

# **Kuliah Bioteknologi**

## **Handout**

**Dosen:**

**Dr. Endang Saepudin**


**Dra. Siswati Setiasih MSi. Apt.**

*Dept. Kimia FMIPA-UI*

# Pustaka

---

- Introduction to Biotechnology, William J. Thieman, Benjamin Cummings; US Ed edition. 2003
- Bioteknologi, Steve Prentis, Penerbit Erlangga, 1990
- Biochemistry, Geoffrey Zubay, 3<sup>rd</sup> Ed., Wm. C. Brown Publisher, 1993
- Bacterial Metabolism, Gerhard Gottschalk, Springer-Verlag, 1978



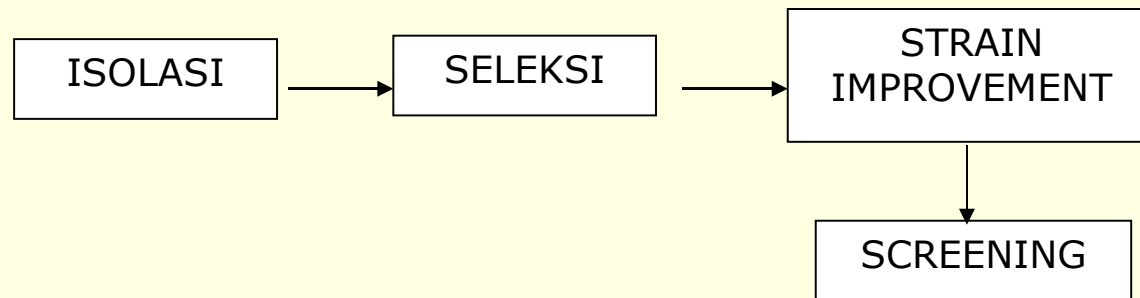
# **BAB I**

# **PENDAHULUAN**

# RUANG LINGKUP & PERKEMBANGAN BIOTEKNOLOGI

## A. 1 MIKROBIOLOGI & BIOKIMIA

- Jumlah MIKROBA yang sudah dimanfaatkan untuk Bioteknologi masih sedikit →→ perlu upaya :



- Upaya tsb bertujuan untuk memperoleh **mutan** yg *memiliki sifat*:
  - *efisen dalam proses*
  - *dapat menggunakan bahan dasar yang lebih bervariasi*
  - *Stabil selama proses dan dalam stock*

## 2. FISILOGI MIKROBA

- STUDI HUBUNGAN ANTARA KEMAMPUAN METABOLISME DENGAN LINGKUNGAN DIMANA MIKROBA BERADA BAIK DALAM KEADAAN TUMBUH/TIDAK TUMBUH

- Kemampuan memodifikasi sel:

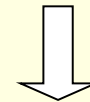
☞ struktur sel

☞ kimia sel dan

☞ faal sel



**DIEKSPLOITASI**  
(optimasi kondisi lingkungan)



Produk  
/Kemampuan yg diinginkan

- Tujuan modifikasi :

*Untuk menyebabkan metabolite over production*

*agar dapat mengatasi feedback regulation*

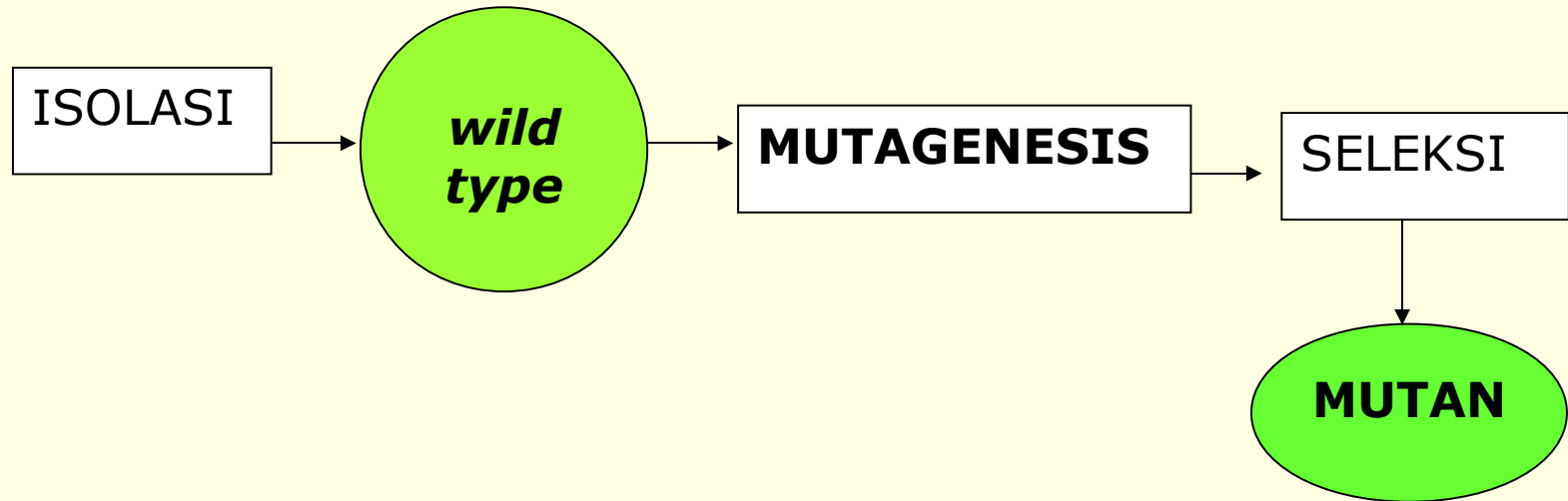
### 3. BIOKIMIA

---

- Sintesis :
  - Metabolit primer
  - Metabolit sekunder
  - Enzim dan fungsi kimia sel yang lain
- Katabolisme xenobiotic chemicals → *waste treatment*
- Enzyme immobilization
- Isolasi, pemurnian molekul biologi & karakterisasi

## B. REKAYASA GENETIK

- Berperan dalam *strain improvement*



# METODE

## 1. CELL FUSION / PROTOPLASMIC FUSION

### ■ Hewan

■ Sel somatik A

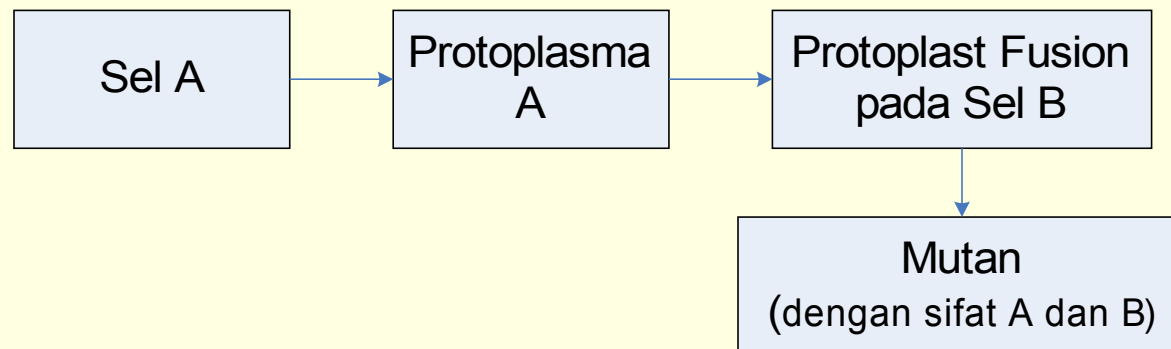
■ Sel somatik B

**FUSI**

**SEL Unggul**/heterokaryon  
(dg kemampuan A dan B)

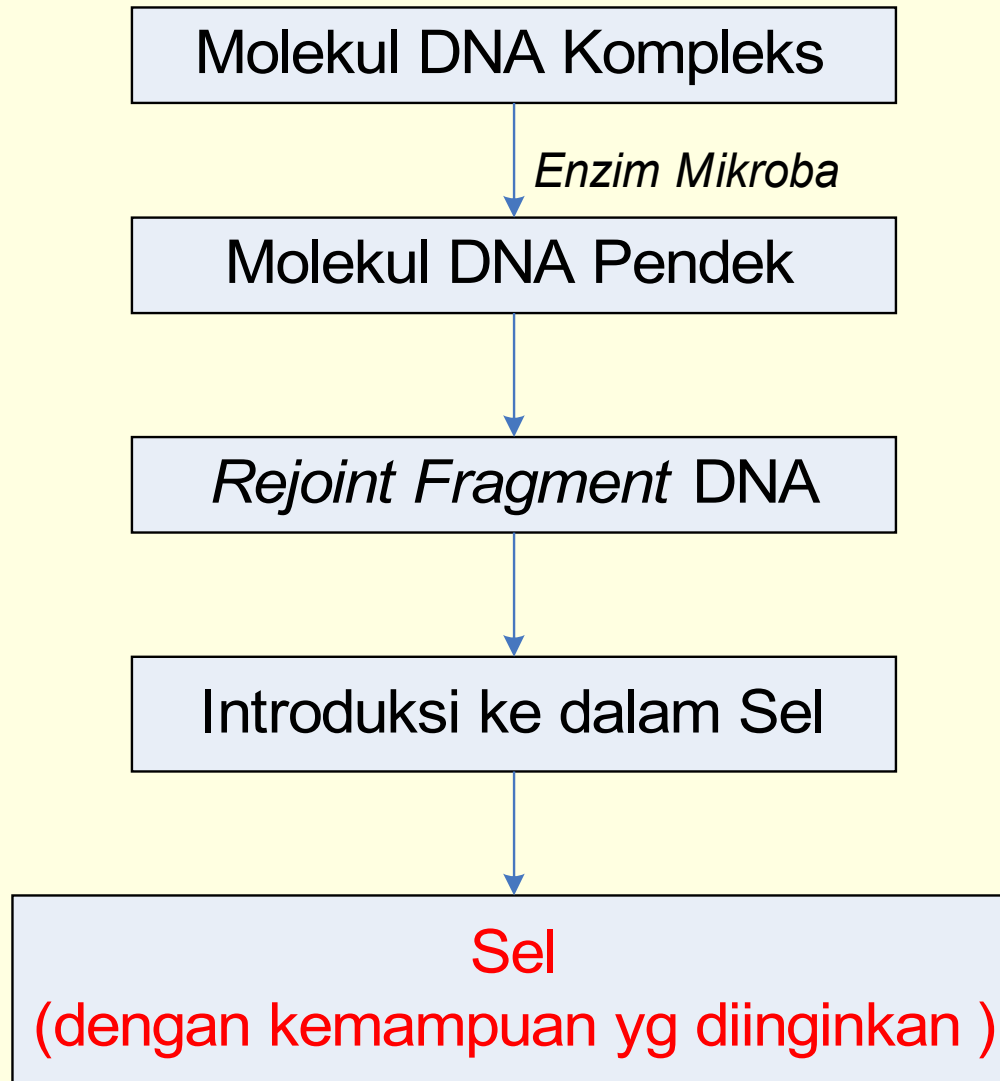
■ Contoh : Monoklonal antibodi (MA)

### ■ Tumbuhan & Mikroba



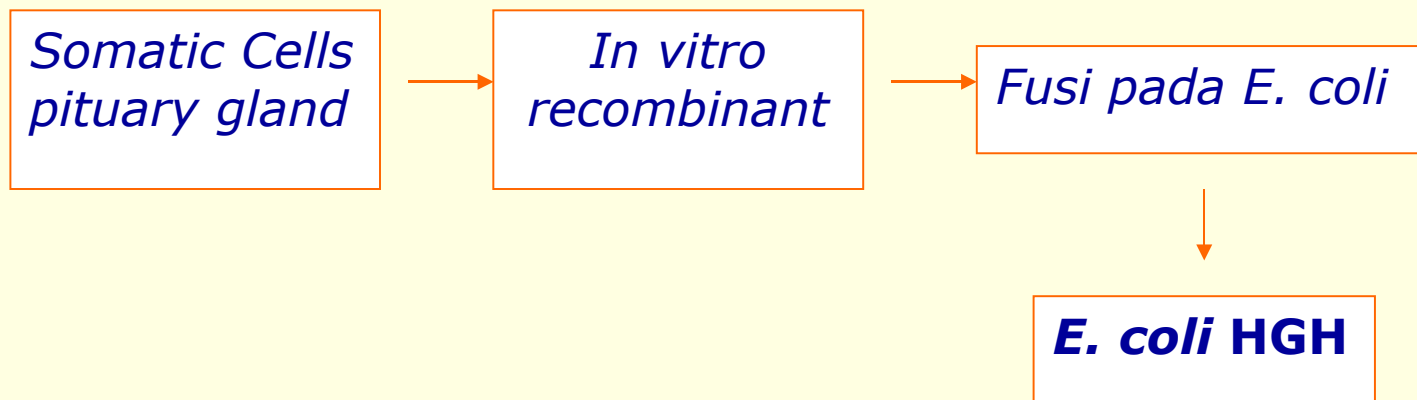
# 1. IN VITRO RECOMBINANT DNA METHOD

---

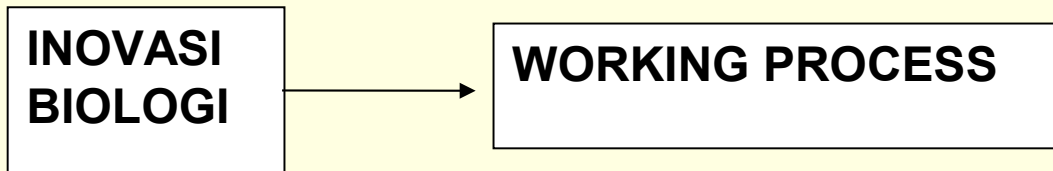


## Contoh\_

- Rhizobium → Genom N Fixing → ***Tumbuhan N-Fixer***
- Legumes → Genom modula → ***Non Legum***
- Produksi hormon Insulin (Humulin)
- Produksi HGH (*human growth hormone/HGD*)

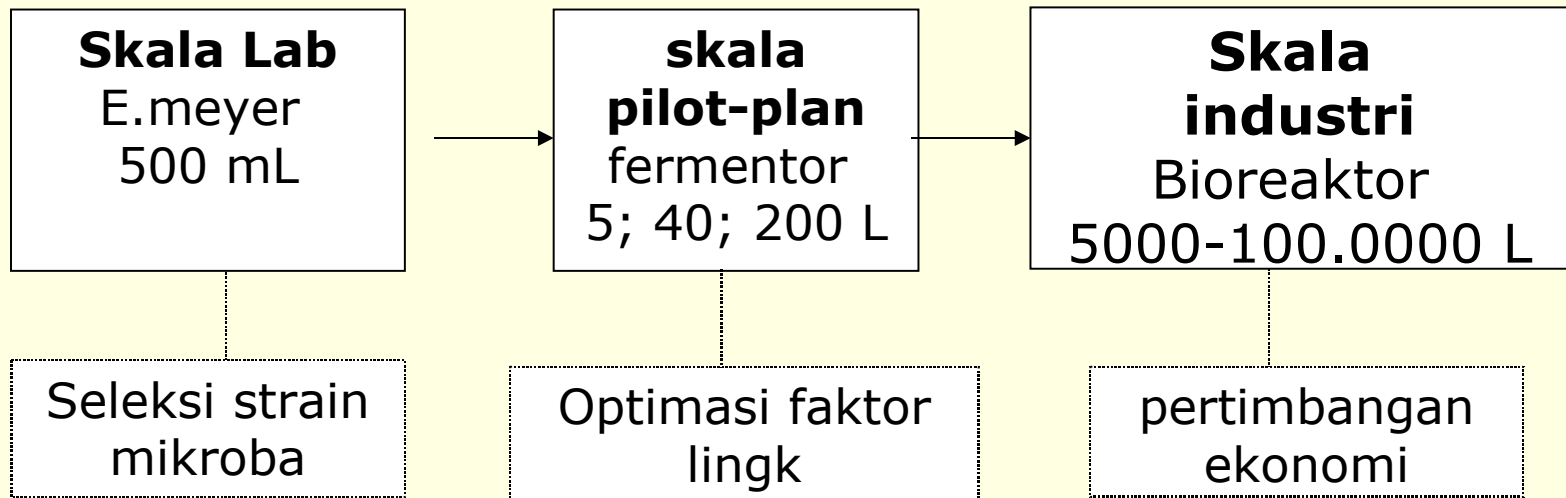


# C. ENGINEERING/KETEKNIKAN



## BIOINDUSTRI

- Untuk mendapatkan proses bioindustri yang efisien & ekonomis diperlukan operasi *scale-up*, melalui:



# FAKTOR-FAKTOR PERKEMBANGAN BIOPROSES

---

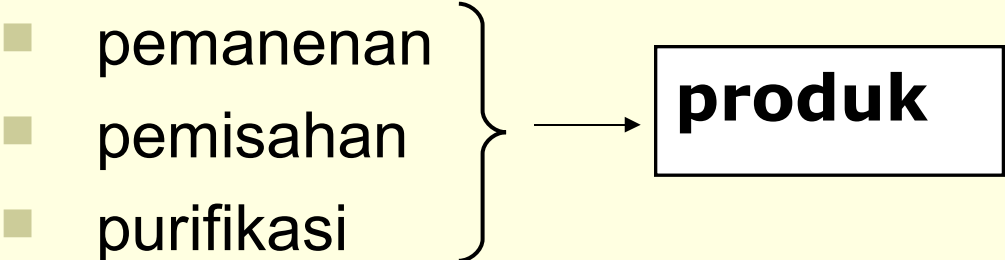
- Suatu proses fermentasi skala besar yang berhasil secara komersial umumnya merupakan pengembangan dari proses skala kecil (skala Lab)
- **Pengoperasian proses skala besar :**
  - Bukan sekedar mengerjakan prosedur skala kecil dengan jumlah bahan yang ditangani lebih besar,  
**tetapi**
  - Harus memasukkan konsep-konsep baru untuk mengatasi masalah yang timbul pada operasi skala besar

# BIOINDUSTRI MENELAHAH PRINSIP-PRINSIP

---

- *Operasi Aseptik*
  - menghindari kontaminasi umumnya (bakteri dan faga)
- *Rancang bangun reaktor*

**BIOREAKTOR** = reaktor biologik = fermenter  
suatu wahana/tempat untuk keberlangsungan  
proses fermentasi /transformasi bahan dasar  
menjadi produk yang diinginkan yang dilakukan oleh  
sistem enzim dalam mikroba atau enzim yang  
diisolasi
- Bioreaktor / fermentor
  - Agitasi
  - Oksigen transfer
  - Heat removal
- *Reaktor untuk biokatalis yang terimobilisasi*
  - enzim/ sel

- *Kenetika bioproses*
- *Instrumentasi dan pengendalian proses*
  - Suhu  $\Rightarrow$  Oxygen consumption
  - pH  $\Rightarrow$  CO<sub>2</sub> production
  - Dissolved oxygen  $\Rightarrow$  cells
- *Product Recovery – downstream processes atau proses hilir :*
  - pemanenan
  - pemisahan
  - purifikasi

```
graph LR; A[pemanenan] --- B{ }; C[pemisahan] --- B; D[purifikasi] --- B; B --> E[produk];
```

# BIOTEKNOLOGI

---

- **Pengertian :**
- Salah kaprah :
  - semata-mata hanya berkaitan dg teknik rekayasa genetika
- Sebenarnya
  - merupakan teknologi yg berakar pd proses fermentasi dg memanfaatkan kemampuan mikroorganisme dalam suatu lingkungan yg dikendalikan agar menghasilkan berbagai jenis produk.
- - bukan suatu disiplin ilmu melainkan bidang kajian antar disiplin ilmu : Mikrobiologi, Biokimia, Teknik Kimia, dll
  - aspek penerapan praktis dari Biologi molekuler, yaitu bidang ilmu yg menggeluti seluk beluk struktur dan fungsi molekul kimia yang terdapat di dalam *living system* (manusia, hewan dan miroba)

# Definisi

---

- **OECD** = *Organization for Economic Cooperation and Development* (1982)
  - ***Biotechnology is the application of scientific and engineering principles to the processing of materials by biological agent to provide goods and services***
  - Aplikasi prinsip-prinsip ilmu dan rekayasa dalam pengolahan bahan-bahan menggunakan agen biologis untuk menghasilkan barang dan jasa

# PERKEMBANGAN BIOTEKNOLOGI

?	<b>Periode Awal</b> Produk fermentasi tradisional (beer, wine, cuka, sake, yogurt, keju, tempe, oncom, acar, ikan peda)
4000 SM	Penyulingan wiski (awal prod etanol)
1632 -1723	Anthonie van Leeuwenhoek (keberadaan mikroba diketahui)
TengahAbad XIX	- Mikrobiologi lahir - Pasteur (peran mikroba dlm fermentasi diketahui)
Abad XX	<b>Periode kedua</b>
1913 - 1915	- fermentasi aseton & butanol (Weizman)
1914 - 1918	- fermentasi gliserol
1923	- fermentasi asam sitrat
1928/29	- ditemukan Penicillin (A. Flemming)

1940 - 1944	- Penisillin diproduksi dlm skala besar- Operasi aseptik
1953	- Struktur DNA dipahami
1960	- SCP (single cell protein)
1973	<b>Periode ketiga</b> (awal rekayasa genetika dg teknik DNA rekombinan)
1982	Humulin@( <i>human insulin</i> ) diproduksi pertama kali sebagai produk DNA rekombinan

