

## ISOLASI DAN PEMURNIAN ENZIM

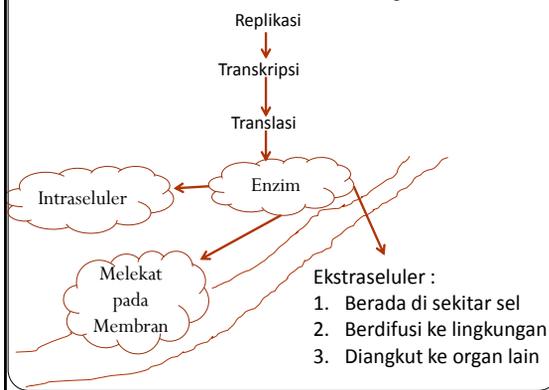
Kompetensi yang diharapkan :

- Mahasiswa mampu menjelaskan cara-cara mengisolasi enzim dari sumber enzim

## ISOLASI ENZIM

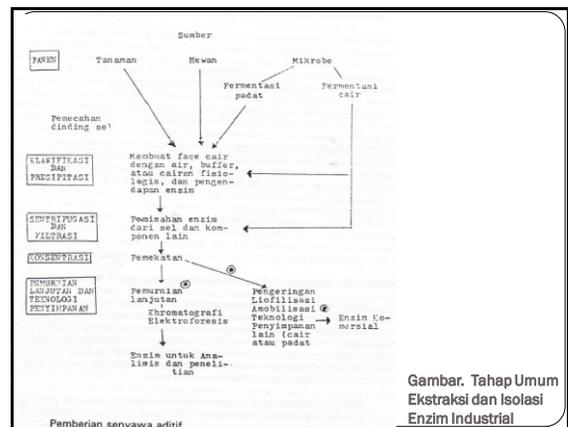
- Proses memisahkan enzim dari sumbernya
- Melibatkan beberapa teknik sekaligus
- Enzim yang ditemukan di pasaran berasal dari berbagai macam organisme, dengan berbagai tingkat kemurnian, contoh:
  - $\alpha$ -Amilase
  - Glukoamilase
  - Protease
- Berdasarkan fungsi hayatinya, ada dua jenis enzim :
  - Enzim intraseluler
  - Enzim ekstraseluler (lebih mudah diisolasi)

Gambar : Letak enzim fungsional



- Enzim ekstraseluler :
  - ✓ Tidak memerlukan proses pemecahan dinding sel
  - ✓ Contoh : papain, tripsin
  - ✓ Dipisahkan berdasarkan sifat fisik dan kimiawinya.
  - ✓ Cara pemisahan dari sel : dengan penyaringan
  - ✓ Enzim yang masih melekat pada dinding sel atau sisa polimer substrat dipisahkan dengan menggunakan senyawa yang dapat melepaskan interaksi ini, misalnya : Triton X100, sodium lauril sulfat, tween 80

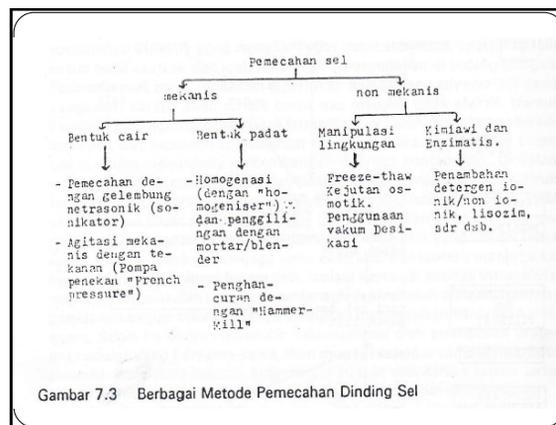
- Enzim Intraseluler dan enzim yang melekat pada membran:
  - ✓ Harus melalui pemecahan sel
  - ✓ Stabilitas struktur sel harus tetap dijaga dengan cara : pemilihan jenis buffer dan lingkungan media ekstraksi yang sesuai, menjaga suhu ekstraksi, mencegah kontaminasi logam dsb.
  - ✓ Sering terkontaminasi oleh protein intraseluler.
- Enzim mikrobial :
  - ✓ Proses fermentasi harus dihentikan sebelum enzim diekstraksi dan diisolasi untuk mencegah kemungkinan kontaminasi mikroba



Gambar. Tahap Umum Ekstraksi dan Isolasi Enzim Industrial

## ISOLASI ENZIM INTRASELULER

- Merupakan proses pelepasan enzim dari sel
- Isolasi enzim dari tumbuhan memiliki tingkat kesulitan yang tinggi, karena:
  - ✓ Dinding selnya keras
  - ✓ Cenderung menimbun zat-zat racun dalam vakuole (misal fenol), sehingga ketika dinding pecah, racun dan enzim akan bercampur dan berinteraksi.
- Cara mengatasi :
  - ✓ Ditambahkan zat pereduksi, seperti  $\beta$ - merkaptoetanol, askorbat, atau tioglikolat
  - ✓ Menggunakan tanaman muda



Gambar 7.3 Berbagai Metode Pemecahan Dinding Sel

- Cara mengukur efektivitas pemecahan sel :
  - ✓ Penggunaan mikroskop
  - ✓ Memantau pengeluaran enzim intraseluler tertentu (penciri) yang dikeluarkan ke dalam supernatan

- Pemecahan sel secara fisik :
  - ✓ Mutlak diperlukan untuk penghancuran sel tumbuhan
  - ✓ Ditambahkan buffer atau cairan untuk mempermudah proses ekstraksi
  - ✓ Perlakuan pembekuan dan pencairan sel secara cepat dan cold shock dapat merusak sel mikroba  $\Rightarrow$  disebabkan pembentukan kristal es

