

Biokimia Tumbuhan (PROTEIN & ENZIMOLOGI)

Prof. Dr. Saryono, 0811767786

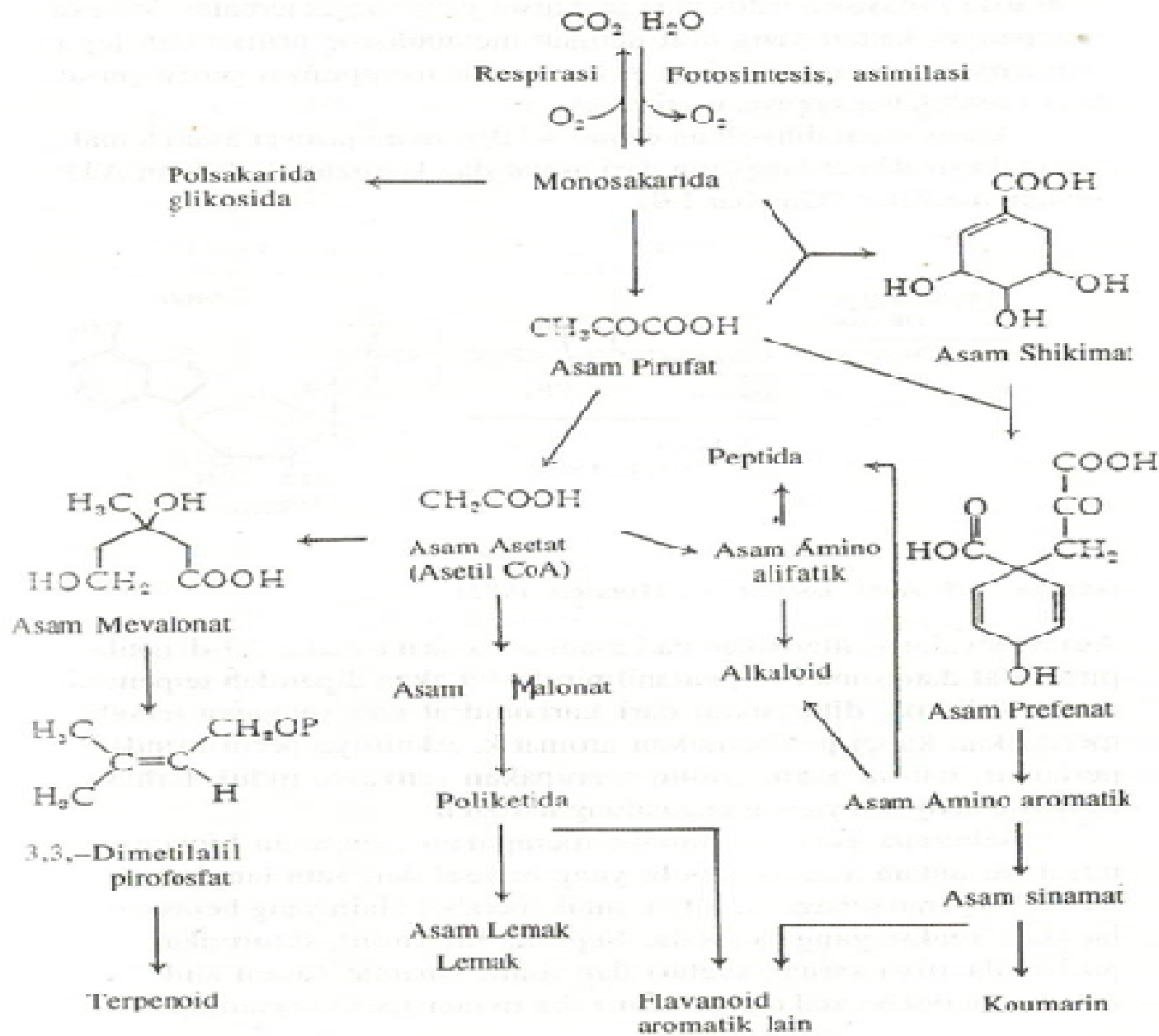
Saryono_ur@yahoo.com

PENGANTAR

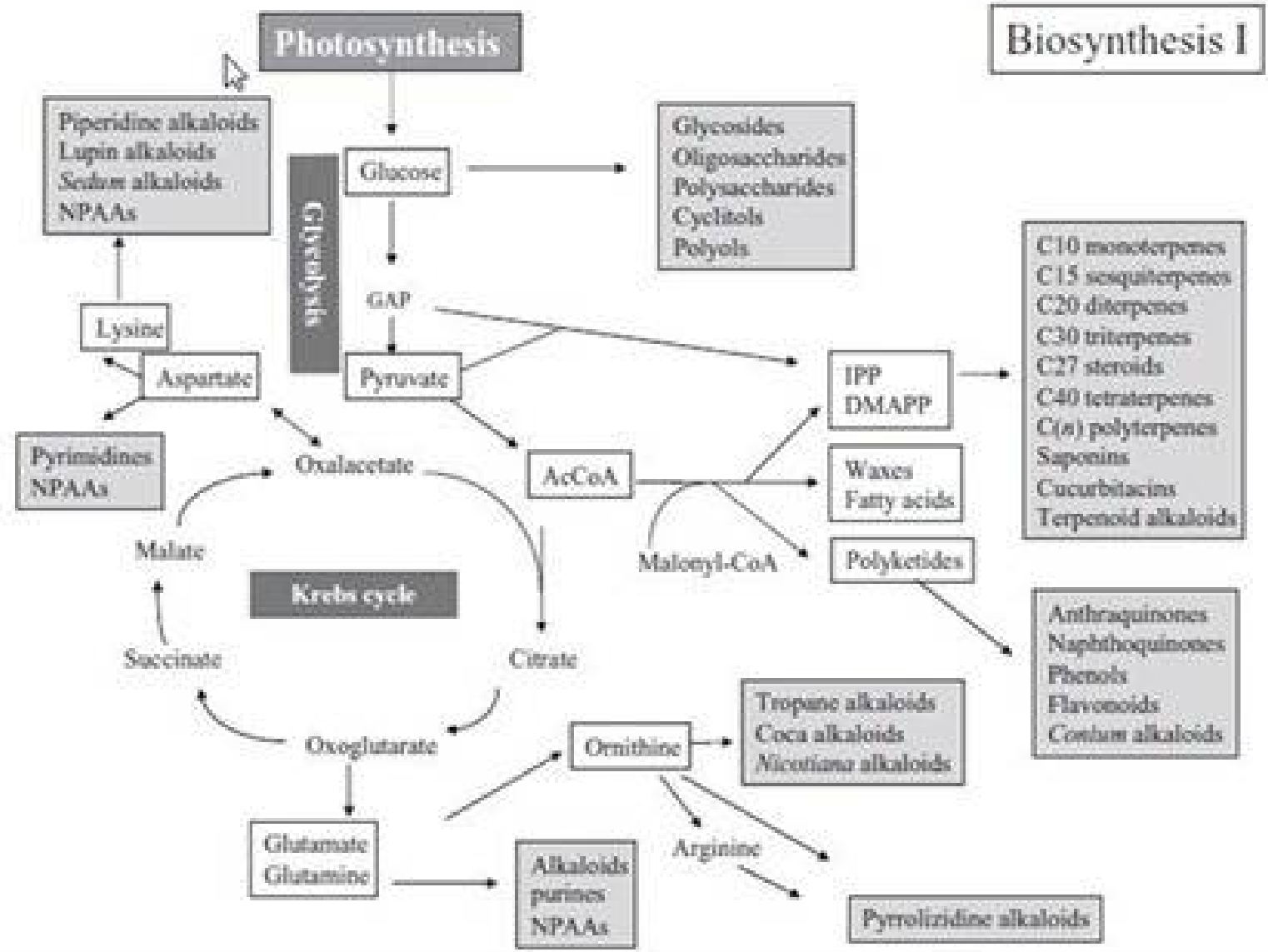
- BIOKIMIA MENGENAL SEGALA PROSES KIMIA YANG TERJADI DI DALAM SEL/MACHLUK HIDUP
- SAMA SEPERTI ZAT TAK HIDUP, PADA SEL/MACHLUK HIDUP JUGA DIBANGUN OLEH KUMPULAN ZAT YANG TAK HIDUP MEMBENTUK BIOMOLEKUL
- BIOMOLEKUL MEMILIKI BERAT MOLEKUL LEBIH BESAR DENGAN STRUKTUR YANG SANGAT KOMPLEKS
- KOMPONEN SEL HIDUP JUGA DAPAT DIISOLASI DAN DIPELAJARI: DIMANA ZAT-ZAT TERSEBUT BERCAMPUR, BEREAKSI DAN BERINTERAKSI MEMBENTUK SUATU KOMPOSISI YANG RUMIT DAN TERORGANISASI DENGAN BAIK

