusia dari vektor pD902 dari invitrogen.

Penelitian oleh Martius *et al*, (2020) berhasil mengoptimasi waktu induksi dalam mengekspresikan gen pro-*Human insulin* menggunakan klon *P. pastoris* X33 secara intraseluler. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi pro-*Human insulin* oleh klon *P. pastoris* X33 optimal dengan waktu induksi 120 jam pada suhu 20°C. Peningkatan ekspresi protein terjadi pada penambahan konsentrasi induksi metanol 0,5-3%. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi pro-*Human insulin* yang lebih tinggi hingga mencapai 100 kali lipat oleh klon *P. pastoris* X33. Menurut Yin *et al*, (2012) ekspresi protein proinsulin oleh *P. pastoris* secara intraseluler memberikan hasil yang lebih tinggi. Secara sistem, *P. pastoris* berpotensi dalam memproduksi protein rekombinan yang diekspresikan secara intraseluler maupun ekstraseluler (Looser *et al.*, 2014).

Peneliti dari BRIN sudah mengembangkan integrasi plasmid pPICZ α A-G yang mengandung gen glargine sintetis ke dalam genom *P. pastoris*. Hasil sekuensing DNA menunjukkan kecocokan lengkap (identitas sekuens 100%) antara produk PCR dan sekuens gen glargine sintetis. *Pichia pastoris* menghasilkan proglargine ekstraseluler dalam media fermentasi, ukuran proglargine sekitar 10 kDa (Hardianto *et al.*, 2024). Optimasi ekspresi protein perlu dilakukan untuk mendukung produksi protein skala industri. Berdasarkan uraian masalah yang sudah disampaikan, maka dilakukan penelitian dengan judul “Pengaruh variasi suhu dan konsentrasi metanol terhadap ekspresi proglargine secara ekstraseluler oleh *Pichia pastoris* X33 Rekombinan”.

B. Rumusan Masalah

Bagaimanakah kondisi optimum suhu dan konsentrasi metanol terhadap ekspresi proglargine secara ekstraseluler oleh *Pichia pastoris* X33 rekombinan?

C. Tujuan Penelitian

Menentukan kondisi optimum suhu dan konsentrasi metanol terhadap ekspresi proglargine secara ekstraseluler oleh *Pichia pastoris* X33 rekombinan.

D. Manfaat Penelitian

Sebagai dasar pengembangan insulin yang diharapkan dapat mencapai tahap produksi komersial, sebagai solusi untuk memenuhi kebutuhan insulin di Indonesia secara mandiri.

BAB V PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekspresi protein proglargine oleh *P. pastoris* X33 rekombinan optimum adalah pada suhu 28°C dengan konsentrasi metanol 2%.

B. Saran

1. Perlu dilakukan optimasi lebih lanjut terhadap variabel fermentasi lainnya, seperti pH media, komposisi media, dan strategi induksi metanol, untuk meningkatkan ekspresi dan kualitas proinsulin glargine.
2. Melakukan teknik purifikasi tambahan, seperti kromatografi afinitas atau kromatografi eksklusi ukuran, untuk meningkatkan kemurnian proglargine dan memperoleh protein dengan berat molekul yang lebih homogen.
3. Melakukan analisis kuantitatif menggunakan metode ELISA atau HPLC untuk mengukur konsentrasi proglargine secara akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- an-Christer Janson, L. R., & Sons, J. W. &. (1998). *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*. John Wiley & Sons.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.002>
- Asociación Americana de Diabetes. (2016). Standards of Medical Care in Diabetes. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*.
- Association, A. D. (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 45(Supplement_1), S17–S38. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
- Baeshen, M. N., Bouback, T. A. F., Alzubaidi, M. A., Bora, R. S., Alotaibi, M. A. T., Alabbas, O. T. O., Alshahrani, S. M., Aljohani, A. A. M., Munshi, R. A. A., Al-Hejin, A., Ahmed, M. M. M., Redwan, E. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Baeshen, N. A. (2016). Expression and purification of c-peptide containing insulin using *pichia pastoris* expression system. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2016/3423685>
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014a). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., & Redwan, E. M. (2014b). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Barrigón, J. M., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2013). Searching the best operational strategies for *Rhizopus oryzae* lipase production in *Pichia pastoris* Mut⁺ phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures? *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.018>
- Bisswanger, H. (2017). *Enzyme assays*. Perspectives in Science.
- Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L., Sørensen, A. R., & Voigt, H. O. (1988). Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature*, 333(6174), 679–682. <https://doi.org/10.1038/333679a0>