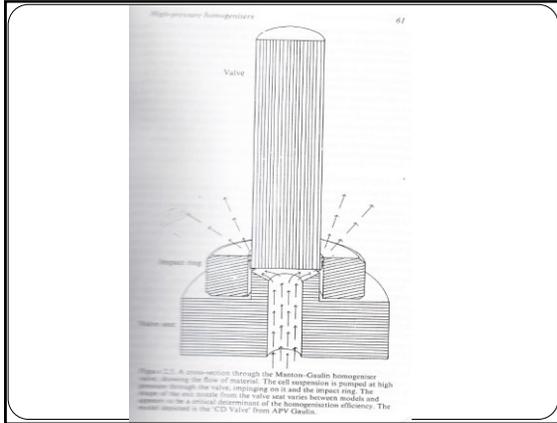
## Beberapa Metode Pemecahan Sel Cara Fisik

### 1. Dengan alat homogenizer, seperti waring blender, atau hammer mill.

- Biasa digunakan untuk memecah dinding sel jaringan hewan dan tumbuhan.
- Cara ini kurang baik untuk sel mikroba karena dinding selnya lebih keras.
- Untuk membantu proses pemecahan digunakan : bubuk alumina, pasir atau silika
- Untuk preparat kecil digunakan mortar dan penumbuk
- Untuk skala besar digunakan homogenizer atau penggiling bertekanan ditambah bubuk metal sebagai pemecah
- Sel dibasahi dengan buffer untuk mempermudah pemecahan
- Dapat ditambah dengan proses agitasi
- Letak enzim di dalam sel mempengaruhi waktu pemecahan

### 2. Pembekuan dan Pencairan

- Jika pasta sel didinginkan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ , maka ia akan mengalami perusakan dinding sel akibat **anomali air (volume membesar ketika air membeku)**.
- Sekitar 50% protein periplasma akan dilepaskan ke dalam medium, tapi hanya  $\pm 10\%$  protein terlarut total.
- Bila enzim dapat dilepaskan dengan cara ini, umumnya enzim tersebut memiliki derajat kemurnian yang tinggi.
- Senyawa krioprotektan (laktosa, dekstran, rafinosa, gliserol) yang digunakan pada proses pembekuan akan menghambat pemecahan sel
- Sel yang sudah tua lebih mudah dipecah daripada sel muda
- Bakteri gram negatif lebih mudah dipecah daripada gram positif



### 3. Kejutan Osmosis

- Bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap perubahan tekanan osmosa yang besar dibandingkan bakteri Gram positif.
- Bila bakteri diletakkan dalam media dengan tekanan osmosa tinggi (mis. larutan sukrosa 20%) sampai dicapai keadaan setimbang, kemudian dipindahkan ke dalam air, maka akan timbul aliran air dari media ke dalam sel, sehingga akan menyebabkan pecahnya dinding sel.

### 4. Sonifikasi

- Sel dalam media cair diberi getaran di atas frekuensi batas pendengaran manusia (> 20kHz, ultrasonik)
- Getaran ini menimbulkan perapatan dan perenggangan yang menimbulkan perubahan periodik tekanan dalam cairan medium dan plasma sel

### 5. Agitasi dengan Abrasi

- Pasta ditempatkan pada wadah yang mengandung butir-butir gelas dan digetarkan dengan cepat. Timbulnya gaya gesek akibat gradien kecepatan oleh tumbukan antar butiran dan antara butiran dengan mikroorganisme menyebabkan pecahnya sel.

## Ekstraksi Secara Kimia

- lebih halus dari cara fisik.
- Agitasi diterapkan hanya sekali-kali.

### 1. Detergent

- Detergent-detergent anionik, kationik, dan nonionik cukup efektif untuk merusak membran sel.
- Contoh detergent yang sering digunakan untuk isolasi enzim a.l: setiltrimetil amonium bromida (kationik), natrium lauril sulfat (anionik), tweens, spans dan triton (non-ionik)

- Pada kondisi pH dan kekuatan ion yang sesuai, detergent akan berinteraksi dengan lipoprotein untuk membentuk misel. Akibatnya lipoprotein yang merupakan konstituen membran dapat larut dan enzim dapat dikeluarkan.
- Pemilihan dan penggunaan detergent ini harus cukup selektif, karena beberapa enzim dapat menjadi tak aktif akibat denaturasi protein dan pengendapan oleh detergent.
- Umumnya detergent harus segera dipisahkan sebelum enzim hasil isolasi digunakan.

### 2. Enzim Litik

- Pemecahan dinding sel dengan cara ini merupakan cara yang paling efektif.
- Enzim litik yang umum digunakan adalah lisozim yang diperoleh dari putih telur.
- Enzim ini memecah ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida dari polisakarida (asam muramat) penyusun dinding sel.
- Dinding sel bakteri gram positif lebih banyak mengandung polisakarida dibandingkan dengan bakteri gram negatif, sehingga penggunaan enzim litik lebih efektif untuk memecah dinding sel bakteri gram positif.

- EDTA perlu ditambahkan pada media sebelum enzim ini digunakan untuk memecah dinding sel bakteri gram negatif, untuk mengikat ion-ion divalen yang dapat menginaktivkan enzim ini.
- Enzim lisozim sudah digunakan secara komersial pada ekstraksi enzim glukosa isomerase dari *Streptomyces sp.*
- Jenis enzim lain : papain  $\Rightarrow$  mudah dikendalikan dan bersifat selektif

### 3. Alkali

- Penempatan sel pada medium dengan pH 11 –12,5 selama 20 menit menyebabkan pecahnya dinding sel.
- Penggunaan cara ini hanya berhasil diterapkan untuk enzim-enzim yang stabil pada pH tinggi.