BIOMOLEKUL

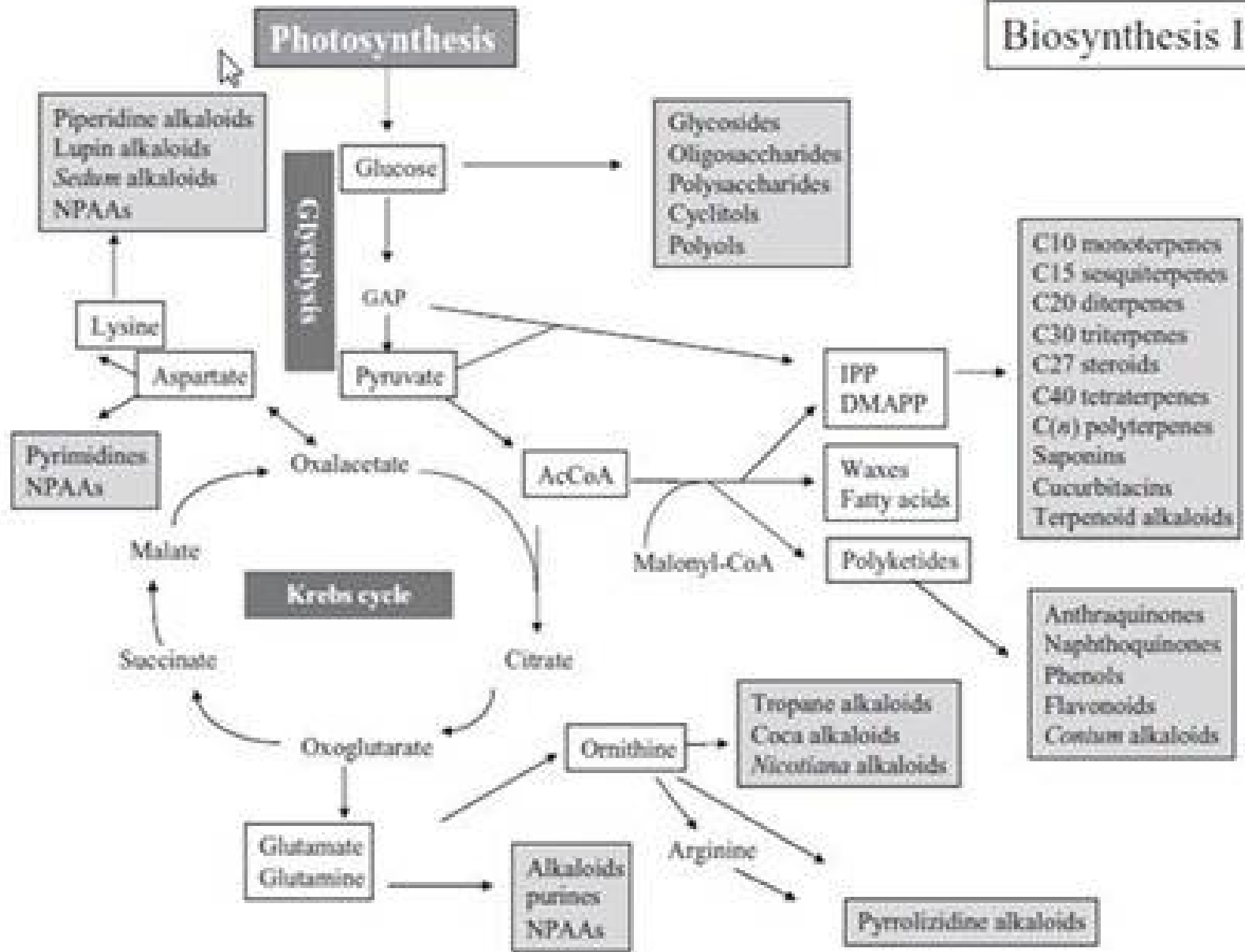
- PROTEIN SUATU POLIMER DARI ASAM AMINO, BERPERAN SEBAGAI ENZIM, ALAT TRANSPOR, RACUN, ANTI BODI, HORMON, PEMBENTUK MEMBRAN SEL
- ASAM NUKLEAT SUATU POLIMER DARI NUKLEOTIDA: SEBAGAI FAKTOR GENETIK, KOENZIM, PEMBAWA ENERGI, SINTESIS PROTEIN
- LIPID: PEMBENTUK MEMBRAN SEL, HORMON, SUMBER ENERGI
- POLISAKARIDA: SEBAGAI SUMBER ENERGI, CADANGAN ENERGI, KOMPONEN MEMBRAN, DAN DINDING SEL (**Tugas pelajari makromolekul pada sel hidup**) **I.4318.**