- Bretthauer, R. K., & Castellino, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris* - derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(3), 193–200. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00770.x>
- Burge, M. R., Rassam, A. G., & Schade, D. S. (1998). Lispro Insulin: Benefits and Limitations. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9(8), 337–341. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(98\)00083-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(98)00083-6)
- Çelik, E., & Çalık, P. (2012). Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1108–1118. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000a). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *FEMS Microbiology Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7)
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000b). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>
- Chandrasekaran, P., & Weiskirchen, R. (2024). The Role of Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus—An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1882. <https://doi.org/10.3390/ijms25031882>
- Chang, C. H., Hsiung, H. A., Hong, K. L., & Huang, C. T. (2018). Enhancing the efficiency of the *Pichia pastoris* AOX1 promoter via the synthetic positive feedback circuit of transcription factor Mxr1. *BMC Biotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0492-4>
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Chiefari, E., Arcidiacono, B., Foti, D., & Brunetti, A. (2017). Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(9), 899–909. <https://doi.org/10.1007/s40618-016-0607-5>
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 625–635. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1559-9>
- Chong, N. F. M., Hussain, H., Hamdin, N. E., Wee, D. H. S., Nisar, M., Yan, W. J., Lau, B. Y. C., & Rahmad, N. (2022). Higher resolution protein band visualisation via improvement of colloidal CBB-G staining by gel fixation. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. <https://doi.org/10.1186/s40538-022-00297-0>
- Clw, Bjorker, C. I. of T. I. T. S. (1996). *Recipe for Pichia Growth Media: BMMY or BMGY*. 500, 700. http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/BMMY,_BMGY_recipes.pdf
- Conacher, C. G. (2018). *Constitutive expression of enzymes in Pichia pastoris for use in lignin valorisation. March*. <https://scholar.sun.ac.za>

- Corley, R. B. (2005). A guide to methods in the biomedical sciences. In *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1007/b99813>
- Cos, O., Ramón, R., Montesinos, J. L., & Valero, F. (2006). Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. In *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Cryer, P. E., Davis, S. N., & Shamoon, H. (2003). Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care*, 26(6), 1902–1912. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.6.1902>
- Cuatrecasas, P. (1972). Affinity Chromatography and Purification of the Insulin Receptor of Liver Cell Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(5), 1277–1281. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.5.1277>
- Cummins, P. M., Rochfort, K. D., & O'Connor, B. F. (2017). Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1485, 209–223. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_11
- de Marco, A. (2009). Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. In *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-26>
- Deutscher, M. P. (1990). *Guide to protein purification*. Academic Press.
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/1431>
- Electrophoresis series*. (n.d.).
- Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., & Gingeras, T. R. (1985). Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 5(5), 1111–1121. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.5.1111-1121.1985>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Gaglia, J. L., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. Lou, Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J. J., ... Gabbay, R. A. (2023). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes Care*, 46(Supplement_1), S19–S40. <https://doi.org/10.2337/dc23-S002>
- Ergün, B. G., Berrios, J., Binay, B., & Fickers, P. (2021). Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling. In *FEMS Yeast Research*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab057>
- Eskandari, A., Nezhad, N. G., Leow, T. C., Rahman, M. B. A., & Oslan, S. N.