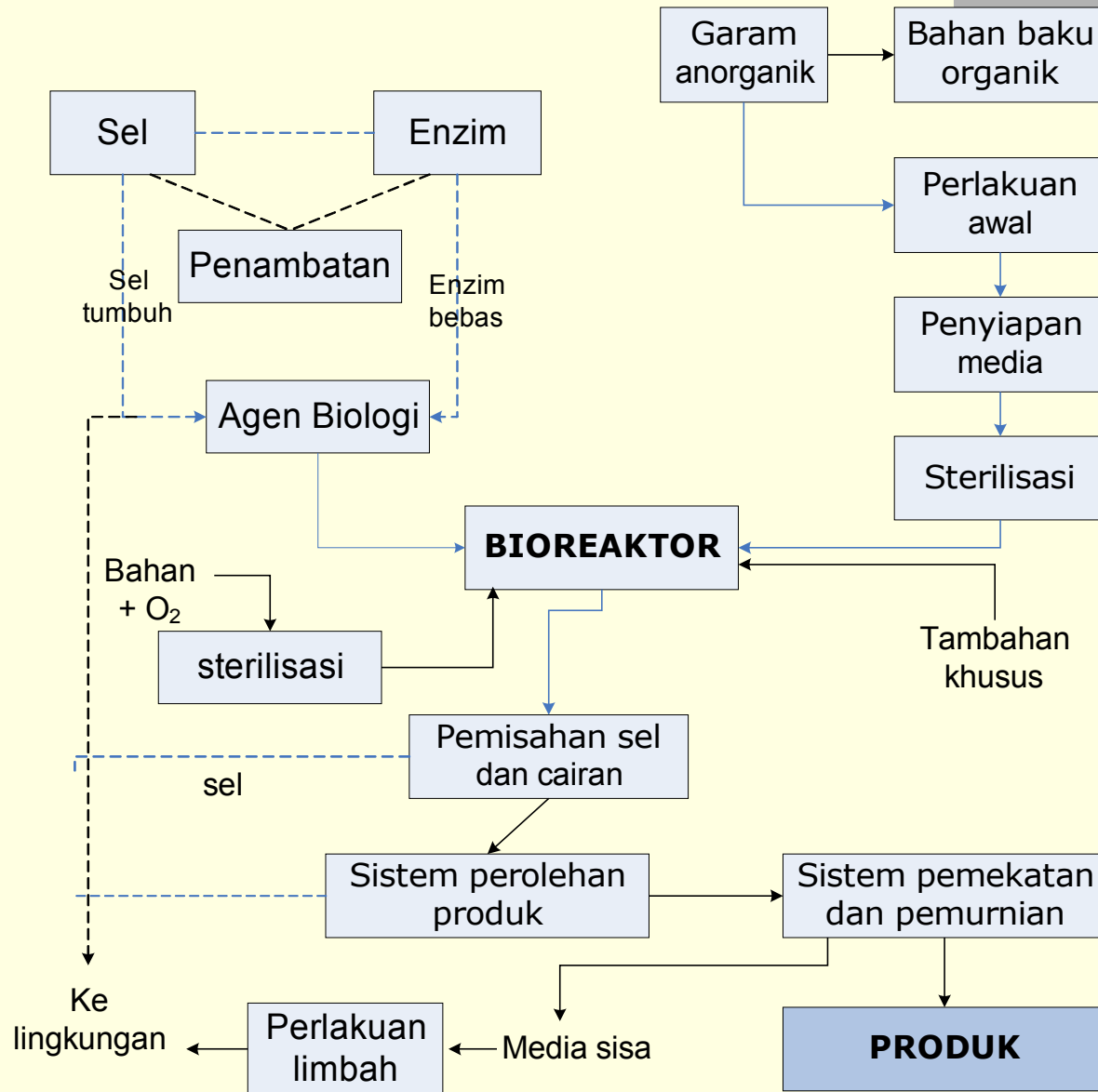
---



# **BAB II**

# **TEKNOLOGI FERMENTASI**

# DIAGRAM ALIR BIOPROSES/FERMENTASI



# TEKNOLOGI FERMENTASI

**FERMENTASI** berasal dari kata :

- *fervere/ferment* (Latin) → yang berarti mendidih

- **Pengertian Awal** (L. PASTEUR)

- *Proses penguraian gula pada buah anggur menjadi gelembung-gelembung udara (CO<sub>2</sub>) oleh khamir yg terdapat dalam cairan ekstrak buah anggur tsb*

- **Pengertian lain**

1. Proses yg menggunakan suatu senyawa (substrat) menjadi senyawa lain (produk) oleh adanya aktivitas mikroba
2. Suatu proses yg menghasilkan energi dg melibatkan molekul organik baik sebagai donor maupun eseptor elektron
3. Suatu proses yg melibatkan kultur mikroba baik yg bersifat aerob maupun anaerob
4. proses pembusukan bahan makanan
5. *suatu kultur mikroba dalam kondisi optimum untuk menghasilkan produk berupa metabolit-metabolit, enzim, atau produk lain (seperti biomassa)*

## **SEL MIKROBA** → *dapat dipandang sebagai*

- model yang representative
- system kimia yang kompleks
- system enzim yang terpadu
- pabrik kimia, dapat dieksploitasi menghasilkan produk unggul(yang diinginkan)
- agen biologis/biokatalis

## ***BEBERAPA FAKTOR PENGEMBANGAN FERMENTASI***

### **Meliputi :**

- ❖ *Penyiapan inokulum sehat → sebagai **biokatalis***
- ❖ *Substrat (bahan baku )*
- ❖ *Sterilisasi : bahan dan alat\**
- ❖ *Proses fermentasi*
- ❖ *Pengendalian proses*
- ❖ *Pemanenan produk:pemisahan, pemekatan, pemurnian*

# BIOKATALIS

## SEL HIDUP

- Mikroba ⇒ “**Mikroba Industri**”
  - Prokariot : bakteri
  - Eukariot : kapang, ragi, ganggang
- Hewan
  - mamalia
  - insekta
- Tumbuhan – tumbuhan ⇒ jaringan
- Komponen sel ⇒ **enzim**

# PENYIAPAN INOKULUM

---

## Cakupan

- *Formulasi media* : komposisi
- *Sel mikroba* : isolasi, karakterisasi, seleksi, dan manipulasi genetik

## Istilah

- *Inokulum*
  - ⇒ bibit/mikroorganisme yang akan segera dipindahkan ke medium produksi setelah diaktifkan.
- *Kultivasi*
  - ⇒ suatu medium kultur pada kondisi tertentu
  - ⇒ pertumbuhan populasi mikroorganisme pada lingkungan buatan



■ **Waktu**

(untuk mengaktifkan mikroba/inokulum)

<i>organisme</i>	<i>waktu</i>
<i>bakteri</i>	<i>20 – 120 menit</i>
<i>jamur dan alga</i>	<i>2 – 6 jam</i>

■ **Konsentrasi Inokulum**

<i>organisme</i>	<i>konsentrasi (%)</i>
<i>bakteri</i>	<i>0,1 – 3,0</i>
<i>actinomyces</i>	<i>5,0 – 10,0</i>
<i>fungi</i>	<i>5,0 – 10,0</i>
<i>suspensi spora</i>	<i>1 – 50.000/L</i>

# Ciri-ciri mikroba industri

---

- Strain harus murni (bebas kontaminan)
- stabil secara genetik → *mempertahankan kemampuan untuk produksi*
- Strain mampu tumbuh cepat dan kuat pada media fermentasi.
- Berada dalam bentuk morfologis yang cocok
- Strain mampu menghasilkan produk yang diinginkan dalam jangka waktu pendek, tanpa menghasilkan produk yang beracun.
- Produk yang dihasilkan mudah untuk dipisahkan
- Strain dapat disimpan dalam waktu yang lama

→ *Cara-cara pengawetan mikroba ?*

# Sumber-sumber

---

- Alam, tanah, lumpur, limbah, makanan dsb
- Pusat Koleksi kultur
  - *ATCC (American Type Culture Center)*
- Laboratorium Mikrobiologi
  - *UICC*

# ***BAHAN BAKU FERMENTASI***

---

- **Bahan baku utama (sumber energi/karbon)**
  - fasa gas, cair atau padat
  - mengandung gula dasar, pati atau lignoselulosa
  - terdefinisi, ramuan kompleks atau limbah
- **Nutrisi**
  - sumber nitrogen dan mineral
  - vitamin
  - factor pertumbuhan
- **Air dan udara**
  - air steril untuk pelarutan/pengenceran
  - udara/oksigen steril
- **Bahan persyaratan proses**
  - induser
  - inhibitor
  - stabilisator
  - antibusa
  - pengatur pH

# PROSES FERMENTASI

---

## PENGGOLONGAN BERDASARKAN CARA OPERASI

### A. Fermentasi cair

1. *Submerged fermentation* (fermentasi bawah permukaan), dapat dibagi menjadi 3 macam :

- **Batch process**

fermentasi dengan cara memasukkan media dan inokulum secara bersamaan ke dalam bioreactor dan pengambilan produk dilakukan pada akhir fermentasi.

*Pada system batch*, bahan media dan inokulum dalam waktu yang hampir bersamaan dimasukkan ke dalam bioreaktor. Dan pada saat proses berlangsung akan terjadi perubahan kondisi dalam bioreactor (*nutrient akan berkurang dan produk serta limbah*

■ **Fed-batch (gabungan sistem batch dg kontinnyu)**

memasukkan sebag sumber nutrisi (sumber C, N dll) ke dalam bioreactor dengan volume tertentu hingga diperoleh produk yang mendekati maksimal, akan tetapi konsentrasi sumber nutrisi dibuat konstan.

*Mis. nutrient dialirkan dengan laju tertentu setelah laju pertumbuhan sel maks (tanpa produk diambil)*

■ **Continuous process (proses sinambung/kontinyu)**

pengaliran substrat dan pengambilan produk dilakukan secara terus menerus (sinambung) setiap saat setelah diperoleh konsentrasi produk maks atau substrat pembatasnya mencapai konsentrasi yang hampir tetap.

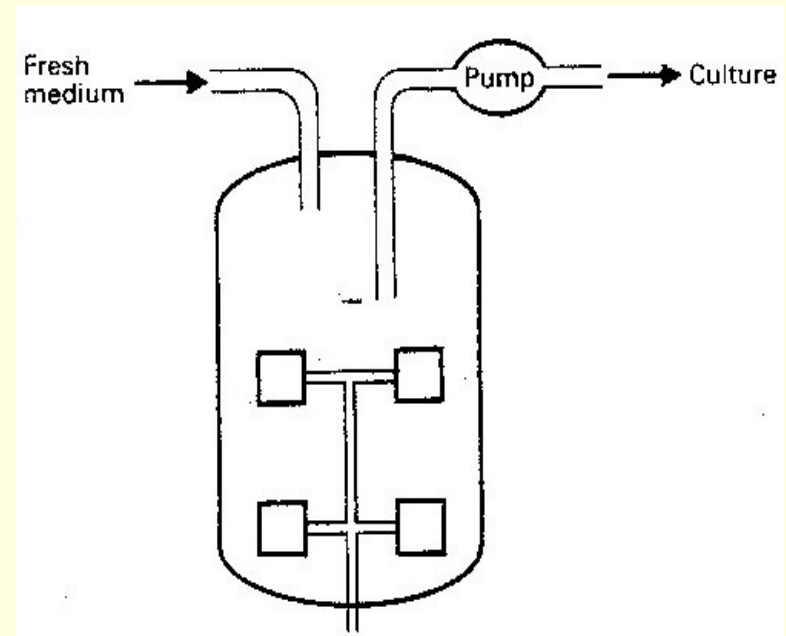
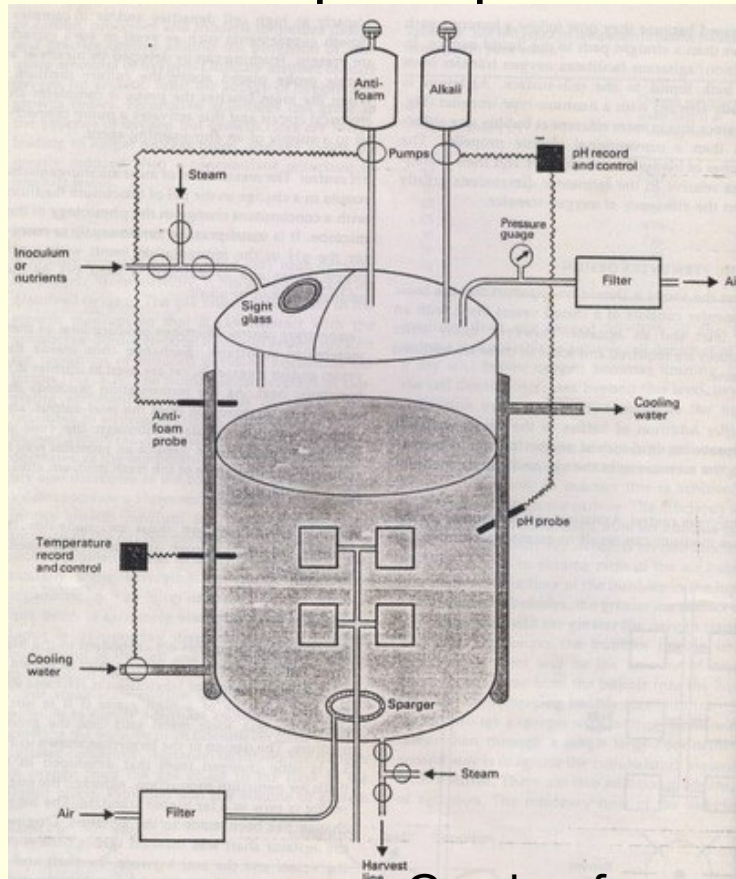
*⇒ substrat dan inokulum dapat ditambahkan bersama-sama secara terus menerus ⇒ sehingga fase eksponensial dapat diperpanjang*

*⇒ cocok untuk produk biomassa atau metabolit (etanol) yang disintesis sec proporsional (berbanding lurus dengan jumlah sel)*

I. *Surface fermentation* (fermentasi permukaan), →  
misal pada pembuatan *nata de coco*

B. Solid State Fermentation/ fermentasi padat

■ misal pada pembuatan tape, oncom, koji dll.



Gambar fermentor dengan *system continuous*

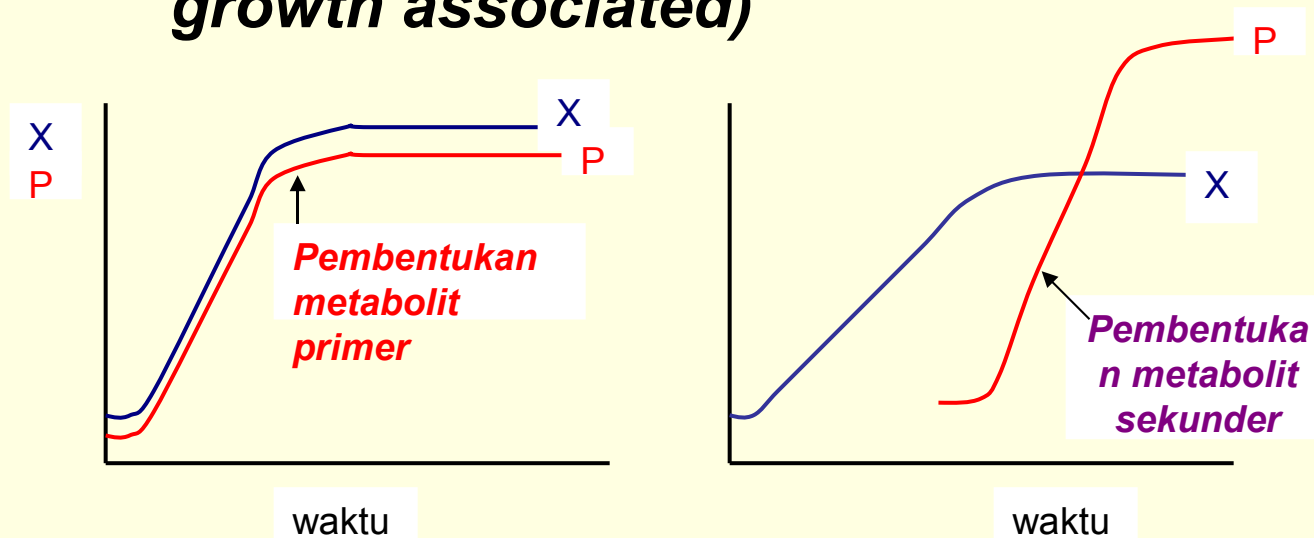
# PENGGOLONGAN PRODUKSI FERMENTASI

---

- *BERDASARKAN LETAK PRODUKSI*
  - produk intraseluler
  - produk ekstraseluler
- *BERDASARKAN PERAN DALAM METABOLISME*
  - metabolit primer
  - metabolit sekunder

## ■ BERDASARKAN WAKTU PRODUKSI

- diproduksi bersamaan dengan pertumbuhan (***growth associated***)
- diproduksi pada saat pertumbuhan stasioner (***non-growth associated***)



### Keterangan:

X = pertumbuhan

P = Produk:

-metabolit primer (*growth associated*)

-metabolit sekunder (*non-growth associated*)

## **BERDASARKAN VOLUME PRODUKSI & NILAI JUAL**

- - Volume besar nilai rendah
- - Volume besar nilai menengah
- - Volume kecil nilai tinggi

## **BERDASARKAN SEKTOR AKTIVITAS**

### ■ Perawatan Kesehatan

- Antibiotik
- Vaksin
- interferron
- Hormone
- Obat-obatan khusus

### ■ Bahan kimia

- Vitamin
- pelarut organic
- pati dan turunannya
- asam amino
- enzim

### ■ Bahan Kimia Pertanian

- pestisida
- herbisida
- fungisida

### ■ Makanan & minuman

- alcohol
- Pemanis
- PST (protein sel tunggal)
- zat pewarna

**BB III**  
**PRODUK FERMENTASI & STRATEGI OVER-  
PRODUCTION**

# PRODUK TEKNOLOGI FERMENTASI KOMERSIL

## 1. Fermentasi dengan produk **BIOMASSA** (sel mikroba)

*contoh :*

- *SCP (Spirulina, Sarcocolla)*
- *spora Penicillium roquefortii (keju)*
- *Rhizobium sp. (simbiosis dg tan Leguminoceae)*
- *Bakteri asam laktat (yoghurt)*
- *B. thuringensis (kristal protein → insektisida)*

## 1. Fermentasi dengan produk **ENZIM** mikroba

*contoh : amylase, protease, pektinase, peroksidase, glukooksidase dll.*

Produksi enzim oleh sel mikroba dpt ditingkatkan dg cara modifikasi pengendalian kondisi lingkungan (*mis, pemberian induser pada kultur*)

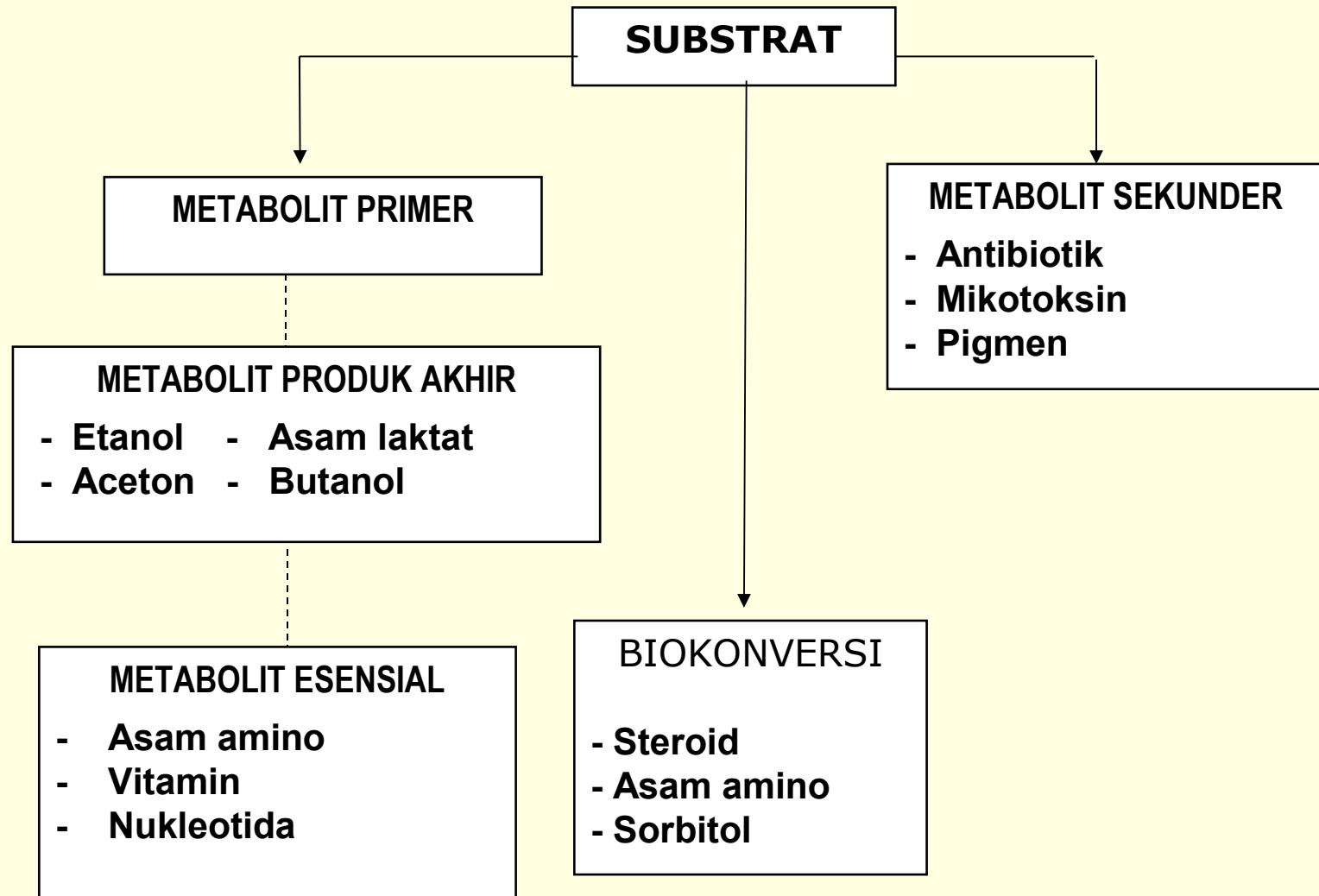
### **Enzim mikroba dapat dibedakan atas :**

- enzim ekstrasel
- enzim intrasel
- enzim konstitutif
- enzim induktif

1. Fermentasi dengan produk **METABOLIT** mikroba
  - ***metabolit primer***, senyawa antara yg disintesis oleh aktivitas sel pd fase pertumbuhan (***trofofase***)
  - ***metabolit sekunder***, senyawa yang disintesis sel setelah fase pertumbuhan (***iodofase***)
2. Fermentasi dengan produk hasil **BIOKONVERSI** melalui modifikasi suatu senyawa yg ditambahkan ke dalam medium fermentasi untuk menghasilkan senyawa lain.