### Pemurnian Awal Larutan Enzim

- Setelah dinding sel dipecahkan, maka enzim intra selluler yang diinginkan berada dalam larutannya yang mengandung enzim-enzim lain, protein, asam nukleat, metabolit, senyawa-senyawa yang diperlukan untuk media, dan lain-lain.
- Bila enzimnya merupakan ekstra seluler, maka enzim ini harus dipisahkan dari sel penghasilnya dan senyawa-senyawa lain yang terdapat dalam media.
- Untuk maksud tersebut, dapat dilakukan pemisahan secara bertahap melalui beberapa cara, seperti: klarifikasi dan presipitasi, sentrifugasi, filtrasi.

### Klarifikasi dan Presipitasi

- Proses pemisahan partikel non enzim yang tercampur dengan enzim dengan cara pengendapan
- Partikel non enzim berasal dari penambahan buffer, air atau cairan fisiologis pada proses pemecahan dinding sel, atau molekul-molekul kompleks yang berikatan dengan enzim
- Dapat dilakukan dengan penambahan senyawa yang dapat menggumpalkan seperti : amonium fosfat, asam askorbat, garam-garam kalsium, serat selulose, sistein, tanah diatom, gelatin, asam fosfat, garam Na-pospat, na-sulfat dan Na-sitrat , atau senyawa penggumpal dalam pemurnian air (polielektrolit seperti poliamin) $\Rightarrow$  menggumpalkan struktur koloid cairan

### Klarifikasi dan presipitasi.....

- Dapat ditambahkan bahan pengawet pada tingkat yang aman untuk dikonsumsi, misal : fenol, amonium kuaterner dan florida.
- Enzim hasil klarifikasi dapat dijual sebagai cairan enzim komersial.
- Konsentrasi senyawa penggumpal harus tepat, agar enzim tidak ikut menggumpal
- Garam amonium sulfat pada konsentrasi tinggi menyebabkan salting out protein termasuk enzim.

## Pengendapan

- Didasarkan pada perbedaan kelarutan
- Dalam larutan garam yang pekat, biasanya amonium sulfat, protein-protein memiliki perbedaan kelarutan. Dengan memvariasikan
- konsentrasi amonium sulfat, protein-protein dapat dipisahkan. Teknik ini sering digunakan pada tahap awal pemurnian protein.
- Secara umum:
  - Proteins kecil lebih larut daripada protein besar.
  - Semakin banyak jumlah muatan pada rantai samping, kelarutan protein semakin besar.
  - kelarutan protein A sama sekali tidak tergantung pada protein B – kelarutan hanya tergantung pada sifat masing-masing individu protein.

- 2 jenis metode untuk menggumpalkan enzim :

1. Pelarut organik
2. Garam

- Pelarut organik :

- ✓ Menurunkan konstanta dielektrik  $\Rightarrow$  medium kurang sesuai dengan permukaan enzim yang polar  $\Rightarrow$  adanya residu asam amino hidrofobik yang terikat secara longgar pada molekul enzim menyebabkan pelipatan molekul baru dan menjadi tidak aktif
- ✓ Proses inaktivasi enzim mungkin terjadi memperbesar kemungkinan denaturasi terutama pada suhu tinggi  $\Rightarrow$  fraksinasi dilakukan pada suhu rendah.
- ✓ Mudah terbakar dan harganya mahal.

## Pengendapan Dengan Garam

- ✓ Ion garam mempengaruhi kelarutan protein
- ✓ Pada konsentrasi rendah ion-ion garam melingkungi molekul protein dan mencegah bersatunya molekul protein sehingga protein melarut  $\Rightarrow$  SALTING IN
- ✓ Pada konsentrasi tinggi, terjadi peningkatan muatan listrik di sekitar protein yang akan menarik mantel air dari koloid protein  $\Rightarrow$  interaksi hidrofobik diantara sesama molekul protein pada suasana ionik akan menurunkan kelarutan protein  $\Rightarrow$  SALTING OUT.
- ✓ Salting out dengan garam  $\Rightarrow$  proses pemisahan yang murah.
- ✓ Garam yang ditambahkan : amonium sulfat, natrium sulfat, sodium fosfat dsb.

### 1. Ammonium Sulfat

- Enzim dapat diendapkan dan difraksinasi dengan "salting out". Garam ini sering dipilih karena beberapa keuntungan:
  1. Murah
  2. mudah larut
  3. "Self cooling" pada pelarutannya dalam air
  4. Kebanyakan enzim tidak rusak oleh adanya garam ini
- Kelemahan ammonium sulfat : tidak bersifat buffer dan dapat membebaskan amonia yang akan meningkatkan pH.

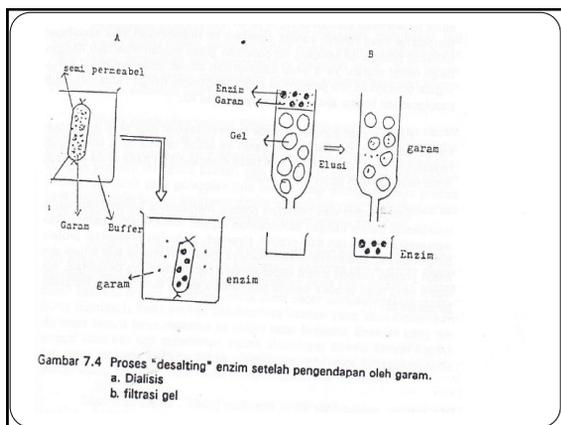
### 2. Sodium Sulfat

- Sodium sulfat efektif untuk berbagai jenis enzim, tapi kelarutannya rendah.

### 3. Garam Klorida

- Garam klorida perlu dihindari karena tidak efisien.