- (2024). Current achievements, strategies, obstacles, and overcoming the challenges of the protein engineering in *Pichia pastoris* expression system. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03851-6>
- Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., & Mattanovich, D. (2013). *Pichia Pastoris* : Protein Production Host and Model Organism for Biomedical Research. *Future Microbiology*, 8(2), 191–208. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>
- Georgiou, G., & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), 190–197. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80012-7)
- Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1409–1414. <https://doi.org/10.1038/nbt1028>
- Grinna, L. S., & Tschopp, J. F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Yeast*. <https://doi.org/10.1002/yea.320050206>
- Grunberger, G. (2014). Insulin analogs dare they worth it. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc14-0031>
- Gu, L., Zhang, J., Liu, B., Du, G., & Chen, J. (2015). High-Level Extracellular Production of Glucose Oxidase by Recombinant *Pichia Pastoris* Using a Combined Strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1387-z>
- Guerfal, M., Ryckaert, S., Jacobs, P. P., Ameloot, P., Van Craenenbroeck, K., Derycke, R., & Callewaert, N. (2010). The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-49>
- Guerois, R., Nielsen, J. E., & Serrano, L. (2002). Predicting Changes in the Stability of Proteins and Protein Complexes: A Study of More Than 1000 Mutations. *Journal of Molecular Biology*, 320(2), 369–387. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00442-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00442-4)
- Gurramkonda, C., Polez, S., Skoko, N., Adnan, A., Gäbel, T., Chugh, D., Swaminathan, S., Khanna, N., Tisminetzky, S., & Rinas, U. (2010). Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-31>
- Halban, P. A. (1991). Structural domains and molecular lifestyles of insulin and its precursors in the pancreatic Beta cell. *Diabetologia*, 34(11), 767–778. <https://doi.org/10.1007/BF00408349>
- Hallgren, E., Kálmán, F., Farnan, D., Horváth, C., & Ståhlberg, J. (2000). Protein

- retention in ion-exchange chromatography: effect of net charge and charge distribution. *Journal of Chromatography A*, 877(1–2), 13–24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00190-4)
- Hardianto, D. (2021). BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA Insulin: Production, Types, Analysis, and Routes of Delivery. *JURNAL BIOTEKNOLOGI & BIOSAINS INDONESIA*.
- Hardianto, D., Assyifa, F., Martius, E., Laziba, D., Royani, J. I., Sumiati, T., & Safarrida, A. (2022). KARAKTERISASI DAN PENETAPAN KADAR PREKURSOR INSULIN YANG DIPRODUKSI OLEH REKOMBINAN *Pichia pastoris*. *Jurnal Farmamedika (Pharmamedica Journal)*. <https://doi.org/10.47219/ath.v7i2.178>
- Hardianto, D., Martius, E., Rostinawati, T., Safarrida, A., Royani, J. I., Assyifa, F., & Laziba, D. (2024). Cloning and Extracellular Expression of Glargine in *Pichia pastoris*. *HAYATI Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.4308/hjb.31.2.248-255>
- Hardianto, D., Martius, E., Rostinawati, T., Safarrida, A., Royani, J. I., Laziba, D., & Assyifa, F. (2023). Detection of recombinant *Pichia pastoris* producing glargine. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1271/1/012089>
- Heise, T., Nosek, L., Rønn, B. B., Endahl, L., Heinemann, L., Kapitza, C., & Draeger, E. (2004). Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 53(6), 1614–1620. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.6.1614>
- Hempelman, E., & Krafts, K. (2017). The mechanism of silver staining of proteins separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biotechnic and Histochemistry*. <https://doi.org/10.1080/10520295.2016.1265149>
- Hermanto, S., Saputra, F. R., & . Z. (2015). Aplikasi Metode SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) untuk Mengidentifikasi Sumber Asal Gelatin pada Kapsul Keras. *Jurnal Kimia VALENSI*. <https://doi.org/10.15408/jkv.v0i0.3150>
- Higgms, D. R., & Cregg, J. M. (2003). *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology. *World*, 103(February 2004), 9–15.
- Hirsch, I. B. (2005). Insulin Analogues. *New England Journal of Medicine*, 352(2), 174–183. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040832>
- Hirsch, I. B., Juneja, R., Beals, J. M., Antal, C. J., & Wright, E. E. (2020). The Evolution of Insulin and How it Informs Therapy and Treatment Choices. *Endocrine Reviews*, 41(5), 733–755. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa015>
- Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N., & Mattanovich, D. (2004). Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(4), 367–375. <https://doi.org/10.1002/bit.10904>