*Contoh : progesterone → 11-  $\alpha$  hidroksiprogesterone*

# KELOMPOK METABOLIT YANG DISINTESIS OLEH MIKROBA



# Metabolit primer esensial

---

- disintesis oleh mikroba karena sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan sel
- ada beberapa senyawa diantaranya dengan nilai ekonomi tinggi
- secara alamiah disintesis dalam jumlah yang efisien (hanya cukup untuk pertumbuhan/tidak *overproduction*)  
→ ***mengapa demikian???***

# STRATEGI OVER PRODUKSI METABOLIT

---

→ dapat dilakukan dg beberapa cara :

- **menghilangkan kompetisi reaksi biokimia atau**
- **mengatasi mekanisme pengendalian metabolisme**

→ MEKANISME PENGENDALIAN METABOLIK dalam SEL dapat dilaksanakan melalui cara :

- *Feedback inhibition* terhadap **aktivitas enzim kunci** (***enzim allosterik***) oleh senyawa produk akhir dalam suatu jalur biosintesis
- *Represi* terhadap **sintesis enzim** dari jalur tertentu oleh produk akhir

# Beberapa cara membuat overproduksi metabolit

## 1. Strain improvement (*mutagenesis*)

Contoh: **overproduksi threonin oleh *E.coli***

*E.coli* (*wild type*) secara alamiah dapat memproduksi metabolit primer (threonin) → *dilakukan mutasi dan diperoleh 3 mutan*

### ■ Mutan 1

dengan enzim homoserin dehidrogenase yang tidak sensitive terhadap *efek feedback inhibition* oleh threonin → *dapat mengekskresi threonin 1,9 g/L*

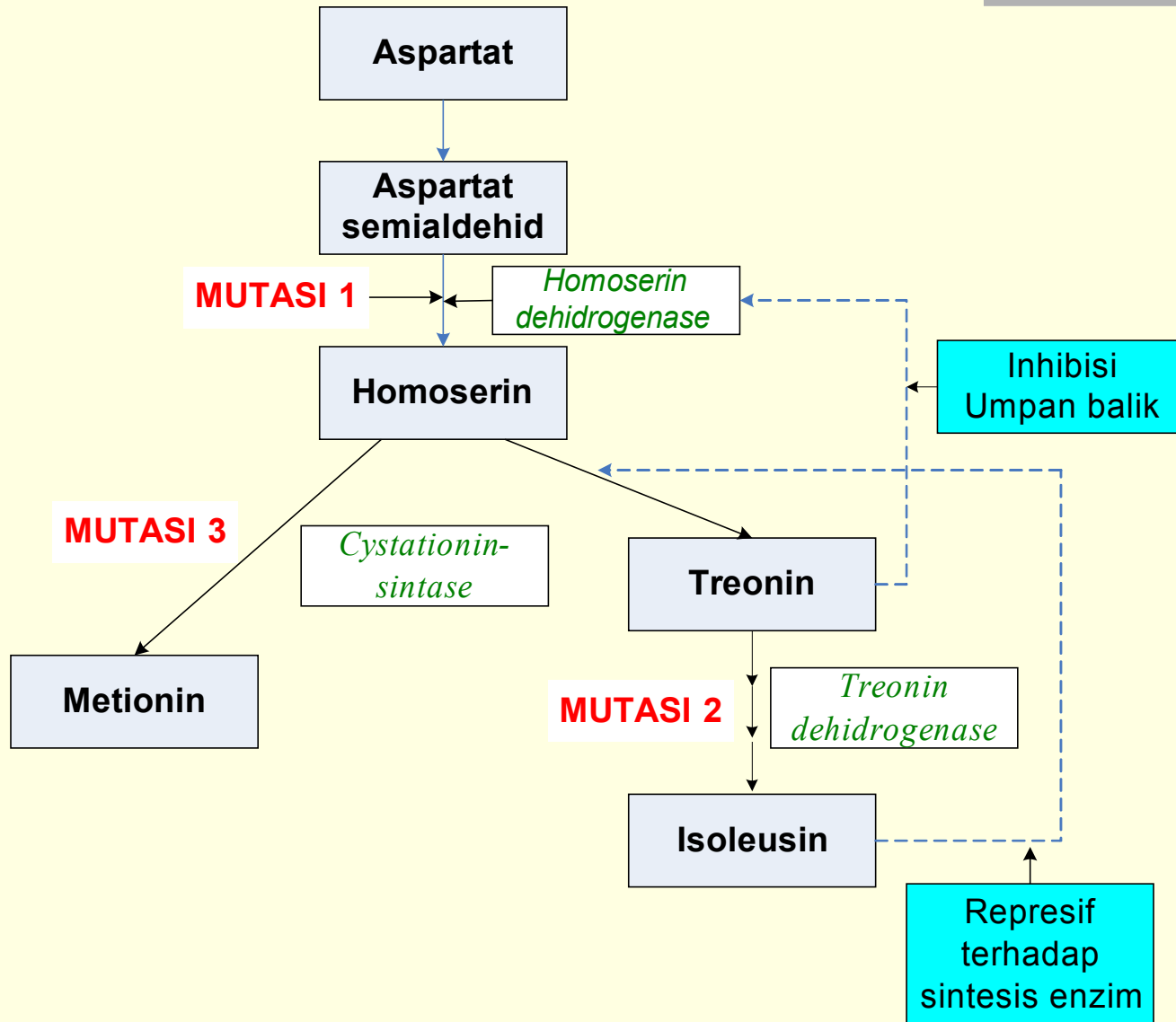
### ■ Mutan 2

tidak dpt mengubah threonin menjadi isoleusin, karena menghasilkan isoleusin dgn konsentrasi yang tidak cukup kuat untuk merepresi sintesis enzim pengubah homoserin menjadi threonin dan isoleusin → *dapat mengekskresi threonin 4,7 g/L*

### ■ Mutan 3 (mutasi strain mutan 2)

strain yg membutuhkan methionin dan isoleusin untuk pertumbuhannya → *mengekskresi threonin 6 g/L*

# Strain improvement (*mutagenesis*) Over Produksi Treonin oleh mutan *E.coli*



- **Mengubah permeabilitas membrane sitoplasma**, sehingga produk yg diinginkan akan dikeluarkan terus ke luar sel

contoh : *Corynebacterium glutamicum* → dapat memproduksi asam glutamat 90 g/L dalam medium yg kekurangan biotin (dibutuhkan u/ integritas membrane sel)

- **Rekayasa proses fermentasi** → **scale up**

Inokulum/organisme penghasil produk dikultur dalam satu seri fermentor dengan volume/ukuran yg ditingkatkan, seperti gambar di bawah ini

- **Teknologi DNA rekombinan**

Dengan melakukan kloning gen yang diinginkan ke dalam sel transforman.

# PRODUK HASIL DNA REKOMBINAN

---

Dalam Bioteknologi digunakan suatu metode yang secara genetik (dikenal dengan DNA RECOMBINANT)  $\Rightarrow$  organisme/bakteri dimanipulasi menjadi organisme yg membawa sifat kombinasi baru (*novel-combination*) sehingga dapat membuat produk-produk yang sebelumnya tidak pernah secara alami dibuat

Contoh :

- bakteri dapat menjadi produsen produk yang bernilai tinggi (*humulin*  $\Rightarrow$  hormone dari manusia)  $\Rightarrow$  *untuk treatment diabetes*

- dari kultur *E.coli* hasil rekayasa (2L) ⇒ dapat di produksi **somatostatin** (hormone pertumbuhan) yang jumlahnya setara dengan yang dihasilkan dari 100 otak kambing/cadaver

- Produksi vaksin bakteri

Vaksin konvensional ⇒ menggunakan kuman yang sudah dimatikan harus diberikan dengan disuntikkan secara berulang-ulang dan periodik.

Vaksin dengan bakteri hidup yang dilemahkan, daya proteksinya lebih lama.

Sekarang vaksin kolera berisi *Vibrio cholera* yang dilemahkan dengan menghilangkan bagian gen penghasil enterotoksin ⇒ menggunakan teknologi DNA rekombinan

# REGULASI EKSPRESI GEN

---

- **Induksi** dan **repressi** merupakan metode regulasi **sintesis enzim** dengan mengontrol proses transkripsi mRNA pd gen-gen pengendali (*operon*) sebagai respon terhadap **pengaruh konsentrasi substrat dan produk**
  - **Operon** → segmen/bagian/kelompok gen-gen pd kromosom sel bakteri yang terdiri atas rangkaian :
    - ❑ gen struktural (S): gen yg berhubungan langsung dg sintesis protein dgn fungsi tertentu (enzim)
    - ❑ gen regulator (R) : gen yg mengkode protein repressor yang dapat berikatan dgn gen operator
    - ❑ gen operator (O) : gen yg mengontrol fs gen struktural

# Induksi Operon

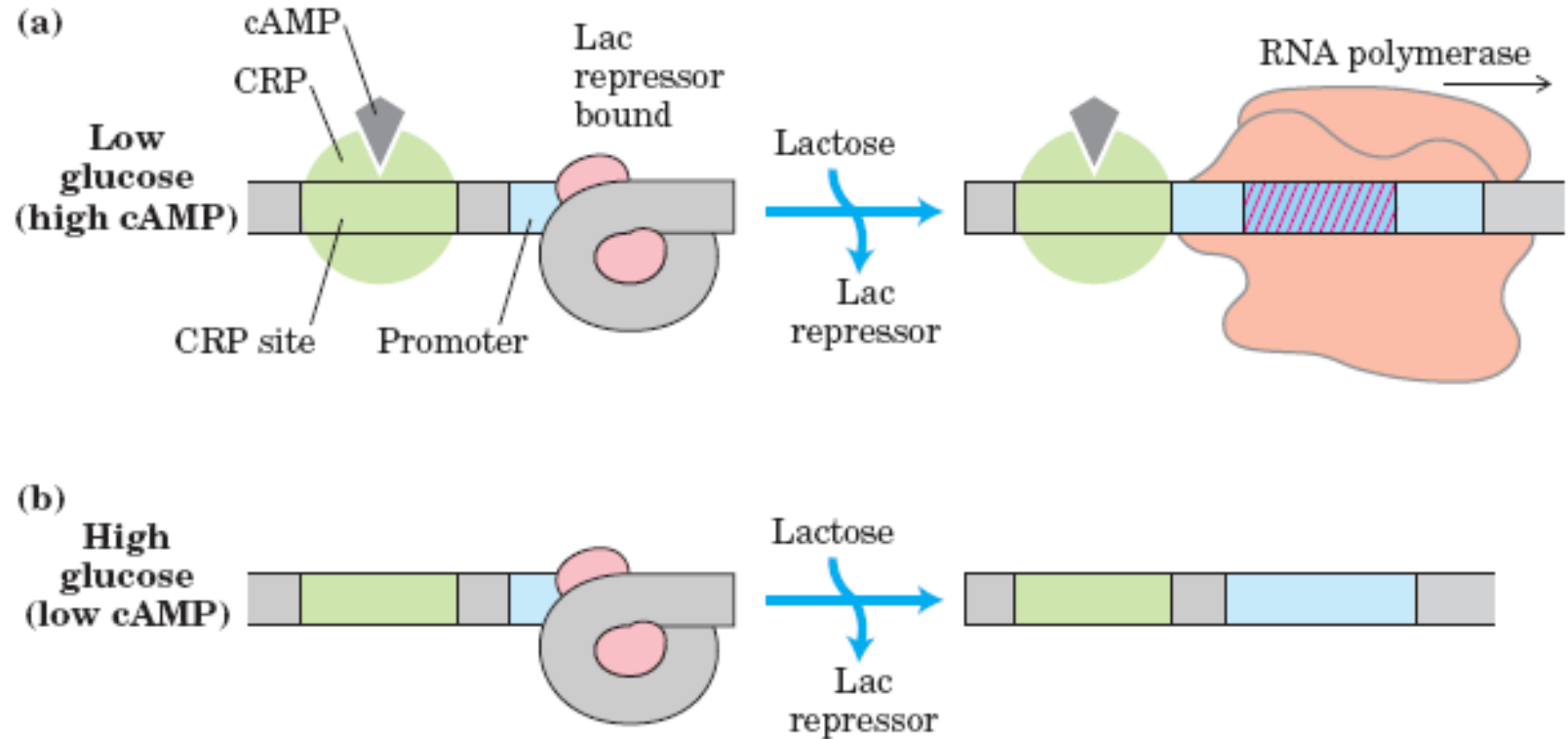
---

- Untuk beberapa jalur katabolik, sebelum enzim-enzimnya disintesis → substrat harus sudah tersedia (*induser*).
  - Bila induser tidak tersedia :  
protein repressor akan mengikat gen O → sintesis enzim diblokir
  - Bila induser tersedia :  
operon akan terinduksi karena protein repressor menjadi tidak aktif → protein tertentu disintesis → disebut **enzim induktif**

## Pertanyaan

- *Enzim apa yg akan muncul pada saat E.coli sedang tumbuh dalam medium yang berisi campuran laktosa dan glukosa (jelaskan dalam bentuk kurva) ??*

# REGULASI LAC OPERON



# REPRESI KATABOLIT

---

## ■ Pada *E. coli*

- enzim untuk metabolisme laktosa bersifat *induktif*
- enzim untuk metabolisme glukosa bersifat *konstitutif* (*enzim yg selalu disintesis baik ada maupun tanpa induser*)

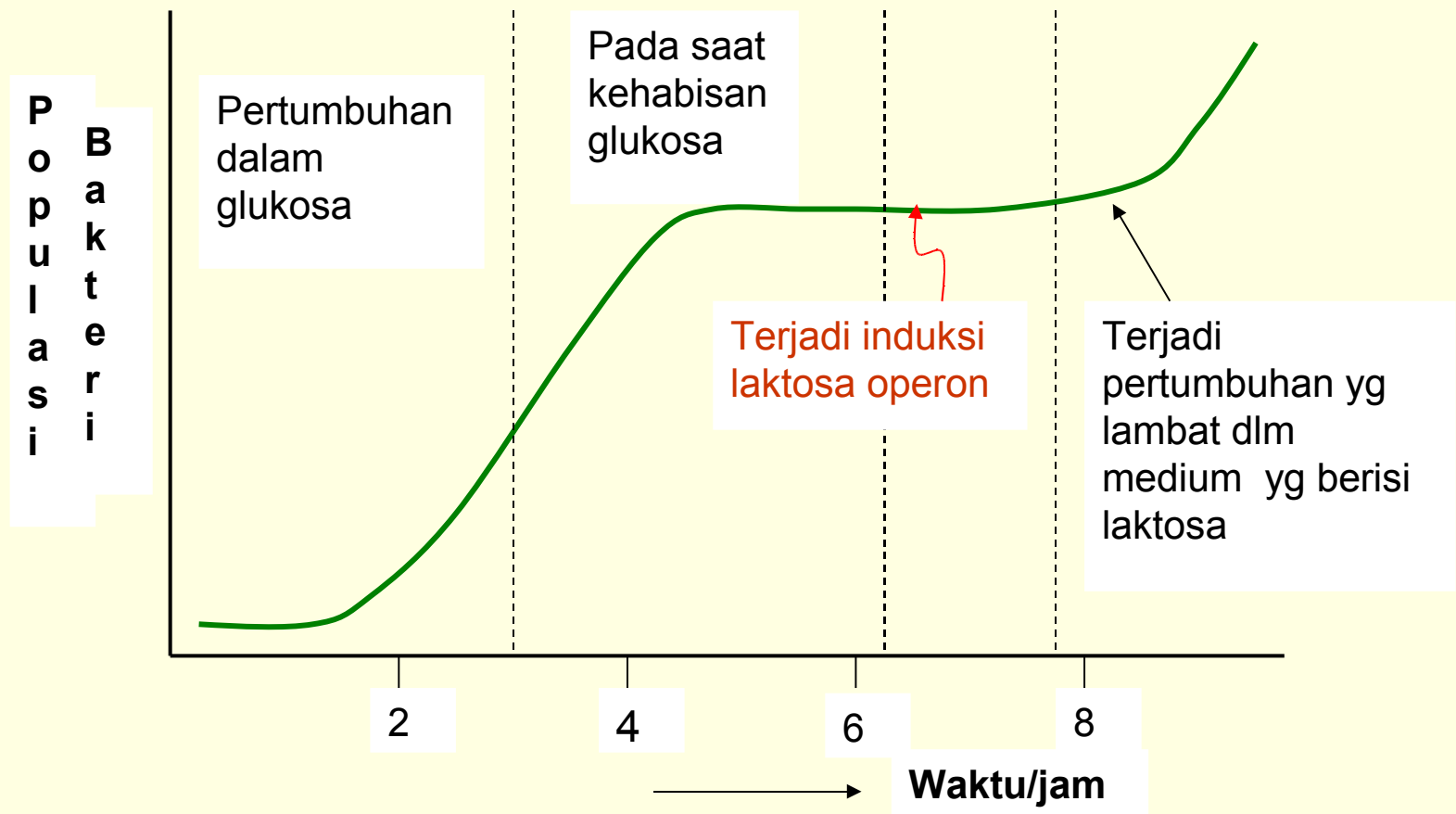
Mula-mula bakteri akan menggunakan glukosa, beberapa jam kemudian setelah glukosa habis, enzim-enzim pemecah laktosa akan disintesis.

DPL : Selama ada glukosa, meskipun terdapat induser (laktosa), maka *lac-operon* tidak diaktifkan → fenomena ini disebut represi katabolit.

- ## ■ **Represi katabolit bagi bakteri merupakan proses untuk menghemat energi**

## Pertanyaan :

- *Mengapa sel lebih suka menggunakan glukosa dari pada laktosa?*



**Kurva pertumbuhan E.coli dalam campuran glukosa dan laktosa**

# **BAB IV**

## **STUDI TENTANG DNA**

# MATERI GENETIK

---

✓ **Senyawa kimia apa yg berperan sebagai pembawa sifat genetika ?**

→ *bukti DNA sbg senyawa kimia pembawa sifat genetik* →  
*melalui percobaan* : - FRED GRIFFITH (1928)

- AVERY & Mc CARTY (1944)

- HERSHEY et.al. (1952)

✓ **Bagaimana struktur kimia DNA mampu mengemban fungsi genetik ?**

→ terungkap (1953) oleh: J. WATSON (ahli genetika) dan  
F. CRICK (ahli fisika)

- Bagaimana urutan nukleotida (hanya ada 4) dapat memberikan informasi yg bermakna bagi suatu **sel**?
- Jawaban → *Sifat GEN*
  - **Gen** → bagian /segmen dari molekul DNA yg berperan sebagai pembawa informasi/pesan genetika
  - **Informasi genetika** → berupa sandi/kode yang tersimpan dalam bentuk urut-urutan nukleotida
  - **Ekspresi/produk akhir** pesan genetika → berupa

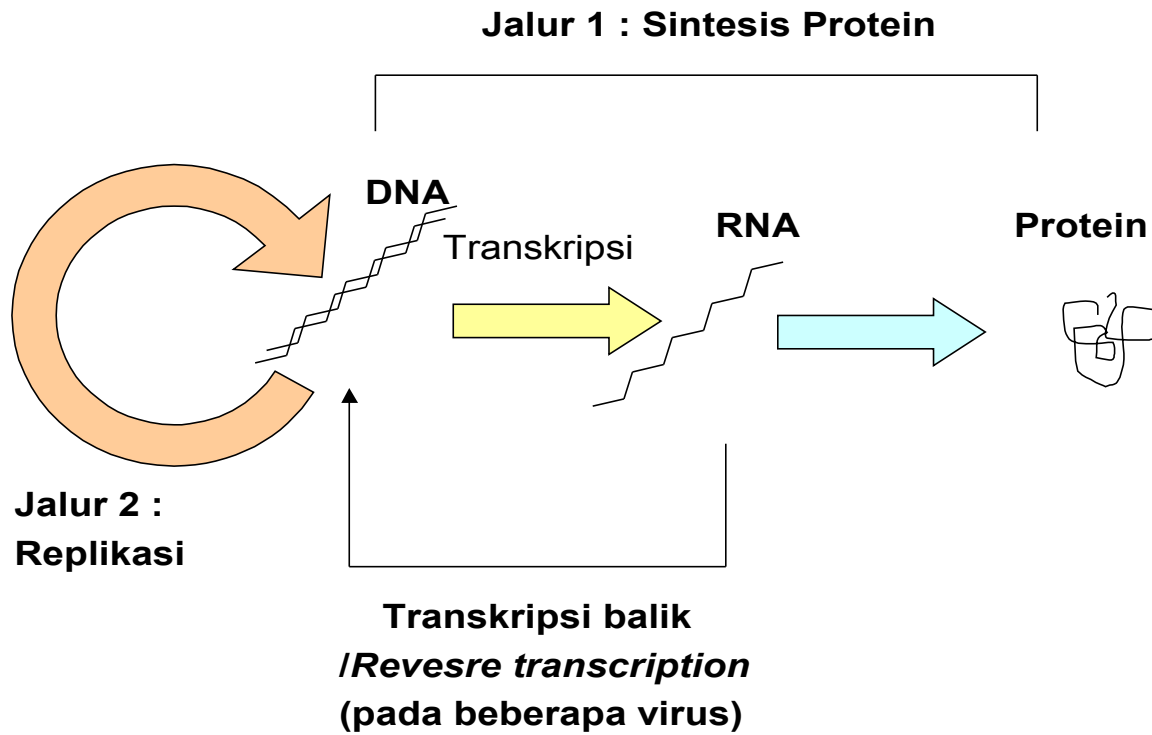
**Genom** → *pembentukan molekul protein*  
→ jumlah total (keseluruhan) khromosom dalam inti yang berisi semua informasi genetik dari suatu sel/organisme

1 sel manusia → berisi 3.3 milyar pb (23 pasang khromosom)