- Enzim hasil salting out meski sudah bebas dari kontaminan non protein, tapi masih tercampur dengan protein non enzim.
- Garam yang tersisa dari hasil penggumpalan harus dipisahkan dengan proses desalting  $\Rightarrow$  pada skala industri tidak dilakukan karena mahal.
- Garam yang tersisa dapat dimanfaatkan dengan cara rekristalisasi



### Pengendapan dengan Pelarut Organik

- Pelarut organik akan mengurangi tetapan dielektrik air, dengan demikian dapat mengurangi kelarutan protein karena interaksi antar molekul protein lebih disukai dibandingkan antara molekul protein dengan air. Atau dengan kata lain: "Protein diendapkan karena desakan pelarut organik terhadap air yang berinteraksi dengan protein".
- Protein dapat diendapkan dengan pelarut organik tanpa merusak struktur protein bila diendapkan pada suhu di bawah 4 °C.
- Pelarut organik yang biasa digunakan a.l. : isopropanol, metanol, etanol dan aseton.
- Penggunaan pelarut-pelarut ini dalam skala industri jarang digunakan karena selain mudah terbakar juga harganya mahal

- Etanol : terdapat keseimbangan antara efek melarutkan dan sifat hidrofilik yang cukup untuk mengurangi denaturasi.
- Isopropanol : digunakan untuk presipitasi enzim ekstraseluler seperti amiloglukooksidase, mempunyai sifat mudah terbakar dan cenderung hidrofobik.
- Aseton : harus ditambahkan secara perlahan melalui sisi samping wadah
- Enzim yang diperoleh dari pelarut organik bersifat lebih murni, meski sulit dilarutkan kembali oleh air dibanding hasil pelarutan dengan garam.

### Pengendapan dengan Polimer dengan Berat Molekul Tinggi

- Polietilen glikol (PEG) dengan BM antara 4000 – 6000 sering digunakan untuk mengendapkan protein.
- Skala lab : POLIMER DEKSTRAN,, POLIMER ASAM POLIAKRILAT dan POLIETILEN GLIKOL pada konsentrasi tinggi.
- Berbeda dengan pelarut organik, polimer ini dalam larutan protein akan memberikan efek penstabilan molekul protein.
- Efektif pada konsentrasi rendah, sekitar 6 - 12%.
- Mekanisme : penurunan aw

- Keuntungan penggunaan PEG : tidak bersifat toksik, tidak mudah terbakar dan memberi efek protektif terhadap protein, konsentrasinya bisa 50% (b/b) dan presipitasi protein mulai terjadi pada konsentrasi 6-12%, tidak memerlukan suhu rendah, murah.
- Penurunan kelarutan protein oleh PEG dipengaruhi oleh : suhu, adanya ion, konsentrasi protein dan pH.
- Untuk pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi pertukaran ion, maka PEG harus segera dipisahkan.

### Pemekatan

- Pemekatan dapat dilakukan dengan berbagai cara, al:
  - Pengendapan
  - Adsorpsi
  - Ultra filtrasi (reverse osmose)
  - Penguapan
  - Pembekuan

## Sentrifugasi

- Cara ini dipilih untuk memisahkan larutan dari molekul yang lebih besar dalam skala laboratorium.
- Dalam skala besar, sentrifugasi tidak memuaskan diantaranya karena: kapasitasnya kecil, diperlukan kecepatan sangat tinggi (ultrasentrifuge), dan lain-lain.
- Digambarkan dengan persamaan

$$\Phi = \frac{d^2(\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \times \frac{\omega^2 r v}{Sg}$$

$\Phi$  = "The troughput for complit removal"  
 d = diameter partikel  
 $\rho_p$  = masa jenis partikel     $\rho_l$  = masa jenis larutan  
 g = tetapan gravitasi     $\omega$  = kecepatan sudut  
 r = radius putaran  
 v = volume cairan dalam tabung sentrifuge  
 S = tebal lapisan cairan dalam tabung sentrifuge

- Pemisahan akan lebih mudah tercapai bila diameter partikel, d, besar; perbedaan masa jenis partikel dan larutan yang besar; dan viskositas larutan yang rendah.
- Selain itu kecepatan sudut yang tinggi, radius putaran yang besar, dan lapisan cairan yang tipis juga mempercepat proses.
- Pada prakteknya, partikel materi biologis selalu kecil dan memiliki masa jenis yang rendah, sementara hasil fermentasi mempunyai viskositas yang tinggi dan kadang masa jenisnya agak tinggi
- Pada skala lab. hal ini diatasi dengan menaikkan kecepatan sudut, tetapi pada skala industri ???

## Filtrasi

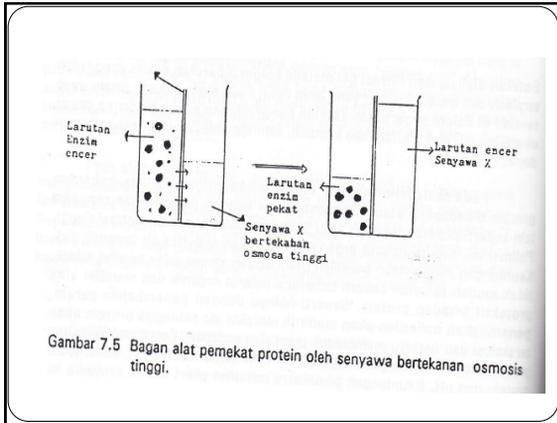
- Kecepatan alir cairan yang melalui penyaring bergantung pada perbedaan tekanan, hambatan oleh materi, kekentalan cairan dan hambatan oleh lapisan yang sudah terbentuk.
- Akibatnya keefektifan penyaringan yang mula-mula tinggi, menurun drastis dengan semakin terakumulasinya materi yang tersaring.
- Untuk mengatasinya, biasanya digunakan tanah diatomae yang membantu menahan partikel-partikel halus.