- Home, P., Riddle, M., Cefalu, W. T., Bailey, C. J., Bretzel, R. G., del Prato, S., Leroith, D., Schernthaner, G., van Gaal, L., & Raz, I. (2014). Insulin Therapy in People With Type 2 Diabetes: Opportunities and Challenges? *Diabetes Care*, 37(6), 1499–1508. <https://doi.org/10.2337/dc13-2743>
- Hörber, S., Achenbach, P., Schleicher, E., & Peter, A. (2020). Harmonization of immunoassays for biomarkers in diabetes mellitus. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.015>
- Human Insulin: History, Recent Advances, and Expression Systems for Mass Production Biomedical Research and Therapy*. (n.d.). <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/692>
- IDF. (2021). IDF Diabetes Atlas, Diabetes around the world 2021 10th Edition. *International Diabetes Federation*.
- INAN, M., & MEAGHER, M. M. (2001). Non-Repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (AOX1) Promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(6), 585–589. <https://doi.org/10.1263/jbb.92.585>
- Indonesia, K. K. R. (2018). *Situasi dan Analisis Diabetes*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Invitrogen Corporation. (2010). User manual - EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. Cat. No. K1740-01, 25, 95.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.-K., Martinelle, M., & Enfors, S.-O. (2003). Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00003-8)
- James D Waston, Tania A Baker, Stephen P Bell, Alexander Gann, Michael Levine, R. L. (2013). *Molecular biology of the gene (7 th ed.)*. Pearson Education.
- Jiang, S., Liu, S., Zhao, C., & Wu, C. (2016). Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. *International Journal of Electrochemical Science*, 11(1), 640–649. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15870-6](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15870-6)
- Karbalaee, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Karlsson, E., & Hirsh, I. (2011). *Ion Exchange Chromatography* (pp. 93–133). <https://doi.org/10.1002/9780470939932.ch4>
- Kjeldsen, T. (2000). Yeast secretory expression of insulin precursors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s002530000402>
- Kottaisamy, C. P. D., Raj, D. S., Prasanth Kumar, V., & Sankaran, U. (2021). Experimental animal models for diabetes and its related complications—a review. In *Laboratory Animal Research*. <https://doi.org/10.1186/s42826-021-00101-4>

- Kowalski, J. T., & Totten, M. A. (1981). Diabetes Mellitus Diagnosis and Treatment. *The Nurse Practitioner*, 6(3), 14–27. <https://doi.org/10.1097/00006205-198106030-00004>
- Ladisch, M. R., & Kohlmann, K. L. (1992). Recombinant Human Insulin. *Biotechnology Progress*, 8(6), 469–478. <https://doi.org/10.1021/bp00018a001>
- Lankone, R. S., Deline, A. R., Barclay, M., & Fairbrother, D. H. (2020). UV–Vis quantification of hydroxyl radical concentration and dose using principal component analysis. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121148>
- Lelong, C., Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2009). Silver staining of proteins in 2DE gels. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-281-6_21
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(2), 105–124. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0003-x>
- Li, Q., Wang, H., Zhang, W., Wang, W., Ren, X., Wu, M., & Shi, G. (2024). Structure-Guided Evolution Modulate Alcohol Oxidase to Improve Ethanol Oxidation Performance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(4), 1948–1965. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04626-3>
- Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(5), 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80035-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80035-9)
- Liu, J., Ren, Z. H., Qiang, H., Wu, J., Shen, M., Zhang, L., & Lyu, J. (2020). Trends in the incidence of diabetes mellitus: results from the Global Burden of Disease Study 2017 and implications for diabetes mellitus prevention. *BMC Public Health*. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09502-x>
- Liu, W. C., Gong, T., Wang, Q. H., Liang, X., Chen, J. J., & Zhu, P. (2016). Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep18439>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2014). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2015). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1177–1193. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>