1 sel sapi → berisi 30 ps khromosom

1 sel *E.coli* → berisi 1 ps khromosom

# ALIRAN INFORMASI GENETIK

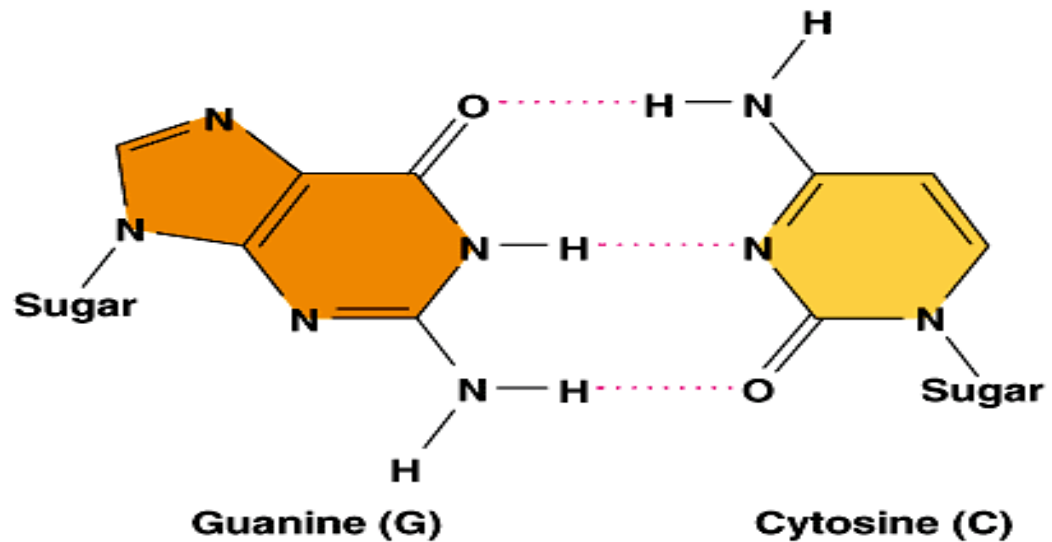
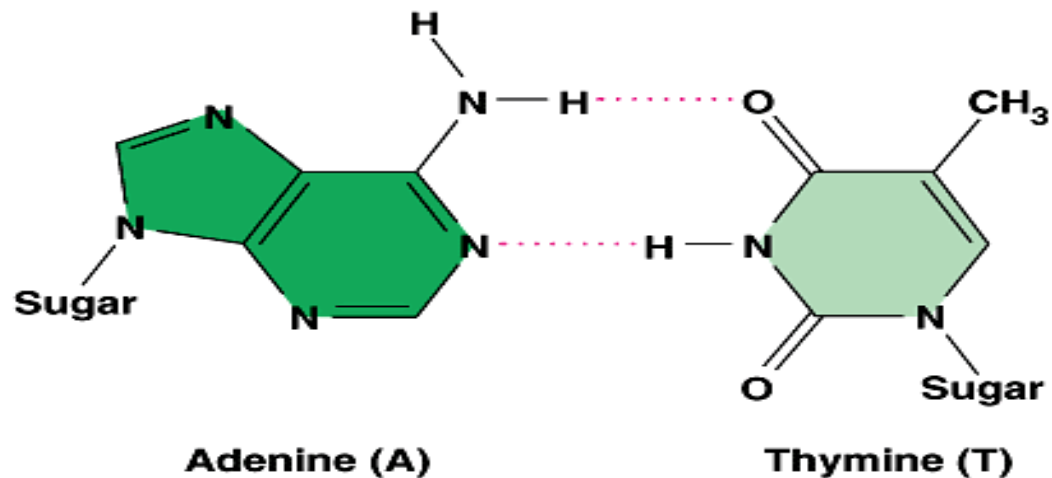


# STRUKTUR DNA (Watson & Crick)

---

- ✓ tda 2 rantai DNA yg saling berpasangan membentuk tangga melingkar → *double helix putar kanan*
- ✓ basa-basa nukleotida pd rantai satu berpasangan dg basa pd rantai yg lain → *pasangan basa komplement*
  - **A dengan T melalui 2 ikatan hidrogen**
  - **G dengan C melalui 3 ikatan hidrogen**
- ✓ satu kali putaran helix tda 10 unit nukleotida /base pair (panjangnya =  $34 \text{ \AA} = 3,4 \text{ nm}$  & diameter helix =  $20 \text{ \AA}$ )
- ✓ Ukuran (satuan) DNA → pasang basa

# PEMBENTUKAN IKATAN HIDROGEN



# TEKNIK ISOLASI & KARAKTERISASI DNA

## 1. Isolasi dan Pemurnian DNA meliputi :

- sumber DNA (*mikroba, virus, tumbuhan, hewan dsb*)
- pemecahan sel
- pemisahan (*DNA inti dari DNA mitokondria*)
- pengendapan DNA
- pemurnian (elektroforesis)

# TEKNIK ISOLASI & KARAKTERISASI DNA

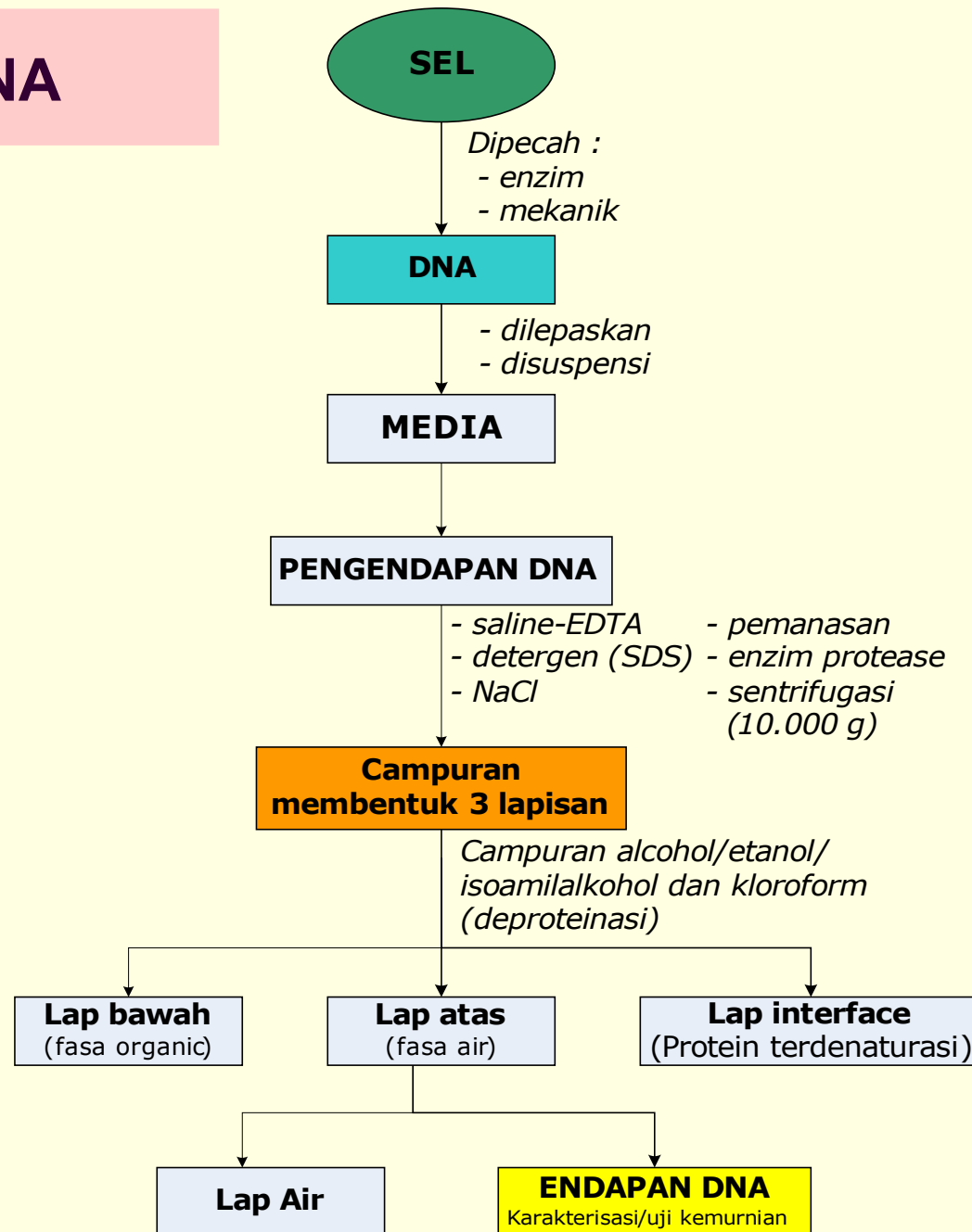
## 1. Karakterisasi

- elektroforesis (gel agarosa atau gel poliakrilamid)
- kuantisasi/amplifikasi DNA
- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*)
- *Southern Blotting, Northern Blotting*
- **sequencing basa DNA**

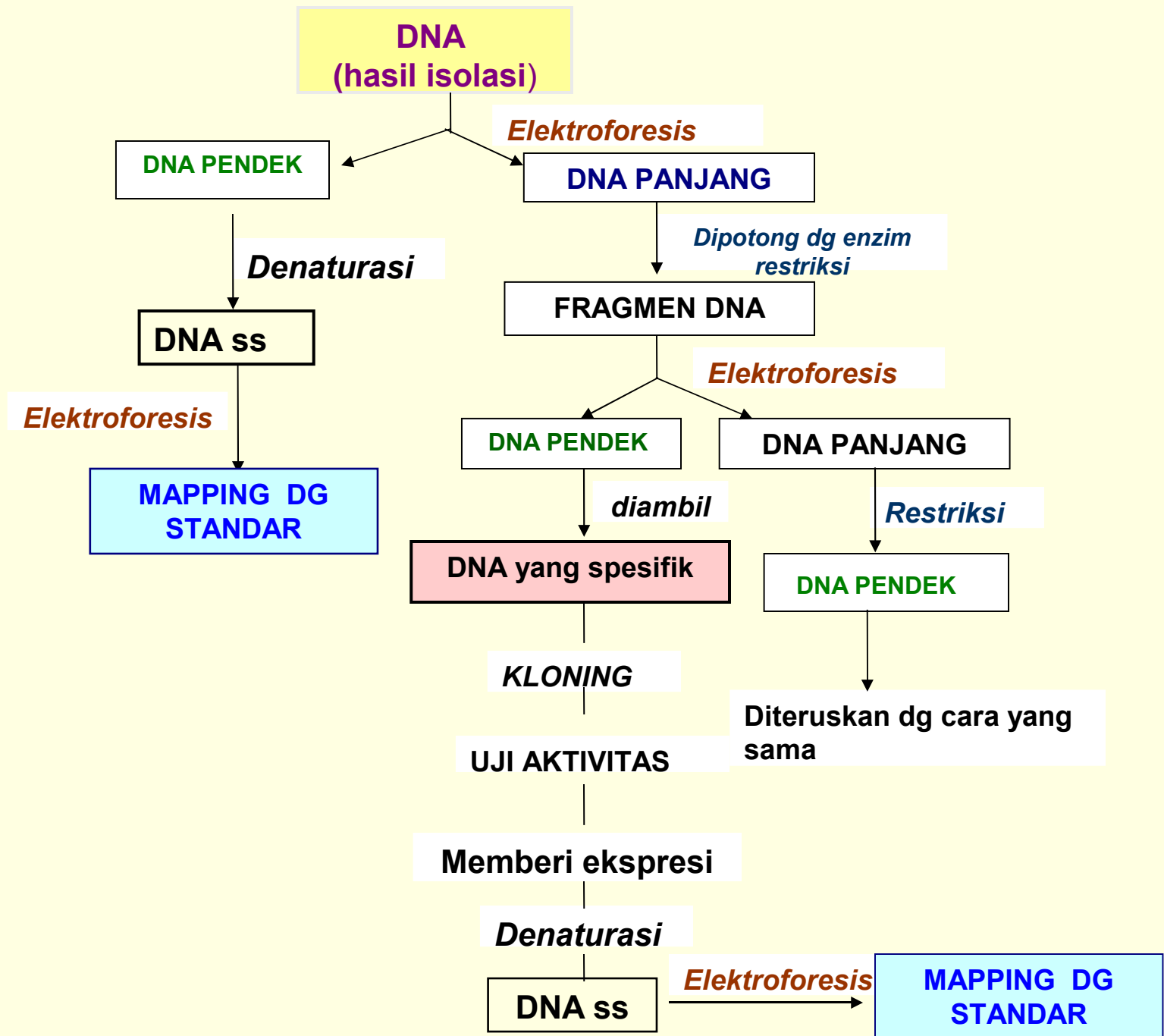
## 2. Rekayasa

- *cloning in vivo (rekayasa genetik) /in vitro (PCR)*
- *screening* :
  - *genomic library*
  - *cDNA library*

# ISOLASI DNA



K  
A  
R  
A  
K  
T  
E  
R  
I  
S  
A  
S  
I  
D  
N  
A



# KARAKTERISASI DNA

- Pengukuran dengan UV spektrofotometer :  
ditentukan nilai relatif kemurnian DNA  $\rightarrow \frac{A_{260}}{A_{280}}$   
 $A_{260}$  serapan untuk DNA dan  $A_{280}$  serapan protein  
jika perbandingannya  $< 1,9 \rightarrow$  kontaminan protein tinggi
- penentuan nilai  $T_M$  = temperatur melting
- Pemisahan molekul **Elektroforesis**
  - **Gel Agarosa**
  - **Gel Polyacrilamid**

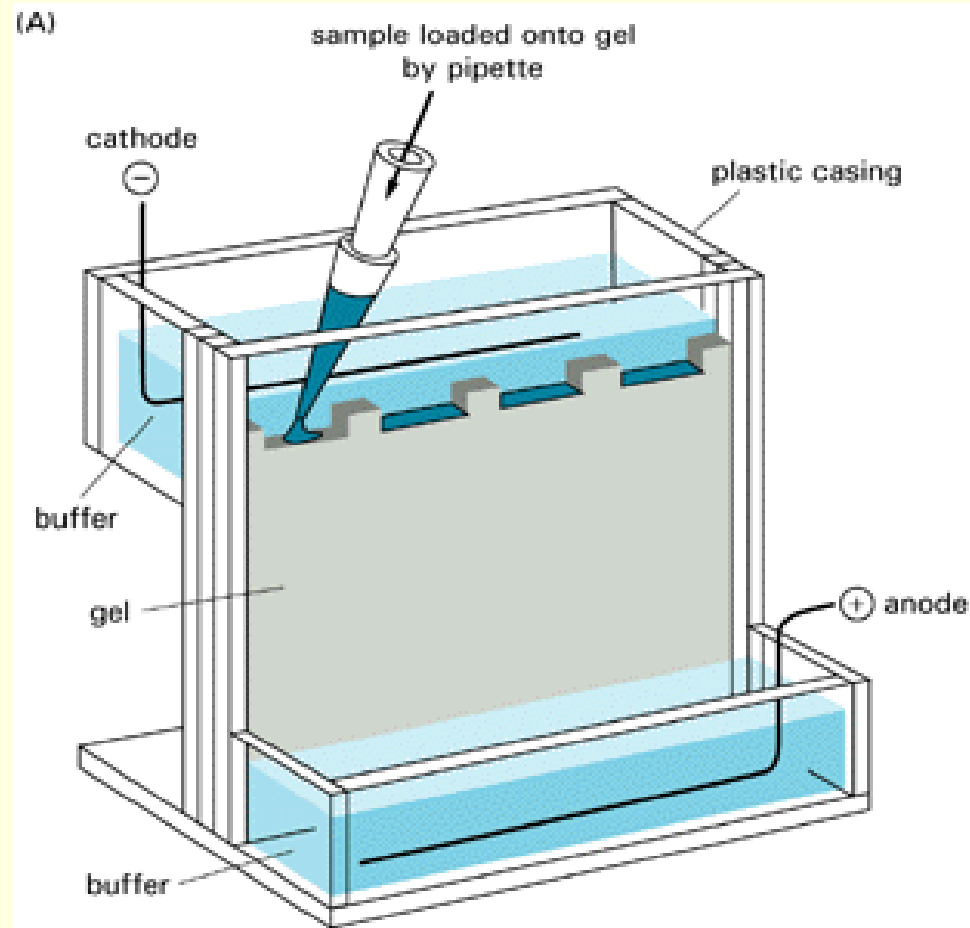
# ELEKTROFORESIS

- ❑ Suatu cara pemisahan molekul DNA (protein) berdasarkan kecepatan migrasi di dalam suatu medan listrik yg disebabkan oleh adanya perbedaan muatan dan ukuran molekul
- ❑ DNA akan bergerak ke arah anoda dan molekul dengan ukuran paling kecil akan bergerak paling jauh/cepat
- ❑ DNA yg sederhana akan memberikan pita-pita/**band** yang terpisah
- ❑ **Band** yg berisi fragment yang diinginkan dapat diketahui/ dilacak (**mapping**) dg metode **southern blotting** menggunakan **DNA-probe**\*) lalu band tsb diisolasi

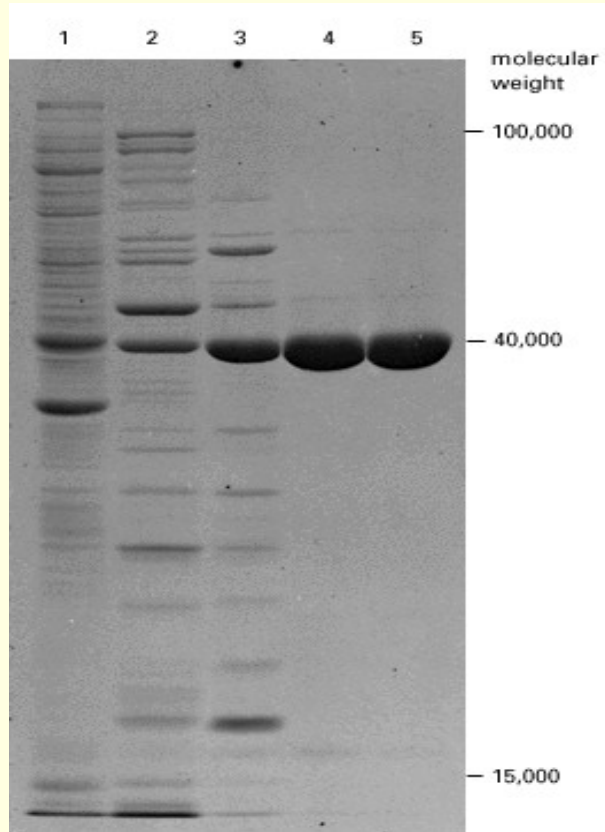
\*) **DNA-probe** adalah DNA s.s yg sudah dilabel dg radio isotop ( $^{32}\text{P}$ ) yg dapat berhibridisasi dengan fragmen DNA yang komplemen yang dapat di deteksi dg cara **autoradiografi**

# KARAKTERISASI DNA

## ☞ SDS PAGE (*polyacrilamid gel electrophoresis*)



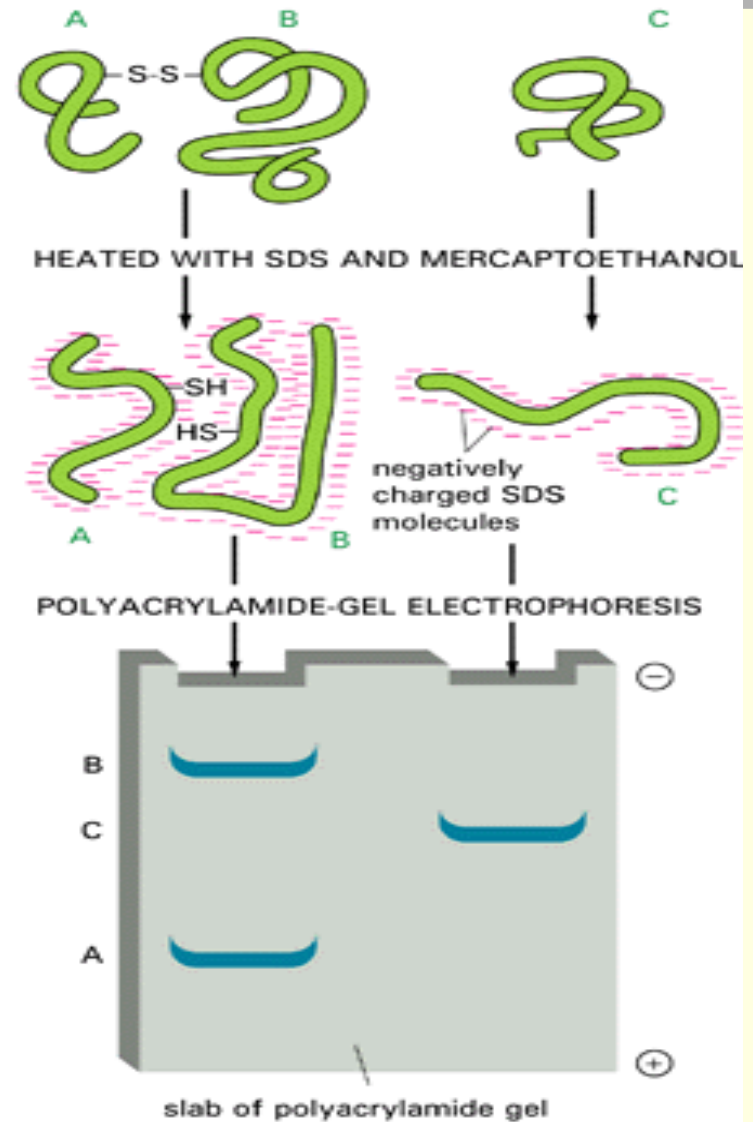
# Hasil Gel SDS-PAGE



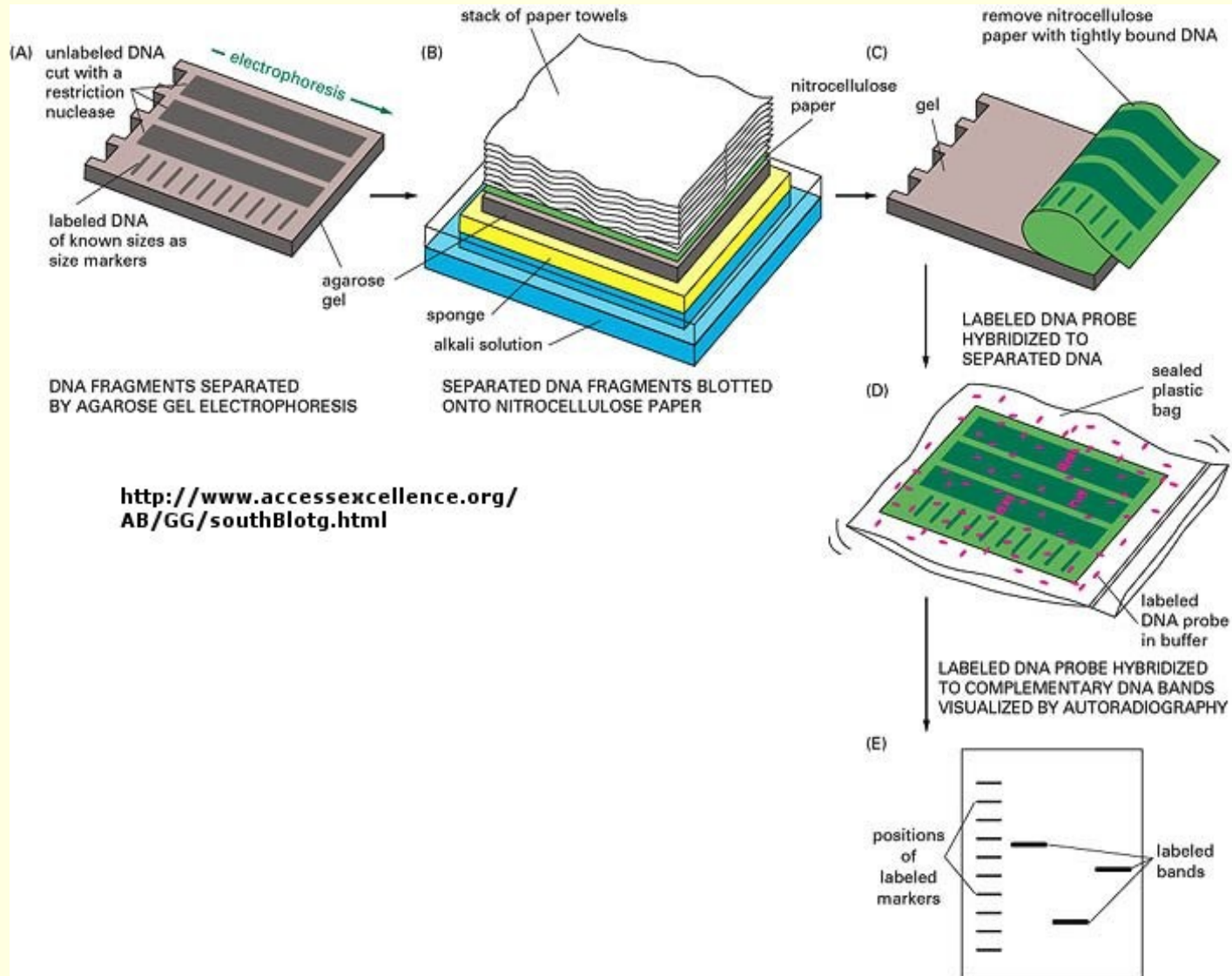
(B)

protein with two subunits, A and B, joined by a disulfide bridge

single subunit protein



# SOUTHERN BLOTTING



<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/southBlotg.html>

# SOUTHERN BLOTTING

---

- Teknik ini dikembangkan oleh SOUTHERN (1975)