- Penyaring yang biasa digunakan untuk industri merupakan : filter press atau dengan "rotary drum filter"
- Filter terdiri dari kain saring yang terletak diantara dua piringan berombak. Piringan tersebut akan menekan cairan didalam kain saring dan keluar melalui pori-pori kain saring.
- Rotary drum filter juga menggunakan tekanan dan perputaran tong akan membantu mengurangi akumulasi endapan pada penyaring.

- Pada skala pilot plant dan insdutri kecil corong Buchner berukuran besar dapat digunakan, dan dikombinasikan dengan bantuan vakum.
- Resiko penggunaan vakum : terbentuknya busa dan penurunan aktivitas enzim.
- Alat lain : filtrasi bertekanan (filter press)

## Ultrafiltrasi dan Osmosa Balik

- Pada ultrafiltrasi, molekul-molekul dipaksa melewati suatu membran dengan ukuran pori yang sangat kecil dengan menggunakan tekanan hidrolik.
- Pada osmosa baik, ukuran pori membran sedemikian kecilnya sehingga yang dapat menembus melalui membran hanya molekul molekul pelarut.
- Osmosa balik sering dipakai untuk pemekatan enzim, sedang ultrafiltrasi digunakan untuk fraksionasi protein berdasarkan ukurannya.



- Membran ultrafiltrasi dibedakan atas 2 macam membran, yaitu: membran difusif dan membran "microporous"
- Kedua macam membran ini dapat digunakan untuk protein-protein dengan BM antara 500 – 300.000 Da.
- Membran "microporous" merupakan membran yang kaku dengan diameter pori antara 500 – 5000 Å. Molekul dengan ukuran sangat kecil akan melewati membran sedangkan molekul besar akan ditahan pada permukaan membran. Molekul dengan ukuran sedang seringkali ditahan di dalam struktur membran sehingga sering menyebabkan penyumbatan.

- Membran difusif terdiri dari membran-membran hidrogel yang homogen. Melalui membran-membran ini pelarut dan zat terlarut dipindahkan karena adanya gradien konsentrasi (melalui difusi molekul).
- Proses perpindahan molekul melalui membran memerlukan energi kinetik dan berlangsung lebih cepat pada temperatur yang tinggi.

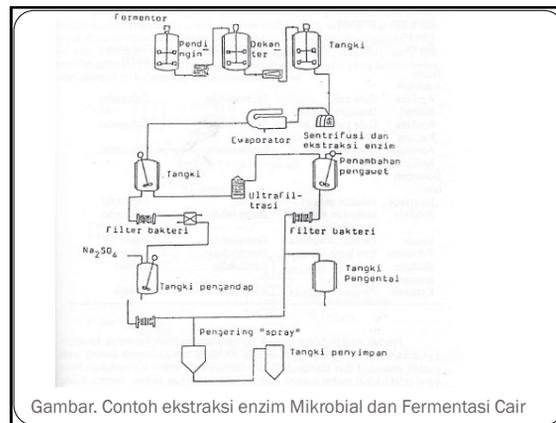
Teknik Dasar	Senyawa spesifik	Keefek-tifan	Kelemahan
Pengendapan			
a).	Garam anorganik	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> NaCl Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Ca(OAc) <sub>2</sub>	*** * ** *
b).	Pelarut organik	Aseton etanol isopropanol	** ** ** Bahaya kebakaran
c).	Polimer bermuatan	Setafon, protamin sulfat	** ** mahal

Teknik dasar	Senyawa spesifik	Keefektif-an	Kelemahan
Polimer bermuatan (lanjutan...)	Polietilen imina DEAE-dekstran	** *	
Adsorpsi			
a).	Polisakarida anionik	DEAE, selulosa	***
b).	Polisakarida kationik	CM, SP fosfolulosa	***
c).	Kromatografi afinitas		**** Mahal
Ultra filtrasi/ reverse osmose			
Penguapan			
	Rotary evap. Spray dry Freeze dry	* *** ***	Timbul panas

## Pengeringan dan Proses Lanjutan

- Bentuk-bentuk enzim komersial :
  - ✓ Bentuk cair
  - ✓ Bentuk padat : tepung/serbuk, tablet
  - ✓ Bentuk imobil
- Enzim cair ⇔ diperoleh dengan pemekatan dengan :
  - ✓ evaporasi vakum
  - ✓ Pemanas/oven
 } Menguapkan sebagian medium air

- Proses penguapan harus pada suhu yang tidak merusak struktur dan fungsi hayati enzim
- Enzim termofil tahan pada suhu 60°C
- Untuk menghindari kerusakan pada suhu tinggi ditambah senyawa penstabil
- Pengeringan vakum umumnya untuk skala lab, karena untuk skala industri terlalu mahal
- Pengeringan skala industri : spray dryer
- Kelemahan spray dryer :
  - ✓ mahal
  - ✓ dapat merusak aktivitas enzim
  - ✓ Kontaminan yang ada pada cairan enzim sebelumnya akan terikat dan tidak dapat dipisahkan
- Kelebihan spray dryer : enzim mudah larut dalam air



Tabel 7.2 Bentuk Jual Beberapa Enzim Industri

Enzim	Penggunaan	Jenis enzim	Bentuk jual
Protease Bakteri	detergen proses pangan, Bir, Kulit	Ekstraselular	cair, padat
Kapang	Industri kue	Ekstraselular	padat
Pepaya, nenas	Industri bir	Ekstraselular	cair, padat
Cairan lambung hewan	membantu pencernaan	Enzim hewan	cair
Renin	Pembuatan keju	Enzim hewan	tablet (padat)
Enzim Amilolitik			cair atau padat
Amilase Bakteri	Gula, gula, Detergen, Tekstil	Ekstraselular	cair, padat
Amilase Kapang	Gula cair, Bir, industri kue dan roti	Ekstraselular	cair, padat
Amilolitikase Golongan lain	Gula cair, Bir	Ekstraselular	cair, padat
Invertase	Industri gula	Selular	cair, padat
Selulase	Makanan, sari buah, Minuman ringan, Pangan, Diagnostika	Ekstraselular	cair, padat
Ulipase	Pangan, Diagnostika	Ekstraselular	padat
Pektinase	Sari buah, Pangan	Ekstraselular	cair, padat
Glukosase	Gula cair	Intraselular	Amobil
Isomerase			
Katalase	Pangan, Diagnostika	Intraselular	Amobil