- Martius, E., Laoditta, F., Sofia, D. Y., & Mahsunah, A. H. (2020). Optimasi Waktu Induksi dalam Mengekspresikan Gen Proinsulin secara Intraseluler Menggunakan Inang *Pichia pastoris*. *Jurnal Riset Biologi Dan Aplikasinya*. <https://doi.org/10.26740/jrba.v2n1.p26-35>
- Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H., & Sauer, M. (2004). Stress in recombinant protein producing yeasts. *Journal of Biotechnology*, 113(1–3), 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.035>
- Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., & Love, J. C. (2018). Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1002/bit.26440>
- McKeage, K., & Goa, K. L. (2001). Insulin Glargine. *Drugs*, 61(11), 1599–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00007>
- Meng, J., Liu, S., Gao, L., Hong, K., Liu, S., & Wu, X. (2023). Economical production of *Pichia pastoris* single cell protein from methanol at industrial pilot scale. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02198-9>
- Menter, P. (2000). Acrylamide Polymerization—A Practical Approach. *Bio-Rad Tech Note*, 1156. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Acrylamide+Polymerization+?+A+Practical+Approach#0>
- Mergulhão, F. J. M., Summers, D. K., & Monteiro, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 23(3), 177–202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.11.003>
- Miklovicz, T., Kar, M. F., Hartai, A. É., Budapest, P., & Szanyi, A. J. (2014). *Investigation on the potential of combined heat, power and metal extraction in Hungary MISKOLCI EGYETEM Investigation on the potential of combined heat, power and metal extraction in Hungary Table of Content*. November 2014. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34823.19367>
- Nakatani, N., Kozaki, D., Mori, M., & Tanaka, K. (2012). Recent progress and applications of ion-exclusion/ion-exchange chromatography for simultaneous determination of inorganic anions and cations. *Analytical Sciences*. <https://doi.org/10.2116/analsci.28.845>
- Ngere, J. B., Ebrahimi, K. H., Williams, R., Pires, E., Walsby-Tickle, J., & McCullagh, J. S. O. (2023). Ion-Exchange Chromatography Coupled to Mass Spectrometry in Life Science, Environmental, and Medical Research. In *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04298>
- Ni, Y., & Chen, R. (2009). Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1661–1670. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0077-3>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). *Chapter 8 Quantitation of Protein* (pp. 73–95). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)

- Notice, I. P., Biopharma, T., & Healthcare, G. E. (2020). *Purification of an N-terminal histidine-tagged protein using ÄKTA start Purification of an N-terminal histidine-tagged protein using. March.*
- Nurdiani, D., Hariyatun, & Kusharyoto, W. (2018). Secretory expression of human insulin precursor in *Pichia pastoris* employing truncated α -factor leader sequence and a short C-peptide. *Indonesian Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.38958>
- Osborn, K. W. and M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412.
- Østergaard, J. (2016). *UV/Vis Spectrophotometry and UV Imaging*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5_1
- Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*, 189(4200), 347–358. <https://doi.org/10.1126/science.1096303>
- Petsch, D. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*, 76(2–3), 97–119. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00185-6)
- Proceedings of the 1st International Conference for Health Research – BRIN (ICHR 2022). (2023). In *Proceedings of the 1st International Conference for Health Research – BRIN (ICHR 2022)*. <https://doi.org/10.2991/978-94-6463-112-8>
- Qian, X., Kraft, J., Ni, Y., & Zhao, F.-Q. (2014). Production of recombinant human proinsulin in the milk of transgenic mice. *Scientific Reports*, 4(1), 6465. <https://doi.org/10.1038/srep06465>
- Ralph Himmelhoch, S. (1971). [26] *Chromatography of proteins on ion-exchange adsorbents* (pp. 273–286). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)22028-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)22028-0)
- Ramzy, A., Asadi, A., & Kieffer, T. J. (2020). Revisiting proinsulin processing: Evidence that human β -cells process proinsulin with prohormone convertase (pc) 1/3 but not pc2. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db19-0276>
- Rank, K. B., Evans, D. B., & Sharma, S. K. (2000). The N-Terminal Domains of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitory Proteins Block the Phosphorylation of cdk2/Cyclin E by the CDK-Activating Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(2), 469–473. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2648>
- Rasool, S. U. A., Ashraf, S., Nabi, M., Rashid, F., Fazili, K. M., & Amin, S. (2019). Elevated fasting insulin is associated with cardiovascular and metabolic risk in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.05.003>
- Rosenfeld, S. A., Nadeau, D., Tirado, J., Hollis, G. F., Knabb, R. M., & Jia, S. (1996). Production and Purification of Recombinant Hirudin Expressed in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*,

8(4), 476–482. <https://doi.org/10.1006/prev.1996.0127>

Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*.

Rydén, L., Standl, E., Małgorzata, B., Van Den Berghe, G., Betteridge, J., De Boer, M. J., Cosentino, F., Jönsson, B., Laakso, M., Malmberg, K., Priori, S., Östergren, J., Tuomilehto, J., Thrainsdottir, I., Vanhorebeek, I., Stramba-Badiale, M., Lindgren, P., Qiao, Q., Blanc, J. J., ... Wood, D. (2007). Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: Executive summary. The task force on diabetes and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). In *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl260>

Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>

Scopes, R. K. (1994). *Protein purification: principles and practice*. Springer Science & Business Media.