Contoh penggunaan metode ini adalah :

Untuk menentukan apakah **gen tertentu** yang diisolasi dari suatu organisme (*misal: gen Penisilin asilase dari B. subtilis*) terdapat dalam bentuk yang sama dengan yang terdapat dalam organisme lain, *misal B. megaterium*

- **Teknik lain, seperti :**
  - NORTHERN BLOTTING → **RNA**
  - WESTERN BLOTTING → **Protein**

# Tahap-tahapan dalam SOUTHERN BLOTTING

---

- Isolasi DNA kromosom (mis, *B. megaterium*)
- DNA dipotong → fragmen-fragmen
- Fragmen dipisahkan dengan elektroforesis (gel agarosa)
- Fragmen DNA → denaturasi (alkali) → DNA s.s.
- Gel agarosa dijiplak pada kertas nitroselulosa
- Fragmen pada kertas difiksasi (pemanasan 80°C)
- Kertas direndam dlm larutan yg berisi *probe DNA ss\** (*diberi radioisotop*)
- Jika komplemen → DNA probe akan berhibridisasi dg DNA s.s pd kertas nitroselulosa

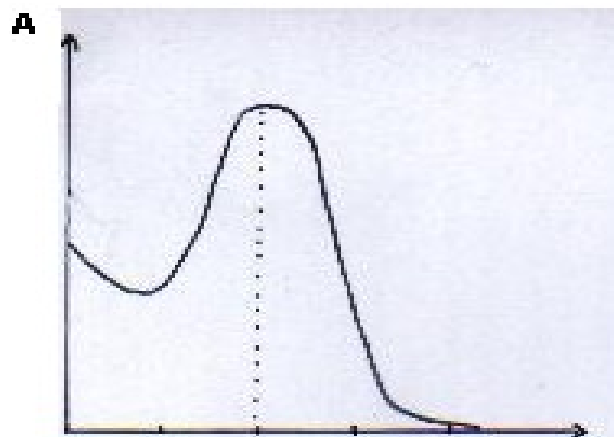
## Lanjutan SOUTHERN BLOTTING

- Kertas diletakkan pd *plat autoradiografi* → untuk melihat posisi probe yang komplemen
- Dengan membandingkan hasil audiografi terhadap gel agarosa asli → maka fragmen mana yg merupakan gen pembawa kode untuk enzim *penicillin asilase* dapat diketahui dg tepat.
- Selanjutnya fragmen dari gel tsb dapat diisolasi.

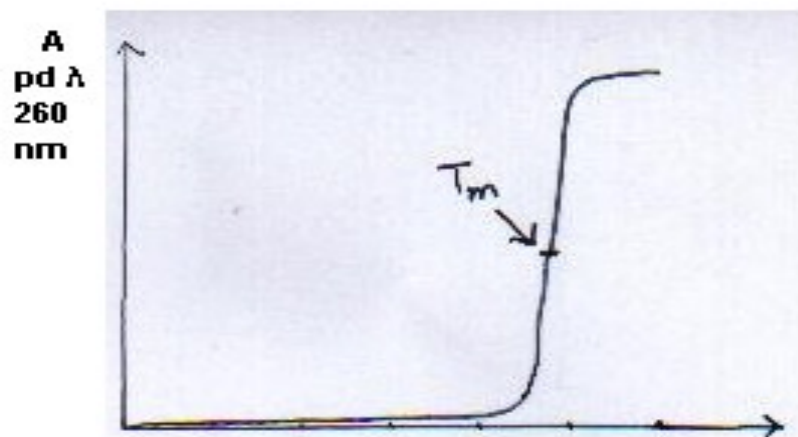
*\*) misal digunakan DNA probe yang berasal dari gen murni pengkode enzim Penicillin asilase (B. subtilis)*

# PENGARUH TEMPERATUR PADA DNA

- **temperatur** naik, DNA akan terdenaturasi (DNA *melt*) → menjadi komponen rantainya (*unwinding*)
- denaturasi DNA dapat diikuti dg mengamati perubahan nilai **absorbansi** DNA pada  $\lambda 260$  nm (maksimum)
- **T<sub>m</sub>** (*Melting Temperature*) → temperatur pada saat tercapainya setengah dari perubahan absorbansi DNA
- T<sub>m</sub> digunakan untuk karakterisasi DNA (berbagai sumber)



Spektrum Absorbansi DNA  $\lambda$  (nm)



Termal Denaturasi DNA T (oC)

# TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

---

## KONSEP :

- Penggabungan *gen-gen* dg *vektor* → molekul DNA rekombinan
- Molekul tsb lalu di klon (propagasi) ke dalam sel *host* (*in vivo*).
- Pembuatan DNA rekombinan tergantung pada kemampuan **enzim-enzim restriksi** (endonuklease) yang dapat memotong DNA pada sisi yang **spesifik**
- Diperlukan suatu **vektor** (*plasmid, bakteriofaga, cosmid*) sebagai → pembawa gen.

Vektor tsb dapat melakukan replikasi di dalam sel sambil membawa DNA asing dan sifat-sifat fenotip yang dapat dideteksi.

# KONTRIBUSI/TUJUAN REKAYASA GENETIKA

---

- melakukan studi tentang *struktur & fungsi gen* (analisis gen)
- **amplifikasi** produk suatu gen dalam keadaan murni
- peningkatan suatu strain (*strain improvement*) → **bibit unggul**
- rekayasa genetik memberikan kontribusi yang substansial bagi penelitian pada berbagai bidang, seperti :
  - √ Peningkatan produksi bahan makanan
  - √ Peningkatan produk obat-obatan dan produk baru
  - √ Diagnosis penyakit
  - √ perbaikan proses industri
  - √ mengatasi polusi lingkungan

# **PRODUK BAKTERI HASIL KLONING**

**(yang berisi gen manusia)**

<b>PRODUK</b>	<b>APLIKASI</b>
<b>INTERFERON</b>	linfeksi virus dan kanker
<b>INTERLEUKIN 2</b>	kanker dan mengaktifkan sistem imun
<b>INSULIN</b>	diabetes melitus
<b>AKTIVATOR PLASMINOGEN</b>	penyumbatan darah/stroke
<b>FAKTOR TUMOR NECROSIS</b>	penghancurkan tumor
<b>FAKTOR XI DAN VIII</b>	untuk terapi hemofilia
<b>ERYTHROPOIETIN</b>	menstimulir pembentukan sel darah merah
<b>BETA-ENDORFIN</b>	untuk analgetik
<b>ENZIM</b>	suplemen atau katalis proses kimia (industri)
<b>VAKSIN</b>	mengurangi resiko vaksin konvensional

# VEKTOR

---

- Merupakan wahana untuk memindahkan DNA ke organisme inang baru yang dapat diekspresikan/bereplikasi dalam sel inang tsb . (*E.coli* yang paling banyak digunakan)
- **Beberapa jenis vektor**
  1. Plasmid
  2. Bakteriofaga : Lamda dan derivatnya dan faga s.s)
  3. Cosmid
  4. Transfosom

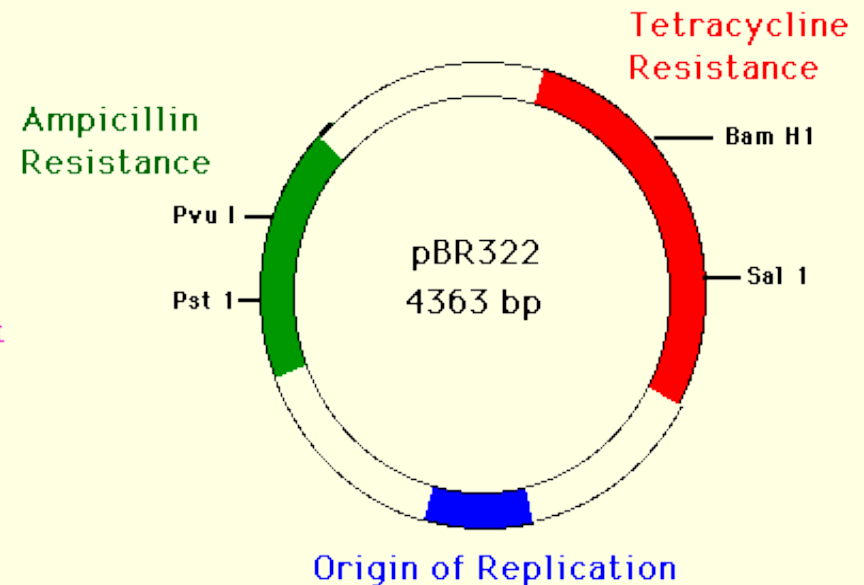
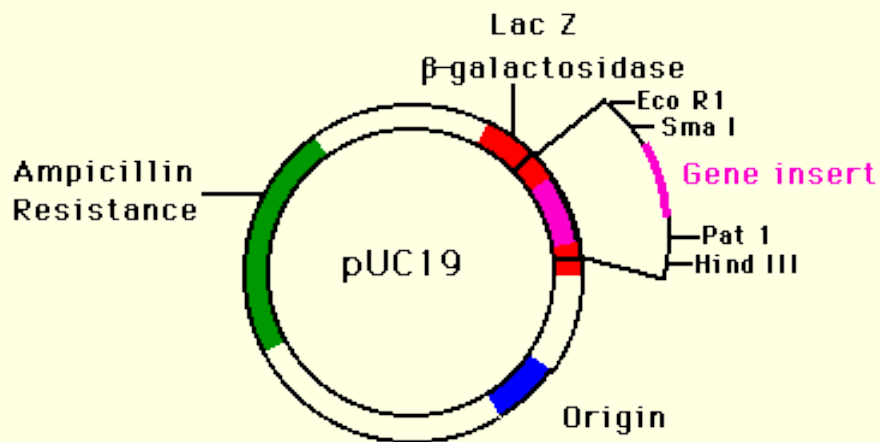
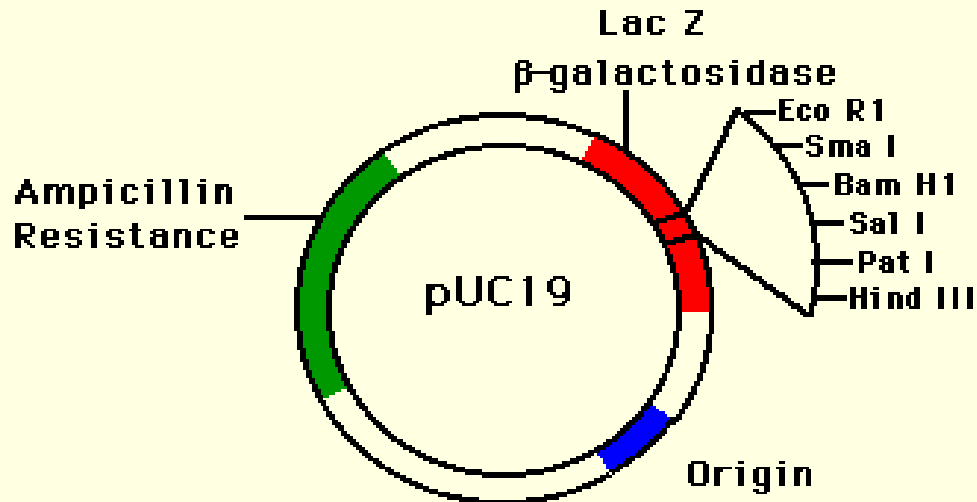
# PLASMID

---

- molekul DNA d.s sirkuler (ekstra kromosom), terdapat luas pada sel prokariot (spt, sel bakteri)
- berisi 1 Kb sampai lebih dari 250 Kb
- memiliki paling sedikit satu sekuen/urutan DNA sebagai titik asal replikasi → dpt memperbanyak diri tanpa tergantung pd genom/ kromosom
- membawa satu/lebih gen misal sifat resisten terhadap *tetrasiklin* dan *ampisilin*

*contoh: pBR 322, R-plasmid*

# PLASMID pBR322 dan PLASMID pUC10



# Plasmid yang ideal untuk vektor

---

- *ukurannya kecil*
- *memiliki sifat fenotip yang mudah untuk diseleksi*
- *memiliki sisi pada gen fenotipnya untuk beberapa enzim restriksi sehingga mudah dipelajari*

# JENIS PLASMID

---

- ❑ **Berdasarkan jumlah kopi yang dimiliki plasmid**
  1. *Low copy-number* → 1 -2 kopi/sel
  2. *High copy-number* → lebih dari 500 kopi/sel
- ❑ **Berdasarkan penghambatan replikasi**
  1. *Relaxed plasmid* \* → replikasi DNA plasmid tidak dihambat walaupun replikasi DNA kromosom sel inang dihambat
  2. *Stringent plasmid* → jika replikasi DNA sel inang dihambat  
  
maka replikasi pada plasmidnya juga akan dihambat
- ❑ **Berdasarkan bentuknya**
  1. *Covalently closed circles (DNA ccc)* \*  
bentuk sirkuler untai ganda utuh
  2. *Open circles (DNA oc)*  
DNA sirkuler untai ganda dengan satu rantai yang utuh

*\*) disukai karena mudah untuk diamplifikasi serta mudah diisolasi dan dimanipulasi*

# Bahan yg diperlukan untuk cloning :

---

- Molekul DNA yg akan dipelajari
- Vektor (pembawa DNA)
- ***Enzim restriksi***
- Enzim ligase
- Sel inang

# ENZIM RESTRIKSI (endonuklease)

---

- Merupakan suatu enzim endonuklease yg terdapat dalam sebagian besar sel bakteri
- Pertama kali ditemukan oleh WERNER ARBER & HEMILTON SMITH
- berfungsi untuk melindungi sel *host* terhadap invasi DNA asing seperti faga-DNA (*melalui proses metilasi*)
- dapat mengenali dan memotong urutan basa nukleotida spesifik yg berisi 4-6 pb (pair base) → *recognition sequence*
- Enzim spesifik diberi nama dr bakteri yang menghasilkannya.
  - Eco RI → pertama kali diisolasi dari *E.coli* strain R
  - Hin dIII → enzim ke 3 yg diisolasi dr *Haemophilus influenza*
- Hasil pemotongan dapat membentuk fragmen dg ujung yg menonjol → ujung lengket/sticky end atau ujung yang rata/ *blunt end*

# Enzim Restriksi

Name	Source Microorganism	Recognition Sequence
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G↓GATCC
Eco RI	<i>Eschericia coli</i> RY13	G↓AATTC
Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	A↓AGCTT
Not I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC↓GGCCGC
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	CTGCA↓G
Sma I	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG

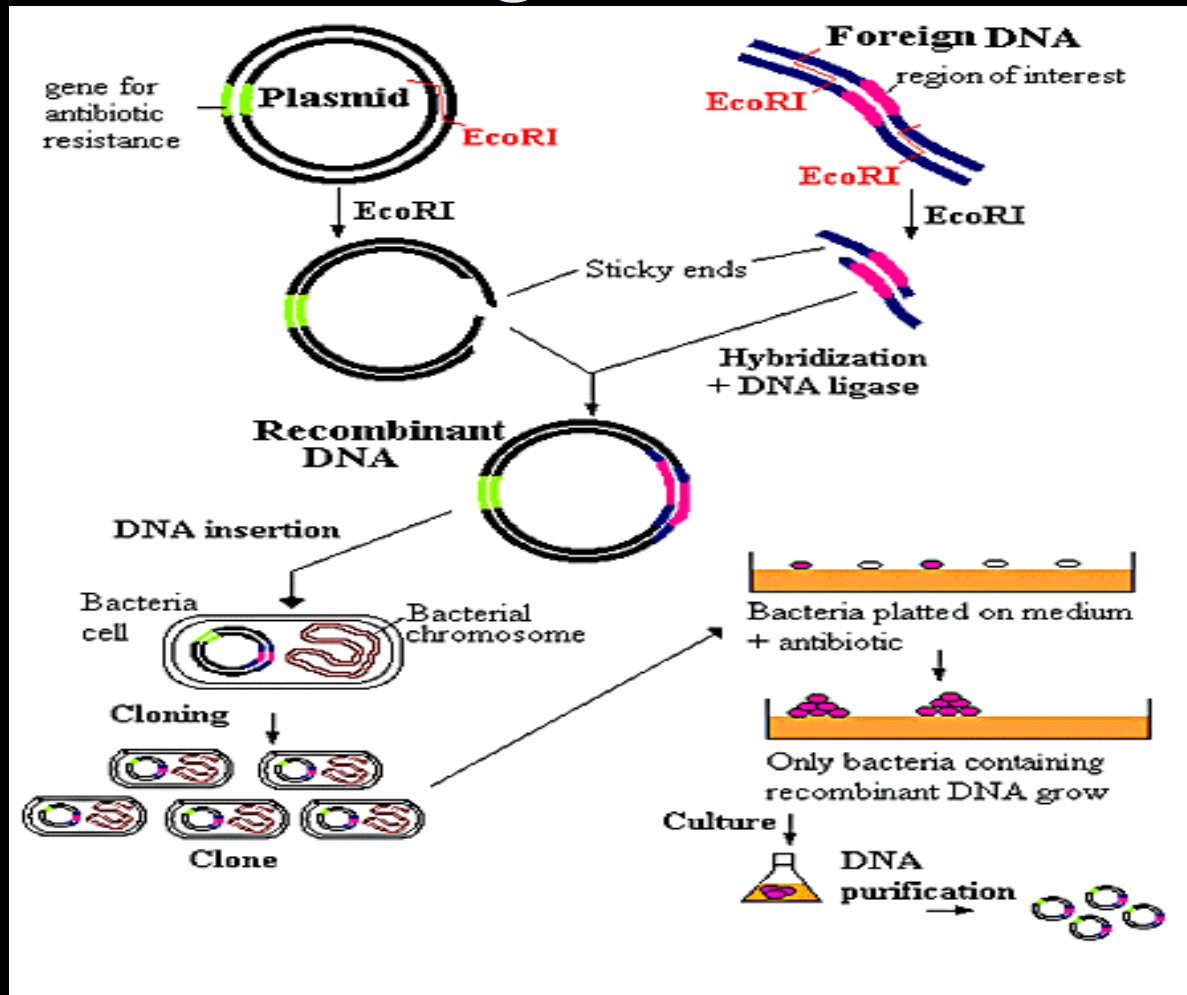
# TAHAPAN DNA RECOMBINAN

---

- plasmid dipotong menggunakan *enzim restriksi* (***EcoRI***) pada suatu sisi → menghasilkan 2 ujung *lengket* (***sticky***)
- sample DNA (dari manusia) juga dipotong menggunakan *EcoRI* untuk memperoleh ujung *sticky* yang sama
- DNA (manusia) atau **cDNA** yang dikopi dari mRNA menggunakan **reverse transkriptase** (dari retrovirus)
- Kedua sampel tsb dicampur dan dibiarkan **berhibridisasi**
- beberapa molekul akan terbentuk dengan DNA sampel dan tersisipkan (insert) ke dalam plasmid pada sisi pemotongan *EcoRI*
- ligasi dengan **DNA ligase** untuk menggabungkan fragmen-fragment secara *kovalent*