- Keuntungan enzim dalam bentuk kering dibanding bentuk cair :

Enzim Kering	Enzim Cair
Lebih mudah ditangani dan diangkut	Memerlukan biaya yang relatif lebih mahal karena lebih berat
Relatif lebih stabil	<ul style="list-style-type: none"> <li>➢ Memerlukan penyimpanan pada suhu rendah atau penambahan bahan penstabil</li> <li>➢ Resiko penurunan aktivitas enzim</li> </ul>

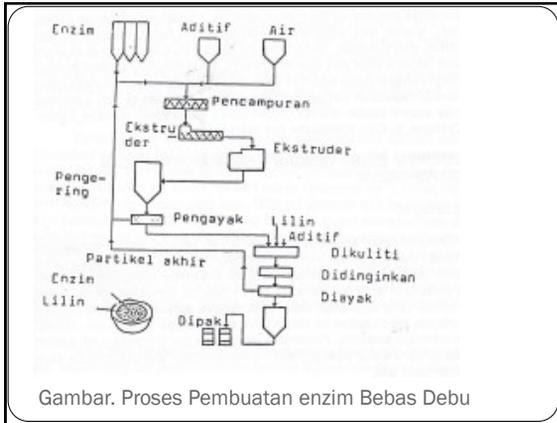
- Kelemahan enzim dalam bentuk kering :
  - ✓ memerlukan biaya tambahan setelah pemekatan
  - ✓ Resiko polusi dan iritasi ⇔ diatasi dengan membuat bentuk pelet

### Proses Pembuatan Enzim Kering Bebas Debu

- Enzim hasil pemekatan dikeringkan, kemudian dihaluskan untuk mendapatkan bentuk tepung
- Ditambah bahan-bahan tambahan : garam, laktosa dsb
- Fungsi bahan tambahan
  - ✓ untuk memperoleh bentuk akhir
  - ✓ sebagai pengawet
  - ✓ Sebagai pelengkap atau pengisi
- Partikel enzim yang halus disatukan untuk membentuk granula
- Pelapisan dengan lilin :
  - ✓ Enzim dicampur dengan lilin cair, didinginkan sambil disemprotkan
- Produk akhir : partikel enzim yang terbungkus dalam lapisan lilin

### Pengeringan Enzim dengan Ekstrusi

- Dibantu dengan peralatan khusus untuk membuat bentuk yang lebih seragam
- Untuk dapat melewati alat ekstrusi enzim dicampur dengan bahan pengisi dan pengental sehingga terbentuk pasta enzim
- Contoh bahan pengental : CMC
- Syarat bahan pengental : tidak reaktif



### Liofilisasi (Freeze Drying)

- Liofilisasi bekerja berdasarkan kemampuan es untuk menyublim pada tekanan rendah.
- Bila sampel kita bekukan kemudian ditempatkan pada tekanan rendah (divakum) pada suhu kamar, maka panas sekitar akan menyebabkan es mencair, akan tetapi cairan yang terbentuk akan segera menguap karena vakum.
- Dengan cara ini akan didapat butiran halus (bubuk) yang mudah larut dalam air.

### Pengujian Mutu Enzim Komersial

- Kegunaan : menjamin sifat, aktivitas dan keamanan penggunaannya terutama untuk enzim pangan
- Jenis uji tergantung pada penggunaan, bentuk padatan dan keamanannya sebagai enzim pangan.

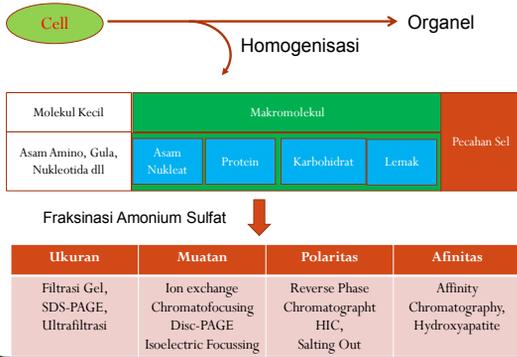
- Jenis uji :
  - ✓ Sifat dan ukuran granula
  - ✓ Kadar debu
  - ✓ Uji ketahanan simpan
  - ✓ Analisis penambahan bahan tambahan
  - ✓ Warna, bau
  - ✓ Adanya kontaminan logam berat, mikotoksin dan antibiotik
  - ✓ Adanya kontaminan mikroba

- Syarat enzim untuk pangan :
  - ✓ Bebas dari seyawa berbahaya : toksin, arsenik, logam berat
  - ✓ Bebas mikroba kontaminan : *Salmonella*, *Coliform*, *E.coli*
  - ✓ Bebas antibiotik dan mikotoksin

### PEMURNIAN ENZIM

- Prinsip pemurnian : sama dengan prinsip pemurnian protein
- Metode pemurnian didasarkan pada sifat enzim :
  - ✓ Ukuran
  - ✓ Muatan
  - ✓ Hidrofobitas
  - ✓ Stabilitas
  - ✓ Aktivitas
  - ✓ Afinitas