Gambar 1.7. Bagan utama metabolisme sekunder atau asetil koenzim A.



Biosynthesis I



PROTEIN: suatu makro molekul yang dibangun oleh unit unit asam amino melalui ikatan peptida.

ASAM AMINO

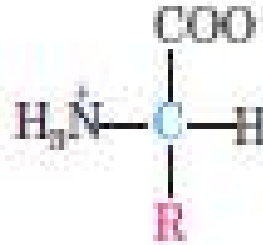


FIGURE 3-2 General structure of an amino acid. This structure is common to all but one of the α -amino acids. (Proline, a cyclic amino acid, is the exception.) The R group or side chain (red) attached to the α carbon (blue) is different in each amino acid.

TERDAPAT SEKITAR 3000 MOLEKUL PROTEIN PADA E. COLI, SEKITAR 5JT PROTEIN PADA MANUSIA, DAN TIDAK SATUPUN YANG MEMILIKI STRUKTUR YANG SAMA DGN PROTEIN PADA E.COLI, WALAUPUN FUNGSINYA SAMA. SEKITAR 1.200.000 SPESIES YANG ADA DI BUMI DIPERKIRAKAN 10^{10} SAMPAI 10^{12} JENIS PROTEIN

TABLE 3-1 Properties and Conventions Associated with the Common Amino Acids Found in Proteins

Amino acid	Abbreviation/ symbol	M_r	pK_a values			pI	Hydropathy index*	Occurrence in proteins (%) [†]
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (R group)			
Nonpolar, aliphatic								
R groups								
Glycine	Gly G	75	2.34	9.60		5.97	-0.4	7.2
Alanine	Ala A	89	2.34	9.69		6.01	1.8	7.8
Proline	Pro P	115	1.99	10.96		6.48	1.6	5.2
Valine	Val V	117	2.32	9.62		5.97	4.2	6.6
Leucine	Leu L	131	2.36	9.60		5.98	3.8	9.1
Isoleucine	Ile I	131	2.36	9.68		6.02	4.5	5.3
Methionine	Met M	149	2.28	9.21		5.74	1.9	2.3
Aromatic R groups								
Phenylalanine	Phe F	165	1.83	9.13		5.48	2.8	3.9
Tyrosine	Tyr Y	181	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.3	3.2
Tryptophan	Trp W	204	2.38	9.39		5.89	-0.9	1.4
Polar, uncharged								
R groups								
Serine	Ser S	105	2.21	9.15		5.68	-0.8	6.8
Threonine	Thr T	119	2.11	9.62		5.87	-0.7	5.9
Cysteine	Cys C	121	1.96	10.28	8.18	5.07	2.5	1.9
Asparagine	Asn N	132	2.02	8.80		5.41	-3.5	4.3
Glutamine	Gln Q	146	2.17	9.13		5.65	-3.5	4.2
Positively charged								
R groups								
Lysine	Lys K	146	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.9	5.9
Histidine	His H	155	1.82	9.17	6.00	7.59	-3.2	2.3
Arginine	Arg R	174	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.5	5.1
Negatively charged								
R groups								
Aspartate	Asp D	133	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.5	5.3
Glutamate	Glu E	147	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.5	6.3