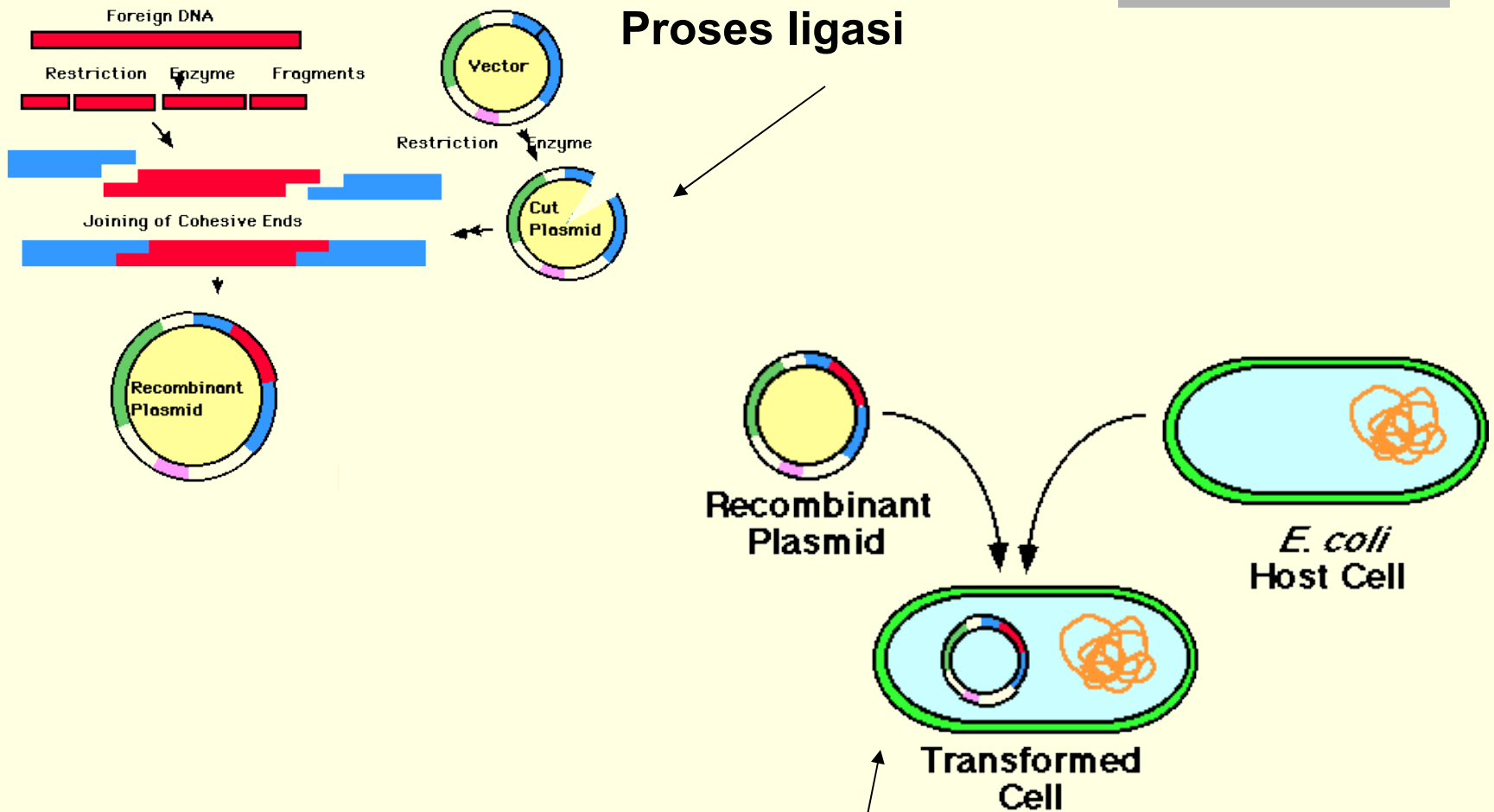
# TAHAPAN DNA RECOMBINAN

## Cloning



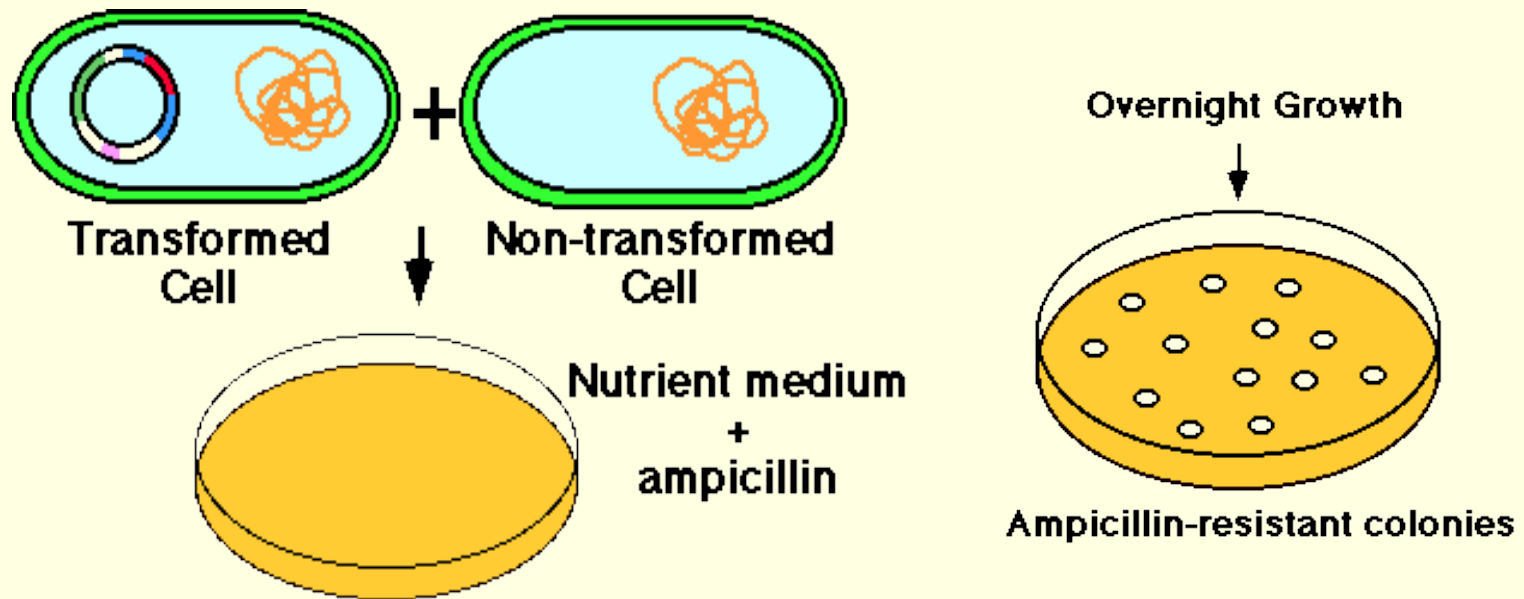
Three steps:  
Ligation  
Transformation  
Selection

# TAHAPAN DNA RECOMBINAN

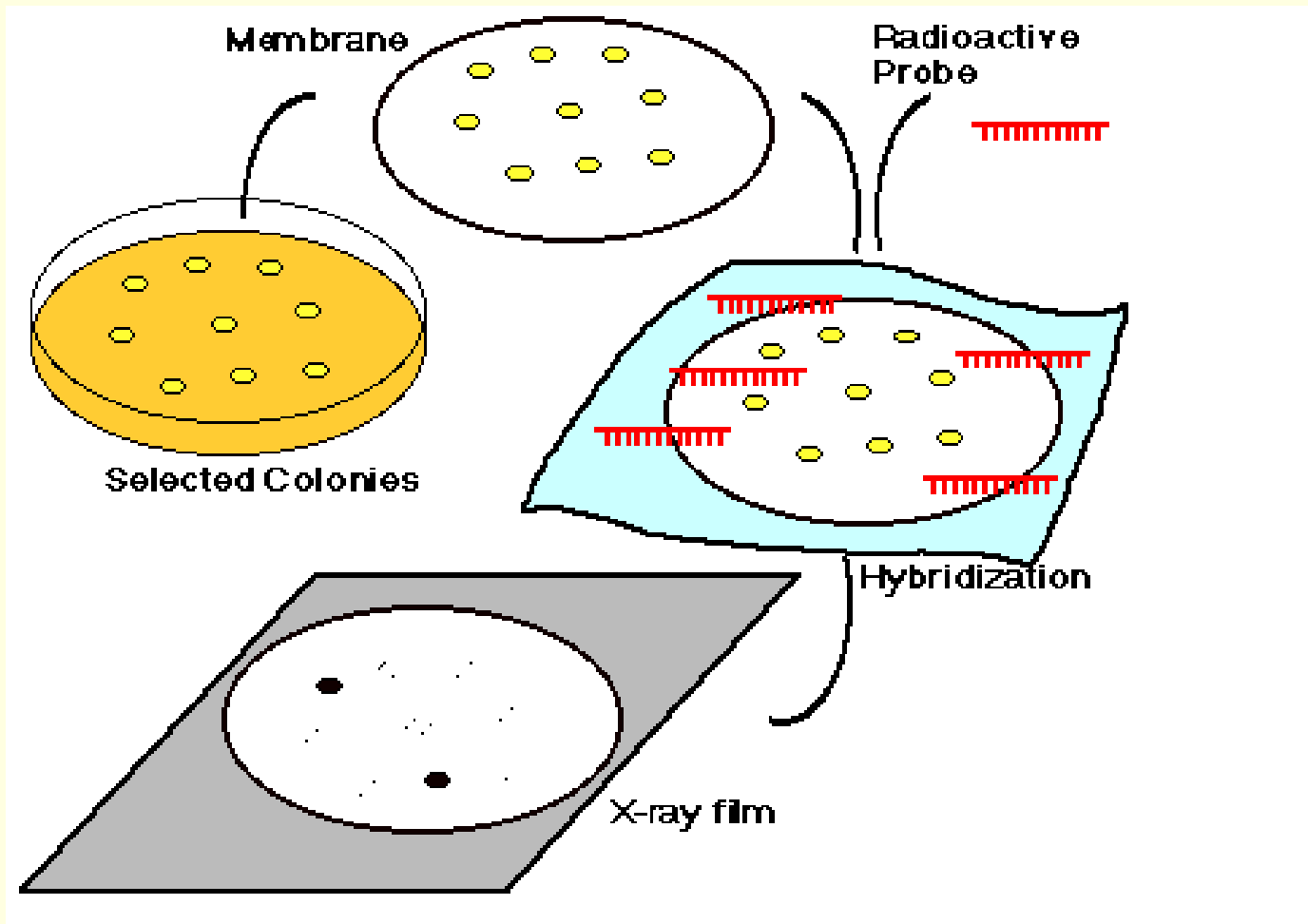


Proses transformasi menggunakan bakteri sebagai transforman

# Proses Seleksi Transforman



# Cara mendapatkan transforman hasil cloning



# AMPLIFIKASI DNA

---

*Dapat dilakukan secara*

1. *In vivo* → dengan teknik rekayasa genetika/kloning dg sel hidup → **transforman**
2. *In vitro* → teknik kloning gen dalam tabung reaksi → **PCR**

## **PCR (*Polimerase Chain Reaction*)**

*Syarat dalam tabung reaksi terdapat :*

1. Template (DNA yang telah diketahui urutannya)
2. Primer (oligonukleotida, 15-20 pb)
3. Enzim polimerase → termostabil
4. Prekursor nukleotida

# PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

---

## 1. Templat

- suatu segmen pada molekul DNA (hasil isolasi dr suatu sumber dan telah diketahui urutan basa nukleotidanya).
- Digunakan unt menempelkan primer

## 2. Primer

- suatu oligonukleotida (15 -20 pb)
- dapat disintesis dengan mesin
- sebagai pemicu dalam pembuatan rantai DNA
- primer ini diletakkan dengan posisi yg berlawanan terhadap rantai DNA yg akan diperbanyak

## 3. DNA polimerase

- enzim yg memiliki kemampuan menggabungkan nukleotida
- mengkatalisis pembentukan DNA yang sedang tumbuh : diawali dari primer yang berjalan dari ujung 5' ke arah 3'
- dapat diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*

# Proses PCR

---

- Tahapan proses
  - denaturasi DNA ds menjadi DNA ss (94 °C, 60")
  - annealing (55 °C)
  - Sintesis (72 °C)

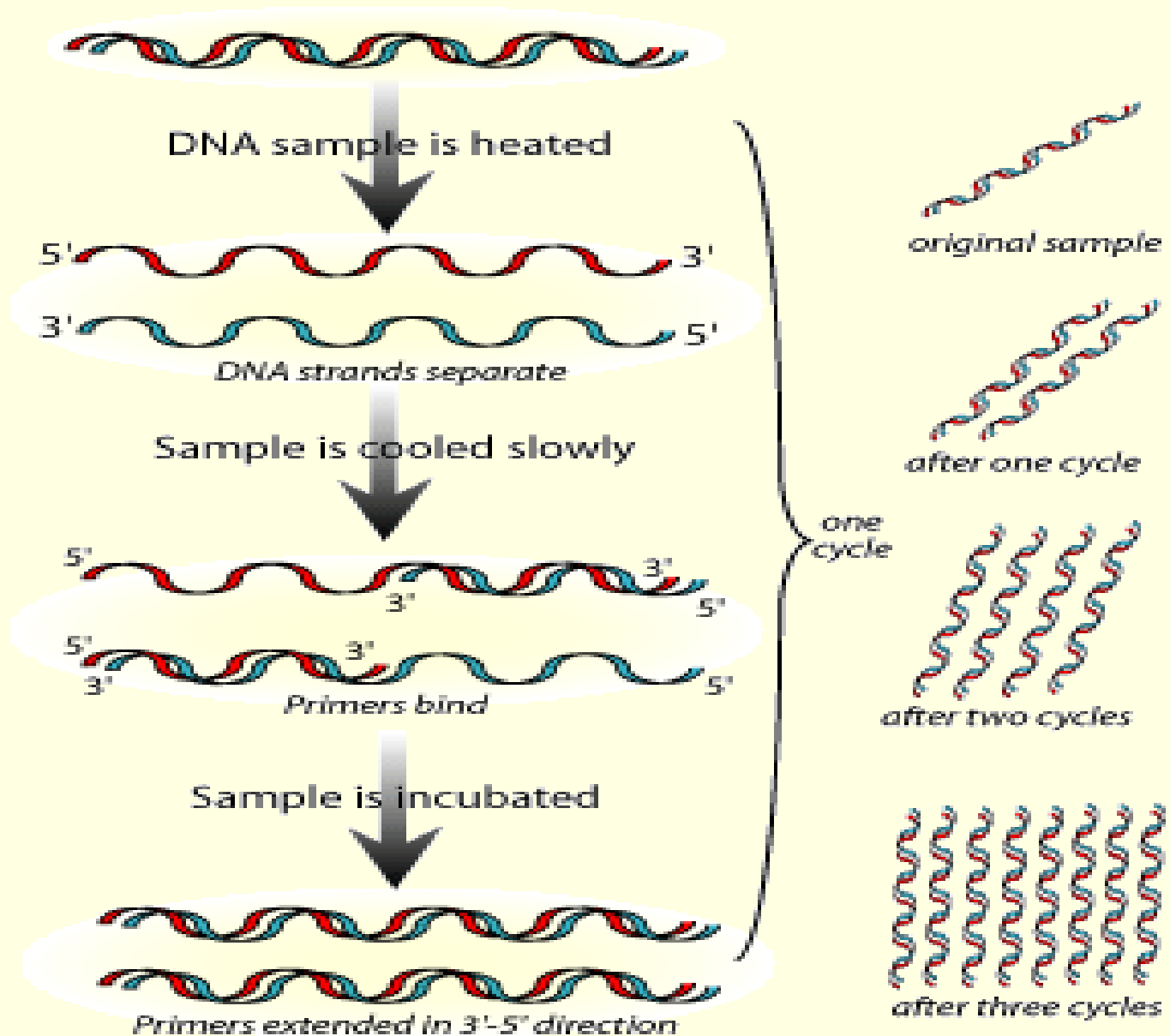
## **Satu siklus :**

- *dimulai dari denaturasi, annealing sp sintesis → 5 menit*
- *proses polimerisasi satu molekul DNA ds menghasilkan 2 copy*

## Kegunaan PCR

- selain untuk amplifikasi dapat digunakan untuk menentukan apakah urutan nukleotida suatu DNA mengalami mutasi
- untuk bidang kedokteran forensik
- untuk melacak asal usul seseorang dengan membandingkan "*finger print*"

# PCR is used to amplify a sample of DNA



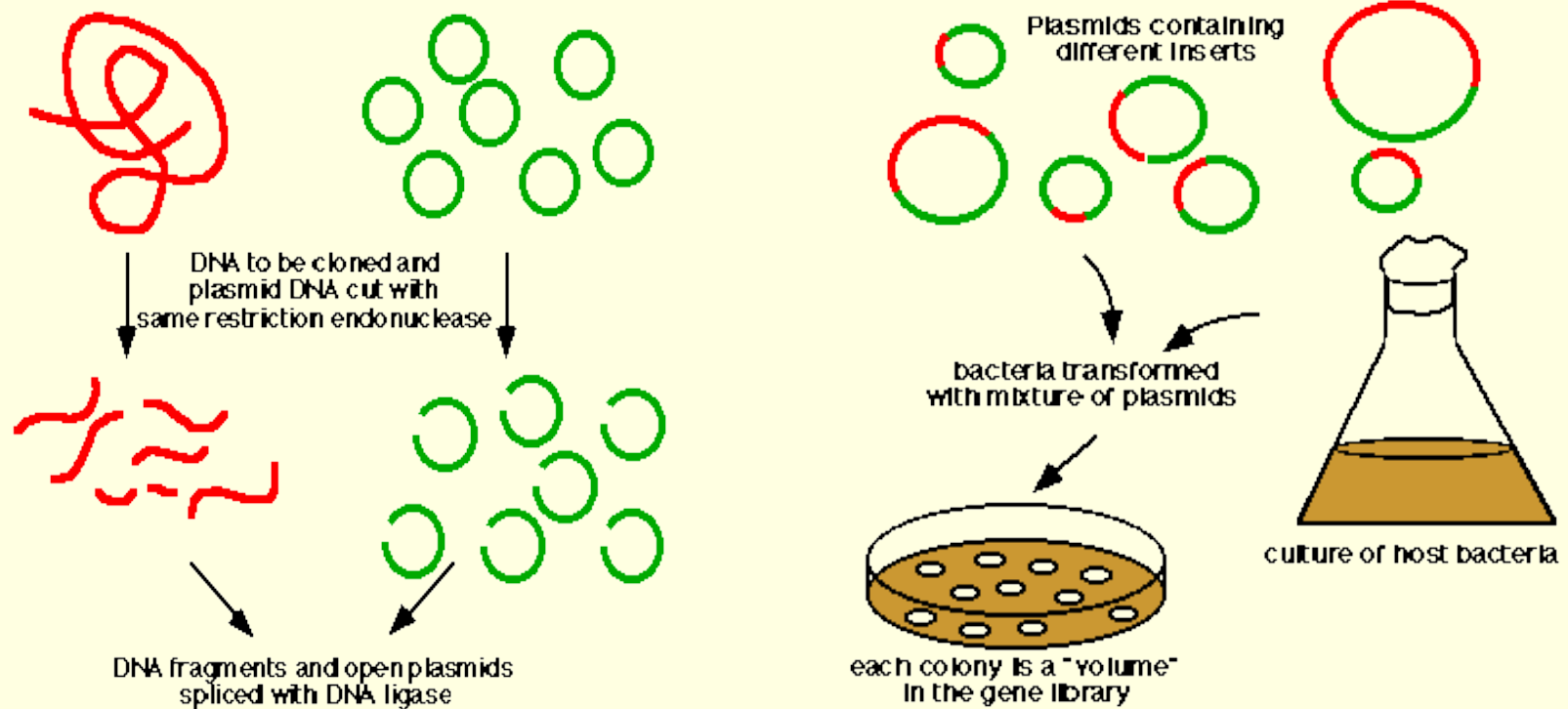


# Pembuatan GENE LIBRARIES

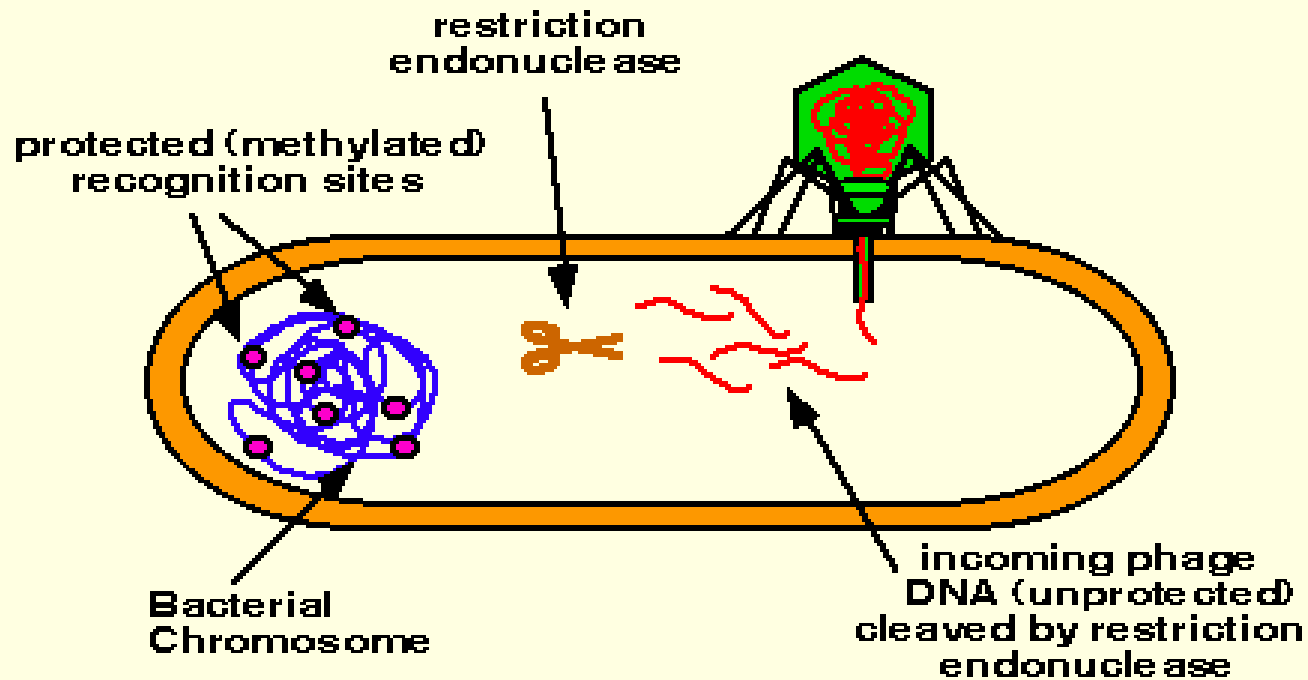
---

- Genom DNA dipotong-potong dengan menggunakan *endonuklease*
- Semua fragmen yg dihasilkan diklon secara random ke dalam vektor plasmid
- Sebagian besar informasi genetik akan berada dalam campuran kultur bakteri.
- Kultur bakteri, yang masing-masing hanya berisi satu fraksi dari genom yang membawa semua gene tersebut dikenal dengan istilah ***library***

# Pembuatan gen library



# Metilasi untuk proteksi DNA host



# Pembuatan Complement DNA (cDNA)

---

*Kita dapat mengklon gen/membuat gen sintetik untuk suatu protein asalkan protein tsb tidak terlalu panjang dan urutan asam aminonya telah diketahui*

## **Contoh kasus :**

Andaikan kita ingin mengklon gen yang dapat memproduksi suatu protein berupa *hormone somatostatin* (hanya berisi 15 residu asam amino)

Untuk kasus di atas dapat dilakukan melalui pembuatan cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase* (*DNA polymerase* yang diperoleh dari *retrovirus*) dan molekul **mRNA murni yang spesifik.**

## Misal :

mRNA untuk globin dapat diperoleh dari retikulosit

mRNA untuk albumin dapat diperoleh dari organ oviduct

mRNA proinsulin diambil dari pancreas

mRNA interferon diambil dari sel darah putih

## Lanjutan pembuatan cDNA

---

Molekul mRNA diperoleh dari alam ini (eukariotik) memiliki ekor poliadenilat pada ujung 3' sehingga dapat dipakai untuk melekatkan primer berupa oligo dT)

Hasil reaksi transcriptase balik adalah berupa d.s RNA/DNA hybrid, kemudian molekul ini dihidrolisis dalam alkali dan dihasilkan c DNA ss karena rantai RNA nya rusak karena terdegradasi

Selanjutnya c DNA ss diubah menjadi DNA ds dg enzim DNA polymerase

DNA ds selanjutnya diinsersi ke dalam vector atau digabungkan dengan genom host (misal *E.coli*)

# TEKNIK SEKUENSING DNA

---

Ada 2 cara penentuan urutan nukleotida yang dikembangkan (1977) :

- **Allan Maxam & Walter Gilbert** (*chemical cleavage method*) menggunakan senyawa kimia yang menghasilkan pemotongan basa nukleotida spesifik
- **Frederick Sanger** (*chain-terminating method*)
  - lebih mudah dan lebih luas pemakaiannya
  - dikenal → **dideoksi Sanger**
  - memerlukan sintesis DNA secara enzimatis dari satu untai DNA yg komplemen dg untai DNA yg sedang dianalisis dg menggunakan primer yg dilabel dg radioisotof, dNTP serta penambahan ddNTP.