## Prinsip Dasar Pemurnian Protein



## Sifat-Sifat Enzim Yang Digunakan dalam Pemurnian

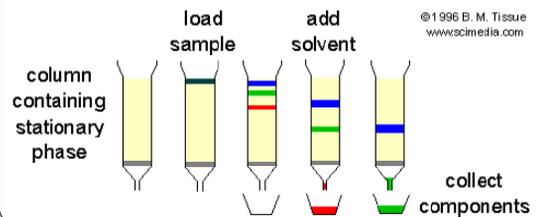
Karakteristik	Prosedur
Kelarutan	<ul style="list-style-type: none"> <li>Salting In</li> <li>Salting Out</li> </ul>
Muatan Ionik	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ion exchange Chromatography</li> <li>Electrophoresis</li> <li>Isoelectric Focusing</li> </ul>
Polaritas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Adsorption Chromatography</li> <li>Reverse phase Chromatography</li> <li>Hydrophobic Interaction Chromatography</li> </ul>
Ukuran Molekul	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dialisis</li> <li>Gel electrophoresis</li> <li>Gel Filtration</li> <li>Ultracentrifugation</li> </ul>
Spesifitas Ikatan	Affinity Chromatography

## Penghilangan Asam Nukleat

- Asam nukleat dapat dihilangkan dengan berbagai cara, seperti:
  - pH tinggi
  - gesekan
  - penggunaan nuklease
  - pengendapan dengan menggunakan kation dengan BM tinggi seperti polietilenimina, streptomisin sulfat, protamin sulfat dll.
- Cara yang paling disukai adalah dengan penggunaan nuklease, kecuali bila enzim yang akan diisolasi adalah nuklease.

## Kromatografi

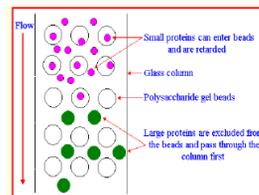
- Merupakan cara pemisahan berdasarkan perbedaan interaksi antara komponen-komponen yang akan dipisahkan dengan fasa diam dan fasa gerak



- Jenis-jenis kromatografi :
  - Kromatografi Partisi
    - ✓ Mis. Kromatografi kertas
  - Kromatografi Adsorpsi
    - ✓ Mis. TLC
  - Kromatografi Penukaran Ion
    - ✓ Mis. Resin penukar ion
  - Kromatografi Penyaringan Molekul
    - ✓ Mis. Filtrasi gel
    - ✓ Kromatografi Affinitas

## Kromatografi Filtrasi Gel

- Memisahkan protein berdasarkan ukurannya.
- Pemisahan terjadi berdasarkan kecepatan pergerakan relatif dari masing-masing protein melalui suatu *molecular sieve*.
- Molecular sieve yang digunakan biasanya* merupakan suatu gel polisakarida dalam bentuk bulatan kecil (*granula*).



### Kromatografi Filtrasi Gel .....

- Gel yang sering digunakan : dekstran (polimer gula) yang larut dalam air dan telah mengalami cross linkage dengan bantuan epiklorhidrin
- Gel dekstran disebut : SEPHADEX
- Contoh sephadex yang digunakan : Sephadex G-25, Sephadex G-50.
- Huruf G menunjukkan gel tersebut dikembangkan dengan air, dan angka menunjukkan besarnya pengembangan.

### Kromatografi Pertukaran Ion

- Memanfaatkan perbedaan afinitas molekul bermuatan di dalam larutan dengan senyawa tidak reaktif yang berfungsi sebagai pengisi kolom yang muatannya berlawanan.
- Senyawa tidak reaktif yang digunakan adalah polimer yang bersifat elastik yang mengandung kerangka resin sintetik : seperti Polistiren
- Pada polimer tersebut dikaitkan gugus fungsional tertentu yang berupa penukar anion atau kation.

### Kromatografi Pertukaran Ion .....

- Contoh penukar kation :

Penukar kation	Gugus Fungsional
Dowex 50	$\text{OSO}_2^-$
IRC-150	$-\text{CH}_2-\text{CH}-$   $\text{COO}^-$
CMC	
Phadex	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Sulfoetil Selulosa	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Resin Akrilik Lemah	$\text{COO}^-$

### Kromatografi Pertukaran Ion .....

- Contoh Penukar Anion :

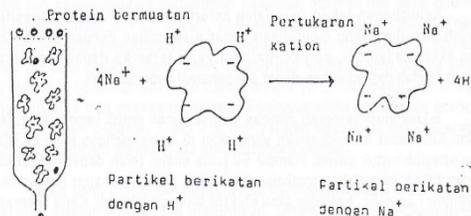
Penukar Anion	Gugus Fungsional
Dowex 1	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
DEAE Selulosa	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$
Trietanolmetil selulosa	
Trietanolamin Selulosa	

- Jenis penukar ion yang banyak digunakan : CMC dan DEAE (dietanolaminoetil) selulosa

### Kromatografi Pertukaran Ion .....

- Pemakaian penukar kation dilakukan dengan penambahan buffer pH 5 dan 10 mM kation (biasanya  $\text{Na}^+$ ) untuk menciptakan kondisi penyerapan yang kuat.
- Kromatografi pertukaran ion banyak digunakan dalam pemurnian enzim.

### Proses pertukaran kation

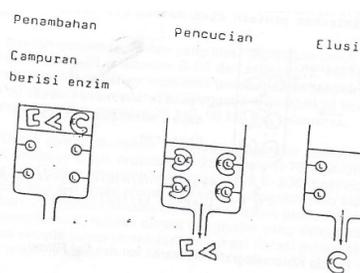


### Kromatografi Afinitas

- Kromatografi dengan dasar interaksi biokimia
- Dikenalkan pertama kali oleh Cuatrecasas tahun 1968
- Pemisahan terjadi karena interaksi spesifik antara pasangan senyawa enzim dengan substrat, kofaktor, allosterik, efektor atau inhibitor.
- Prinsip : ligan yang terikat secara kovalen pada matrik yang tidak larut air akan menyerap salah satu/beberapa dari komponen campuran.
- Komponen yang diserap mempunyai afinitas yang spesifik dengan ligan.
- Komponen yang tidak memiliki afinitas akan melaju dan keluar.
- Molekul yang sudah diserap dilepaskan dengan mengubah kondisi elusi (dengan larutan bebas ligan, perubahan pH atau kekuatan ion).