Shi, X., Karkut, T., Chamankhah, M., Alting-Mees, M., Hemmingsen, S. M., & Hegedus, D. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00706-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00706-4)

Singh, A., & Narang, A. (2020). The Mut⁺ strain of *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) expresses PAOX1 5 and 10 times faster than Muts and Mut[−] strains: evidence that formaldehyde or/and formate are true inducers of PAOX1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(18), 7801–7814. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10793-8>

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>

Sinzinger, K., Obst, U., Güner, S., Döring, M., Haslbeck, M., Schieder, D., & Sieber, V. (2024). The *Pichia pastoris* enzyme production platform: From combinatorial library screening to bench-top fermentation on residual cyanobacterial biomass. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2023.12.005>

Soewondo, P., Ferrario, A., & Tahapary, D. L. (2013). Challenges in diabetes management in Indonesia: A literature review. In *Globalization and Health*. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-63>

Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L., & Aten, B. (1967). Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor. *Science*, 157(3789), 697–700. <https://doi.org/10.1126/science.157.3789.697>

Thermo Scientific. (2018). *A theoretical and practical guide for spectrophotometric determination of protein concentrations at 280 nm*. 7. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical->

Notes/spectrophotometric-determination-protein-concentrations-280nm-technote.pdf

- Vajo, Z., Fawcett, J., & Duckworth, W. C. (2001). Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocrine Reviews*, 22(5), 706–717. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.5.0442>
- VEJRAZKOVA, D., VANKOVA, M., LUKASOVA, P., VCELAK, J., & BENDLOVA, B. (2020). Insights Into the Physiology of C-peptide. In *Physiological Research*. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934519>
- Vogl, T., & Glieder, A. (2013). Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*, 30(4), 385–404. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>
- Walls, D., & Walker, J. M. (2017). Protein Chromatography: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1–2), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
- Wang, X., Li, X., & Li, Y. (2007). A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9425-3>
- Weiss, M., Steiner, D. F., & Philipson, L. H. (2000). Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In *Endotext*.
- WHO. (2016). WHO Global report on diabetes: A summary. *International Journal of Noncommunicable Diseases*.
- Wilchek, M., & Chaiken, I. (2000). *An Overview of Affinity Chromatography* (pp. 1–6). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-261-2_1
- Wulandari, Y. (2021). Evaluasi Rasionalitas Penggunaan Obat Antidiabetik Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Rawat Jalan. *Skripsi Universitas Jenderal Achmad Yani*.
- Xie, J., Zhou, Q., Du, P., Gan, R., & Ye, Q. (2005). Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiotensin production. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2–3), 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.06.010>
- Yin, H., Liu, Z., Zhang, A., Zhang, T., Luo, J., Shen, J., Chen, L., Zhou, B., Fu, X., Fu, C., & Zhang, Z. (2012). Intracellular expression and purification of the Canstatin-N protein in *Pichia pastoris*. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.073>
- Yki-Järvinen, H. (2004). Insulin therapy in type 2 diabetes: role of the long-acting insulin glargine analogue. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(6), 410–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01356.x>
- Yu, Y., Yang, J., Zhao, F., Lin, Y., & Han, S. (2022). Comparative transcriptome

- and metabolome analyses reveal the methanol dissimilation pathway of *Pichia pastoris*. *BMC Genomics*, 23(1), 366. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08592-8>
- Zeng, X., & Ruckenstein, E. (1999). Membrane Chromatography: Preparation and Applications to Protein Separation. *Biotechnology Progress*, 15(6), 1003–1019. <https://doi.org/10.1021/bp990120e>
- Zhang, W., Bevins, M. A., Plantz, B. A., Smith, L. A., & Meagher, M. M. (2000). Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 1–8. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y)
- Zinman, B., Fulcher, G., Rao, P. V, Thomas, N., Endahl, L. A., Johansen, T., Lindh, R., Lewin, A., Rosenstock, J., Pinget, M., & Mathieu, C. (2011). Insulin degludec, an ultra-long-acting basal insulin, once a day or three times a week versus insulin glargine once a day in patients with type 2 diabetes: a 16-week, randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet*, 377(9769), 924–931. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62305-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62305-7)