# sekuensing DNA

---

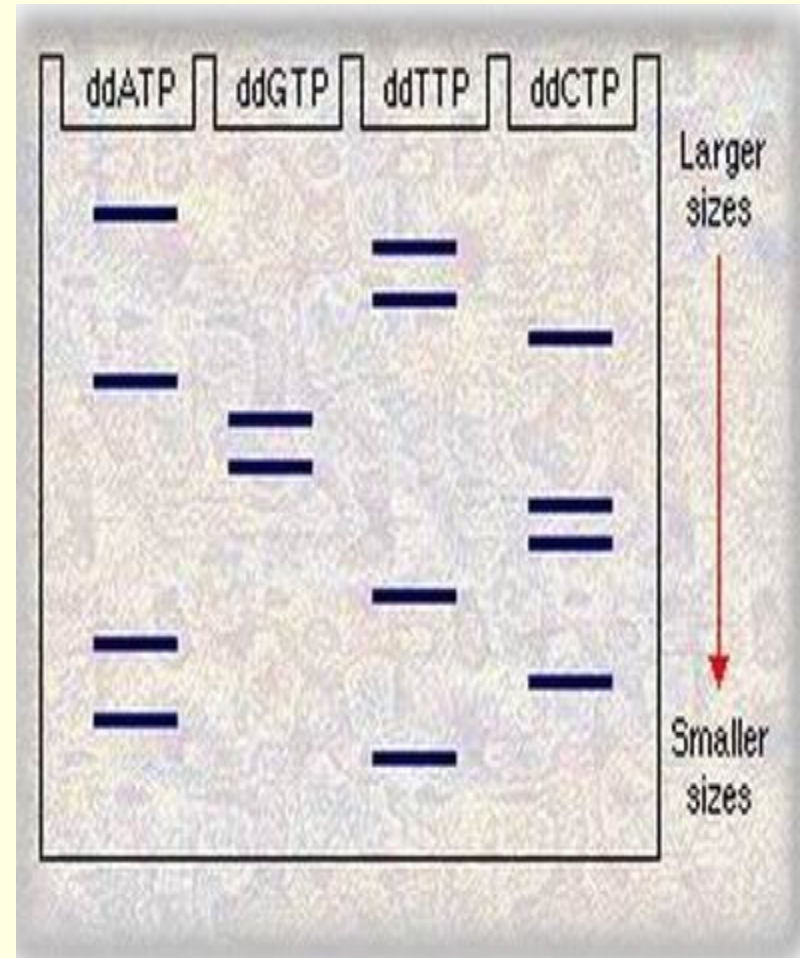
dilakukan dalam 4 tabung yang terpisah :

(yg mengandung campuran bahan-bahan)

1. molekul DNA yang akan dianalisis dan **primer** yg telah dilabel dengan radioisotof
2. keempat basa : dATP, dCTP, dGTP, dTTP yang telah dilabel dg radioisotope
3. enzim DNA polymerase
4. salah satu dari empat **ddNTP** : ddATP, ddCTP, ddGTP dan ddTTP → *dalam konsentrasi yang sangat rendah dibandingkan dg deoksi nukleotida (dNTP)*

# Hasil gel elektroforesis (*Autoradiogram*)

- Dalam metode SANGER digunakan primer spesifik yg dipilih untuk sintesis DNA pd titik tertentu.
- Sintesis DNA akan berlanjut sampai ddNTP yg dilabel terinkorporasi yg menyebabkan pembentukan rantai berakhir
- Semua produk berupa fragmen DNA dipisahkan dengan elektroforesis dan dianalisis dengan autoradiografi
- Fragmen bermigrasi berdasarkan ukuran molekulnya
- Urutan DNA ditentukan dengan “membaca” gel



---



# **BAB V**

# **MUTASI GEN**

# PENGERTIAN

---

- disebabkan oleh adanya perubahan dalam urutan nukleotida  
*perubahan **genotif** → perubahan **fenotif** yg dpt diekspresikan*
- dapat terjadi pada semua spesies
- menghasilkan produk gen yang non-fungsional (mis, protein yang tidak aktif) → **mutasi lethal**
- menunjukkan perubahan bent koloni, pigmen, atau tdk mampu membentuk kapsul, dan spora
- mengalami mutasi biokimia → perubahan jalur metabolisme dari *mutan prototrof* menjadi *auksotrof*
- mengubah kemampuan dalam fermentasi → jadi kurang /lb aktif menghasilkan produk
- memperlihatkan toleransi/resisten terhadap antibiotik atau resisten terhadap **faga**

# JENIS - JENIS MUTASI

---

## ☞ MUTASI SPONTAN

1. Mutasi titik (point mutation), terjadi pergantian satu nukleotida oleh satu nukleotida yang berbeda

### a). Pada level DNA

- mutasi transisi
- mutasi transversi

### b). Pada level protein

- silent mutation
- missence mutation
- non sense mutation
- neutal mutation

# sambungan JENIS - JENIS MUTASI

---

## 2. Mutasi pergeseran kerangka (*frame shift*)

dapat terjadi penambahan (**addition**) atau kehilangan (**deletion**) satu/dua nukleotida yang dapat menggeser frame pembacaan sehingga pesan yang ditranskrip tidak benar

## ☞ MUTASI INDUKSI

terjadi mutasi karena ada **mutagen**

berdasarkan cara kerja mutagen, ada 4 model mutasi

1. Penggabungan basa-basa analog (penyisipan)
2. Spesifik *misspairing*
3. Interlokasi
4. *By-pass*

# ASPEK PRAKTIS DARI PEMBENTUKAN MUTAN

---

1. Terungkap adanya mikroba yang resisten terhadap antibiotik tertentu disebabkan adanya mutasi genetik (*penting untuk pengobatan suatu penyakit*)
2. Dapat diisolasi mutan dengan strain baru yang unggul → dapat menghasilkan suatu produk akhir dalam jumlah besar/*over production* (*penting untuk industri*)
3. Memungkinkan persyaratan untuk pemeliharaan biakan murni spesies mikroba yg khas tercegah dari mutasi
4. Mutan-mutan yang mengalami kerusakan/terhambatnya proses-proses enzimatis yang berbeda dapat dimanfaatkan untuk mempelajari lebih jauh proses biokimia, seluk beluk jalur metabolisme atau jalur biosintesis

---



# **BAB VI**

# **TEKNOLOGI ENZIM**

# Teknologi Enzim

## Isolasi dan Pemurnian Enzim

- Merupakan proses yang melibatkan beberapa teknik sekaligus
- Enzim yang ditemukan di pasaran berasal dari berbagai macam organisme, dengan berbagai tingkat kemurnian, contoh:
  - $\alpha$ -Amilase
  - Glukoamilase
  - Protease
- Berdasarkan fungsinya, ada dua jenis enzim
  - Enzim intraselluler
  - Enzim ekstraselluler (**lebih mudah diisolasi**)

# Isolasi Enzim Intraseluler

- Merupakan proses pelepasan enzim dari sel
- Enzim dapat berasal dari sel tumbuh-tumbuhan, sel hewan, atau sel mikroba
- **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

- Isolasi enzim intraselluler memerlukan pemecahan dinding sel
- Dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, baik cara fisik atau cara kimia

## Ekstraksi 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.

# 1. Pembekuan dan Pencairan

---

- Jika pasta sel didinginkan pada  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , maka ia akan mengalami kerusakan 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

# 1. Kejutan Osmosa

---

- 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**

# 1. Sonikasi

- Sel dalam media cair diberi getaran di atas frekuensi batas pendengaran manusia ( $> 20\text{kHz}$ , 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

- Berbeda dengan cara fisik, ekstraksi dengan cara kimia lebih halus. Agitasi diterapkan hanya sekali-kali.

## 1. Detergent

- Detergent-detergent anionik, kationik, dan non-ionik 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 detergen.
- 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.*

### 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 seluler yang diinginkan berada dalam larutan 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: sentrifugasi, filtrasi, flokulasi, atau koagulasi.

# 1. 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.

- Pemisahan dengan sentrifugasi dapat digambarkan oleh persamaan:

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

$\Phi$  = "The throughput for complete 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 ???

## 2. 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.

### 3. Flokulasi dan Koagulasi

---

- Teknik ini baik digunakan sebelum sentrifugasi atau filtrasi.
- Pada cairan yang sangat encer, flokulasi terjadi dengan penambahan suatu reagen.
- Koagulasi merupakan adesi spontan antar partikel bila muatan partikel yang satu dapat dinetralkan oleh muatan partikel lain. Teknik ini dapat diterapkan untuk pengendapan sel utuh, pecahan sel atau larutan protein

# Pemekatan

---

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

Teknik Dasar	Senyawa spesifik	Keefek-tifan	Kelemahan	
Pengendapan				
a).	Garam anorganik	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ NaCl $\text{Na}_2\text{SO}_4$ $\text{Ca}(\text{OAc})_2$	*** * ** *	
b)	Pelarut organik	Aseton etanol isopropanol	** ** **	Bahaya kebakaran
c)	Polimer bermuatan	Setaflon, 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, fosfoselulosa	***	
c).	Kromatografi afinitas		****	Mahal
Ultra filtrasi/ reverse osmose			***	
Penguapan				
		Rotary evap. Spray dry Freeze dry	* *** ***	Timbul panas

# 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.

# Pengendapan

---

## 1. Ammonium Sulfat

Enzim dapat diendapkan dan difraksionasi 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

## 2. 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

### 3. Polimer dengan Berat Molekul Tinggi

---

- Polietilen glikol (PEG) dengan BM antara 4000 – 6000 sering digunakan untuk mengendapkan protein.
- Berbeda dengan pelarut organik, polimer ini dalam larutan protein akan memberikan efek penstabilan molekul protein.
- Penggunaan polimer ini efektif pada konsentrasi rendah, sekitar 6 - 12%.
- Kelarutan protein yang mengandung PEG dipengaruhi oleh pH, kekuatan ion, temperatur, dan konsentrasi protein itu sendiri.

# 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.

# Liofilisasi (Freeze Dry)

---

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.

# Pengendapan

(Didasarkan pada perbedaan kelarutan)

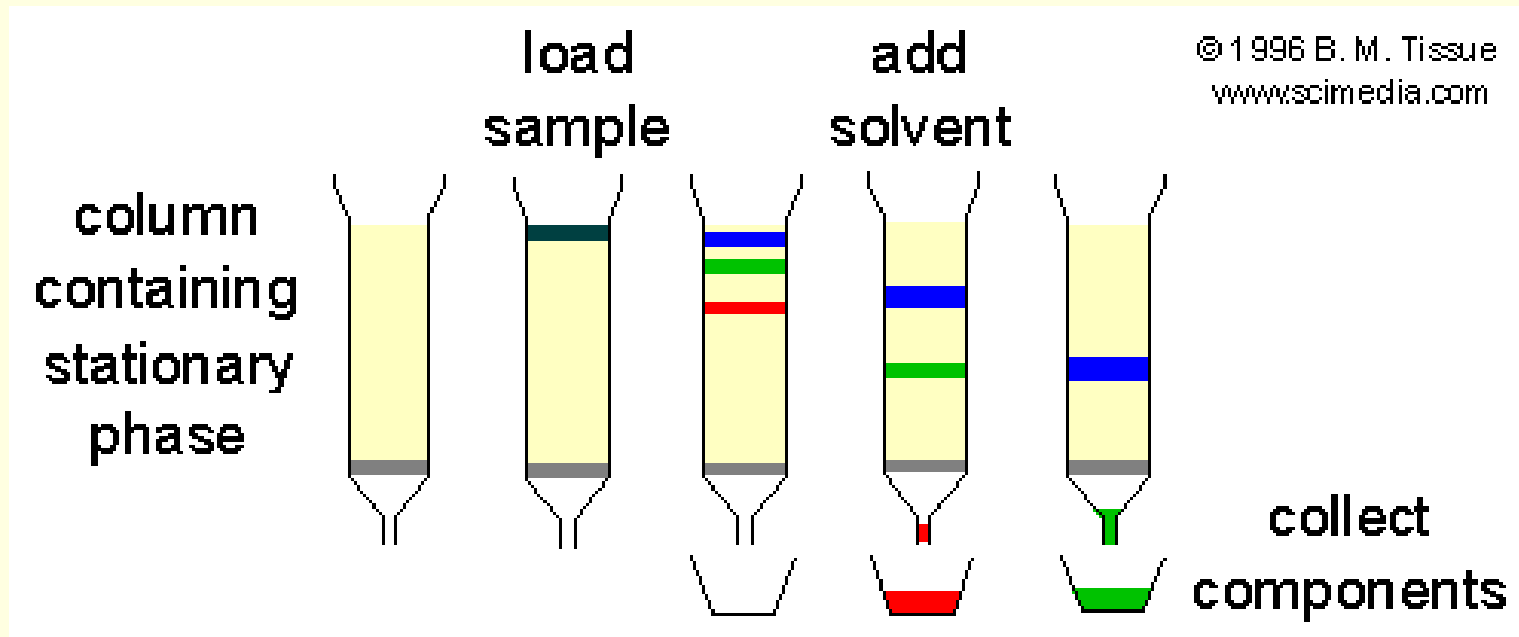
---

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.

# Kromatografi

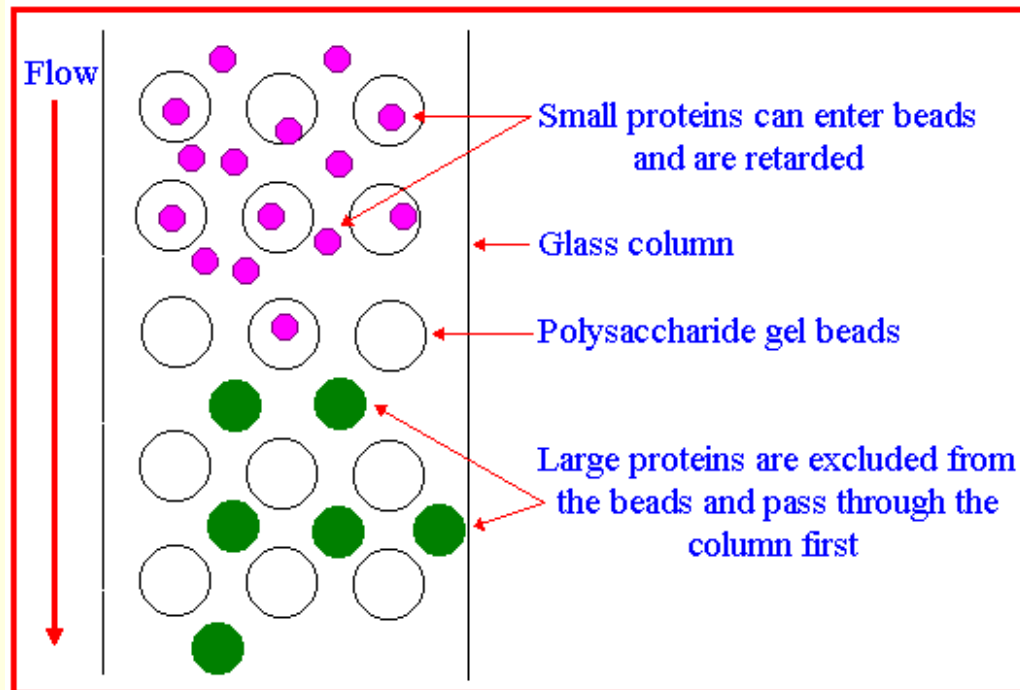
- Merupakan cara pemisahan berdasarkan perbedaan interaksi antara komponen-komponen yang akan dipisahkan dengan fasa diam dan fasa gerak



- 
- 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 Gel-filtrasi

Kromatografi Gel-filtrasi 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).



# Ion Exchange Chromatography

---

- Ion exchange resins have fixed charges - either positive or negative.
- Proteins bind to the resin via electrostatic interactions.
- The strength of these interactions depends on the net charge on the protein, which is a function of pH and the nature of the weak acid amino acid side chains, and the salt concentration of the buffer - high salt concentrations reduce the interaction. The higher the net charge on the protein at the pH of the environment on the column, the more tightly it sticks to the oppositely charged resin, and the higher the salt concentration required to elute it from the column.

# Affinity Chromatography

- This is a more specific interaction in which a ligand specifically recognized by the protein of interest is attached to the column material.
- When a mixture of proteins is passed through the column, only those few that bind strongly to the ligand will stick, while the others will pass through the column.
- By changing the buffer one weakens the interaction between the protein and the ligand, which causes the protein to be eluted from the column.
- A variation is immunoaffinity chromatography, in which an antibody specific for a protein is immobilized on the **column** and used to affinity purify the specific protein

# 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.

$$v = \frac{Eq}{f}$$

# Teori Elektroforesis

- Migrasi Molekul dalam medan listrik dipengaruhi oleh: ukuran, bentuk, muatan, dan komposisi kimia molekul.
- Pergerakan molekul bermuatan dalam medan listrik ditunjukkan oleh persamaan:

$$v = \frac{Eq}{f}$$

Pers. 1

$v$  = Kecepatan gerak molekul

$E$  = medan listrik dalam volt/cm

$q$  = muatan total molekul

$f$  = koefisien friksi, yang bergantung pada massa dan bentuk molekul

$$v = \frac{q}{f}$$

- Tegangan listrik (voltage) pada persamaan di atas biasanya dijaga konstant selama elektroforesis.
- Pada kondisi tegangan konstan persamaan di atas menjadi:

$$v = \frac{q}{f}$$

- Ini berarti kecepatan sebanding dengan *charge-to-mass ratio*.

- Pergerakan partikel bermuatan dalam medan listrik sering didefinisikan dengan mobilitas,  $\mu$ , kecepatan per unit dalam medan listrik.

$$\mu = \frac{v}{E}$$

- Bila kita gabung dengan persamaan 1, maka

$$\mu = \frac{Eq}{Ef} = \frac{q}{f}$$

- Secara teoritis, jika muatan,  $q$ , pada molekul diketahui, maka dimungkinkan untuk mengukur  $f$ .
- Dengan mengetahui mobilitasnya dalam medan listrik, maka akan didapat informasi mengenai bentuk dan ukuran hidrodinamik molekul tersebut.