### Kromatografi Afinitas .....

- Keuntungan :
  - Sifat interaksinya spesifik
  - Jumlah adsorben yang digunakan dapat disesuaikan dengan zat yang akan diadsorpsi
  - Adsorben dapat diregenasi beberapa kali
- Ligan dapat berupa :
  - ✓ Substrat yang termodifikasi
  - ✓ Inhibitor spesifik
  - ✓ Kofaktor
  - ✓ Efektor biologis



Gambar. Gambaran skematis kromatografi afinitas. E = enzim yang ingin diisolasi, L = ligan

### Kromatografi Afinitas .....

- Sistem kromatografi afinitas yang baik ditentukan oleh jenis matriks dan ligan yang digunakan.
- Matriks pengisi kolom : matriks gel dengan sifat :
  - Mempunyai gugus fungsional yang ampuh untuk bereaksi dengan jenis protein dan ligan yang diinginkan,
  - Tahan terhadap mikroba
  - Stabil,
  - Tahan lama
  - Bersifat hidrofilik
  - Dapat diregenasi
  - Mempunyai kapasitas yang besar terhadap enzim atau ligan,
  - Dapat melewati pelarut,

Tabel 7.2 Sifat Beberapa Matriks Khromatografi afinitas

Matrik	Adsorpsi non spesifik	Kapasitas ikatan	Stabilitas kimia	sifat mekanik
Sephadex	baik	rendah	baik	baik
Selulosa	baik	rendah	baik	kurang
Silika	jelek	moderat	baik	baik
Sepharosa	baik	tinggi	baik	baik

### Kromatografi Interaksi Hidrofobik

- Protein enzim dapat diikat oleh matriks melalui interaksi hidrofobik pada lingkungan polaritas dan kekuatan ion yang tinggi.
- Matriks yang digunakan bersifat non polar, misalnya sefarsosa.
- Enzim dipisahkan dari ikatan dengan menggunakan eluen yang polaritasnya diturunkan.
- Eluen yang digunakan : beberapa jenis garam.
- Peningkatan polaritas dapat dilakukan dengan menggunakan konsentrasi ion yang berbeda :  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  dan  $\text{NH}_4^+$  (untuk kation), atau  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  dan  $\text{PO}_4^{3-}$  (untuk anion).

## Kromatografi Cair Metode Cepat

- Berguna untuk pemisahan dan isolasi enzim skala lab
- Dilakukan pada tahap akhir isolasi
- Dikenal dengan Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) yang diturunkan dari teknik HPLC.
- Prinsip : pemisahan molekul organik berukuran kecil yang larut dalam pelarut organik/non polar.
- Diperlukan tekanan tinggi untuk membuat aliran eluen yang baik melalui gel pada kolom yang berukuran kecil (5-50 $\mu$ m).

Tabel 7.3 Manfaat Aplikasi Khromatografi Kolom Pada Skala Besar

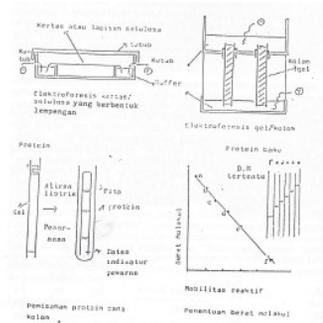
Jenis Khromatografi	Aplikasi
Filtrasi gel	Baik dipergunakan pada tahap akhir pemurnian; kapasitasnya terbatas dan kecepatan fraksinasi rendah.
Pertukaran ion	Paling baik dipergunakan pada tahap awal khromatografi, untuk menampung volume yang besar, karena kapasitasnya yang tinggi, apabila dipergunakan jenis matriks yang tepat.
Afinitas	Biasanya dipergunakan pada tahap menjelang akhir. Kapasitasnya di pengaruhi oleh jenis protein yang dipisahkan.
Interaksi Hidrofobik	Dapat dipergunakan baik pada tahap awal maupun akhir. Perlu dipergunakan eluen dengan polaritas/kekuatan ion tinggi; Jadi paling baik dilakukan setelah khromatografi pertukaran ion atau setelah pengendapan dengan garam. Kapasitas dan resolusinya tinggi, demikian pula kecepatannya.

## Elektroforesis

- Elektroforesis ilmu yang mempelajari pergerakan molekul yang bermuatan dalam medan listrik
- Dapat digunakan untuk identifikasi dan analisis polimer biologi yang bermuatan.
- Teknik yang relatif murah dan mudah untuk menganalisa dan memurnikan macam-macam biomolekul, khususnya protein dan asam nucleat.
- Migrasi Molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh: ukuran, bentuk, muatan, dan komposisi kimia molekul.

## Elektroforesis.....

- Gel yang digunakan : gel apti, agarosa, poliakrilamida.
- Untuk memisahkan dan menentukan jumlah dan ukuran protein atau rantai sub unit protein digunakan elektroforesis gel dengan SDS (Sodium Dodesil Sulfat).



Gambar. Pemisahan Protein dengan Elektroforesis

## Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

- Banyak digunakan untuk mempelajari ukuran dan muatan senyawa biomolekul seperti RNA, DNA dan protein. Juga digunakan sebagai metoda untuk pemurnian
- Prinsipnya didasarkan pada mobilitas partikel bermuatan dalam medan listrik:

- Peralatan PAGE : gel akrilamida ditempatkan di antara 2 lempeng gelas