# Metoda Elektroforesis

---

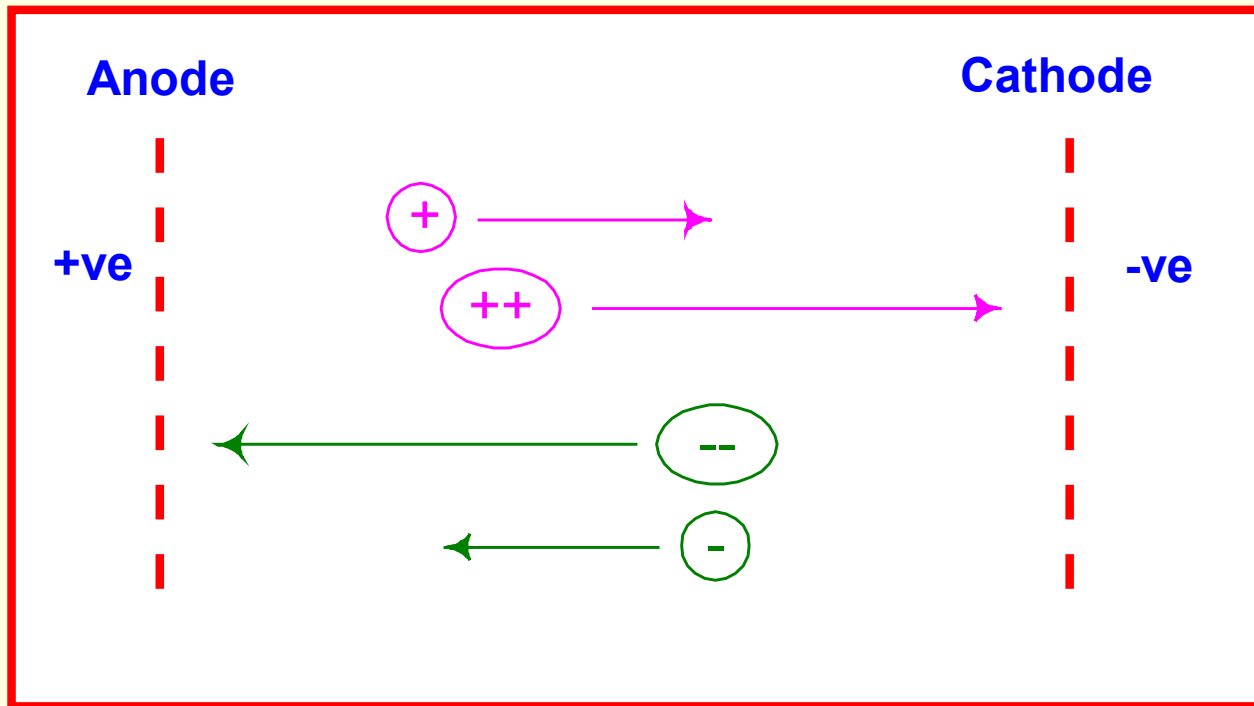
- Perbedaan utama pada metoda-metoda ini adalah jenis dari "support medium", umumnya adalah sellulosa atau gel.
- Sellulosa digunakan sebagai support untuk senyawa biokimia dengan BM rendah seperti asam amino dan karbohidrat, sedangkan gel poliakrilamid and agarosa secara luas digunakan sebagai support media molekul-molekul besar.

# Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE )

---

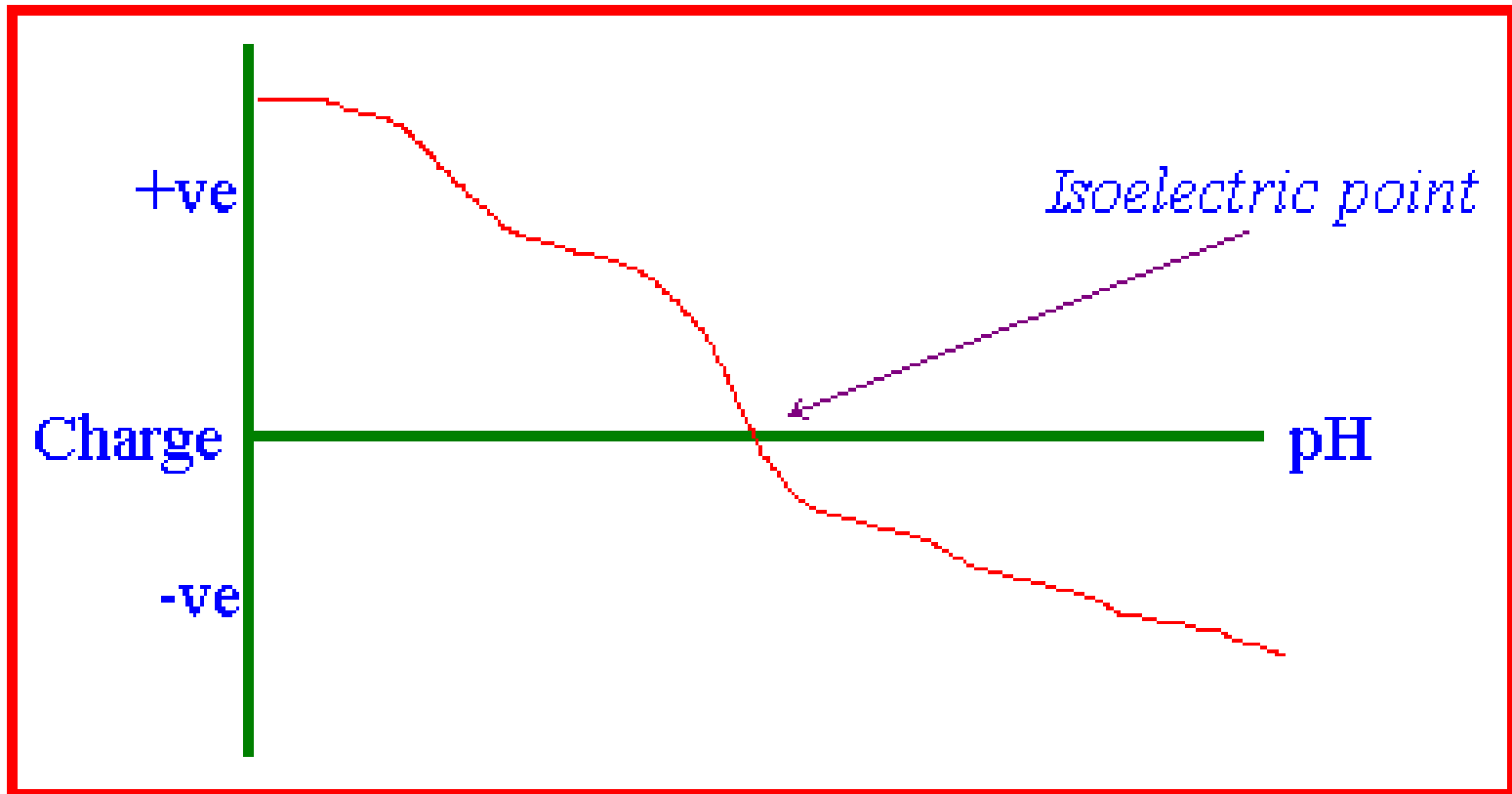
## Pendahuluan

- 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:



- Kecepatan gerakan partikel bergantung pada kekuatan medan dan jumlah muatan. Biomolekul seperti protein memiliki muatan akibat dari adanya asam amino basa atau asam.

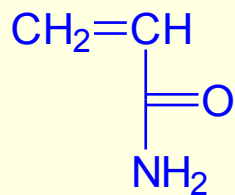
- Muatan total suatu protein bervariasi dengan berubahnya pH. Ini dapat dilihat dari kurva titrasi sebagai berikut:



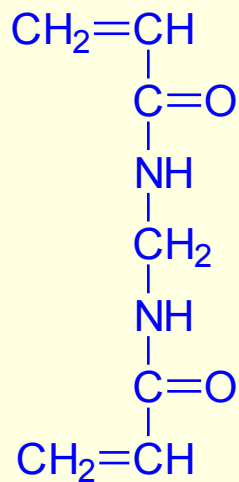
# Media pemisahan protein

---

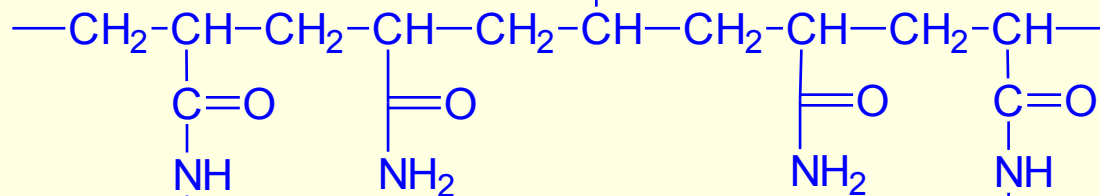
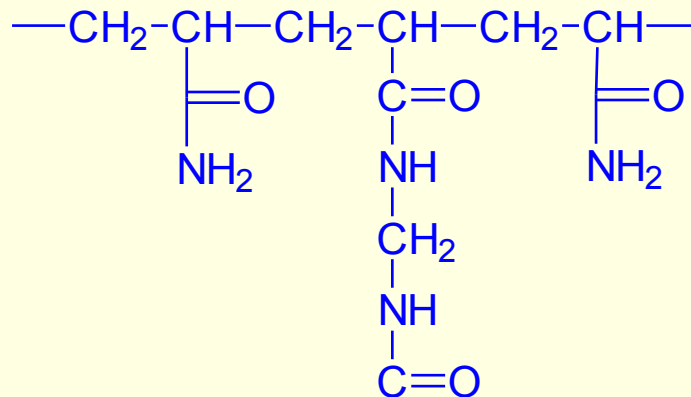
- Electrophoresis dalam larutan sangatlah sulit. Untuk itu digunakan media seperti gel.
- Sebelumnya digunakan starch atau agarosa untuk pemisahan protein, sekarang untuk matrix gelnya digunakan poliakrilamida.



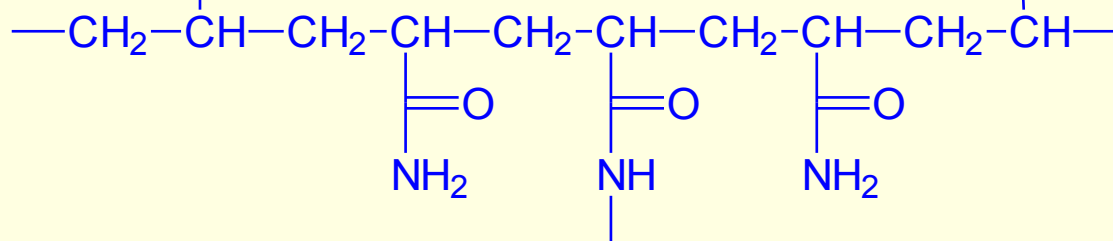
**Acrylamide**



**N,N'-methylene  
bisacrylamide**



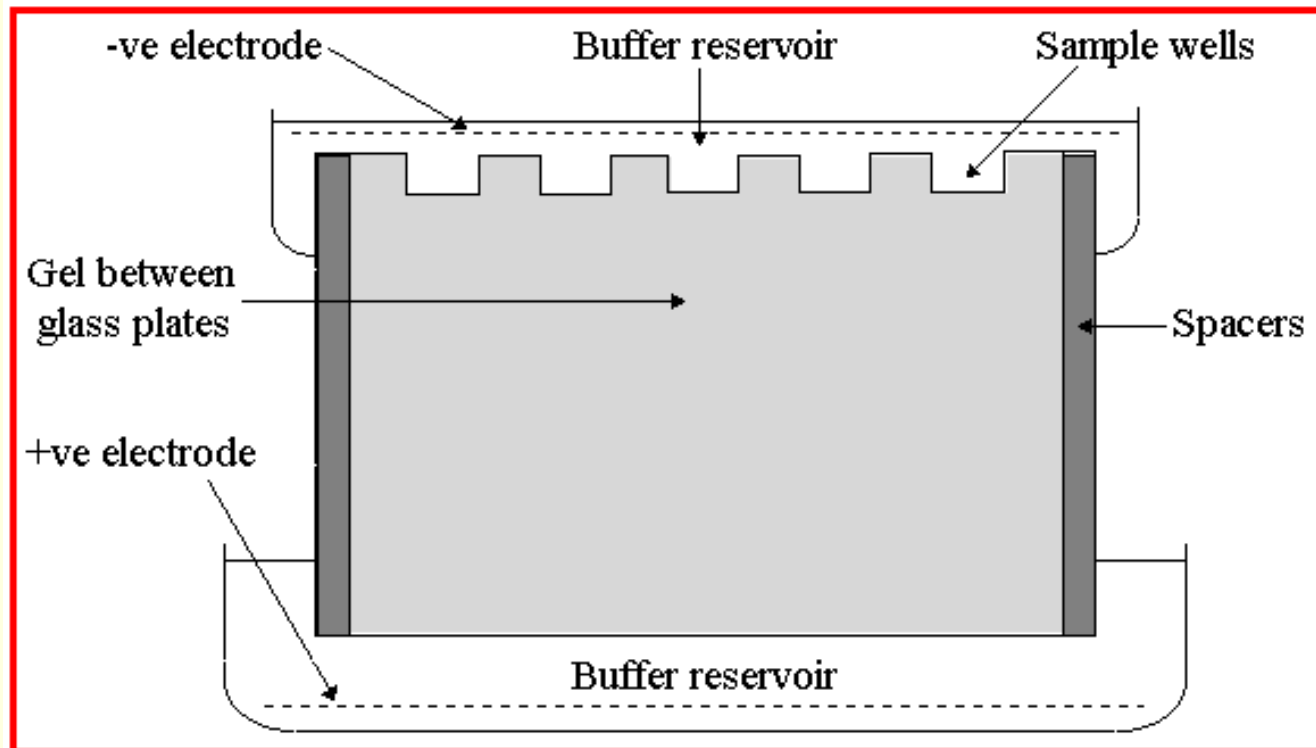
**polyacrylamide**

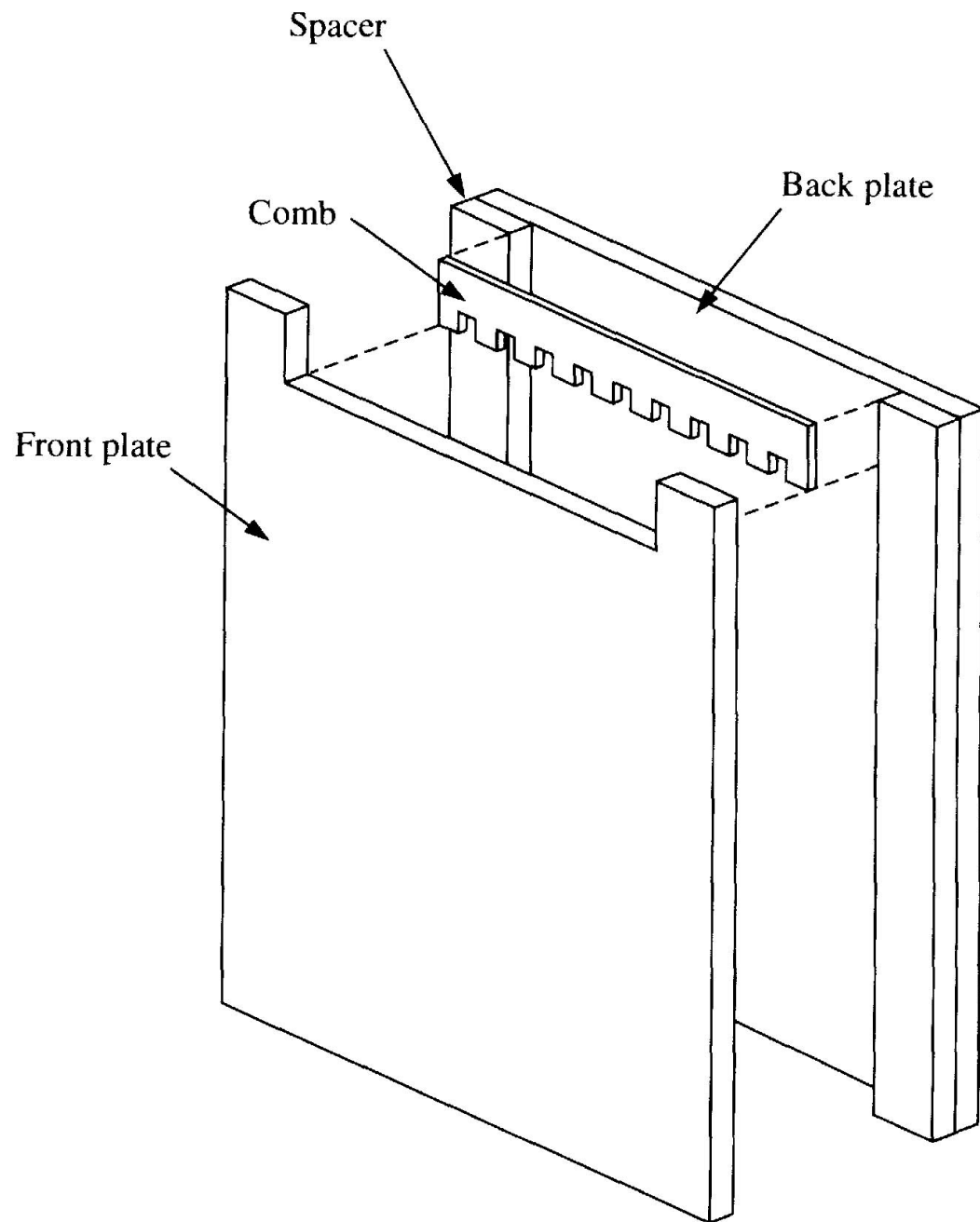


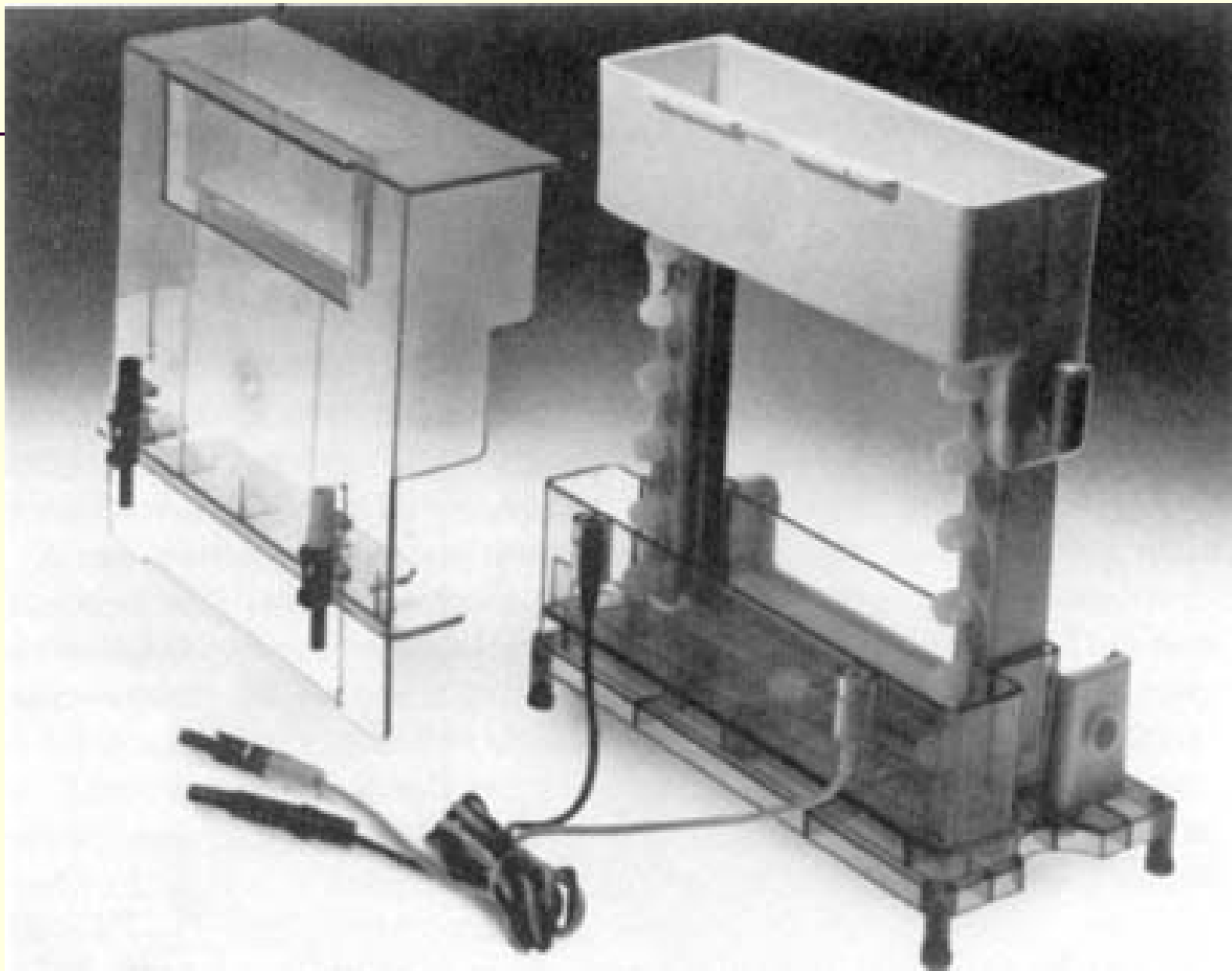
- 
- Ukuran pori, dan efek “molecular sieving”, dapat diatur dengan variasi komposisi bis-akrilamid : akrilamid. Protein yang besar akan ditahan oleh gel sehingga akan berjalan lebih lambat daripada protein kecil sehingga terjadi pemisahan yang didasarkan pada perbedaan ukuran.

# Peralatan untuk PAGE

- Gel polyacrylamide ditempatkan di antara dua lempeng gelas.







- Gel di buffer dan reservoir juga mengandung buffer. The pH dipilih untuk memastikan protein tetap bermuatan selama pemisahan.
- Metoda yang paling umum adalah menggunakan buffer pH tinggi untuk memastikan semua protein bermuatan negatif. Pada kondisi ini semua protein akan bergerak dengan arah yang sama dalam gel

# Visualisasi protein dalam gel

---

Pita-pita protein pada gel harus divisualisasi setelah pemisahan, yaitu dengan cara **staining**.

Ada dua pewarna yang biasa digunakan:

1. **Coomassie Brilliant Blue**. Gel diinkubasi dalam larutan zat warna dalam alkohol yang diasamkan, yang akan berikatan dengan protein dan menghasilkan pita protein yang berwarna biru.
2. **Silver Staining**. Merupakan metoda yang lebih kompleks, tetapi menghasilkan sensitivitas yang lebih baik. Pita protein menjadi berwarna coklat gelap.

- 
- It is possible to quantify the stained bands by scanning the gel in a densitometer. The disadvantage with this, however, is that different proteins take up stains to differing extents. The resultant scans are only accurate if a standard curve is available for each protein and this is rarely the case.

# Scanning gel pada densitometer