*A scale combining hydrophobicity and hydrophilicity of R groups; it can be used to measure the tendency of an amino acid to seek an aqueous environment (- values) or a hydrophobic environment (+ values). See Chapter 11. From Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.

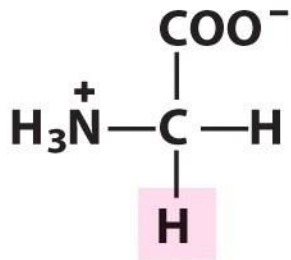
[†]Average occurrence in more than 1,150 proteins. From Doolittle, R.F. (1980) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599-623, Plenum Press, New York.

BERBAGAI FUNGSI PROTEIN

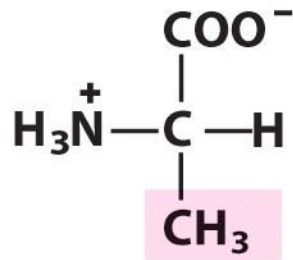
(pembagian protein berdasarkan fungsinya):

- ENZIM
- PROTEIN STRUKTURAL
- PROTEIN TRANSPORT
- PROTEIN MOTORIK
- PROTEIN PENYIMPAN
- PROTEIN PEMBERI ISYARAT
- PROTEIN RESEPTOR
- PROTEIN PENGATUR GEN
- PROTEIN DGN FUNGSI KHUSUS (RACUN, ANTI BODI) **2.10318**

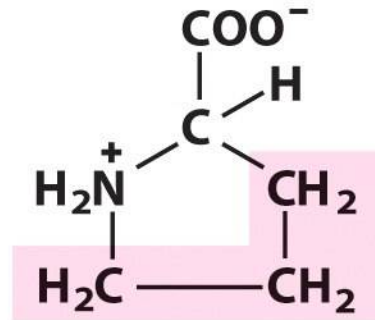
Nonpolar, aliphatic R groups



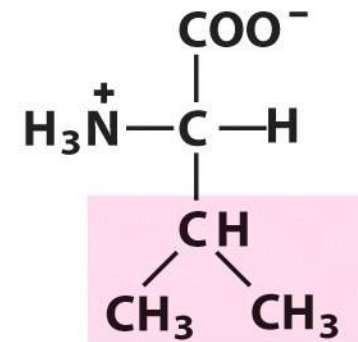
Glycine



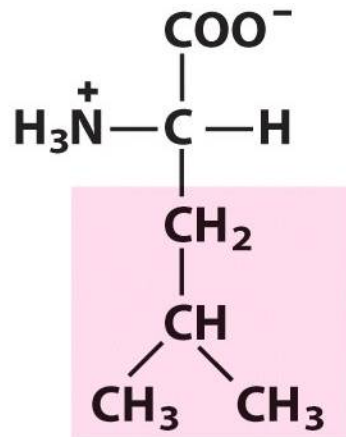
Alanine



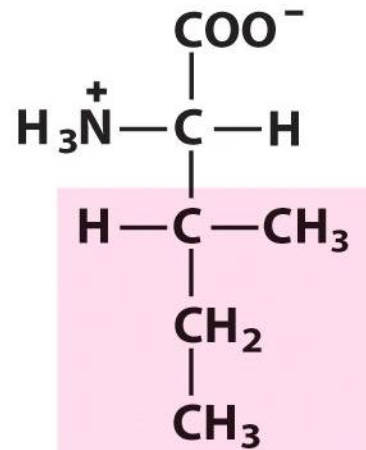
Proline



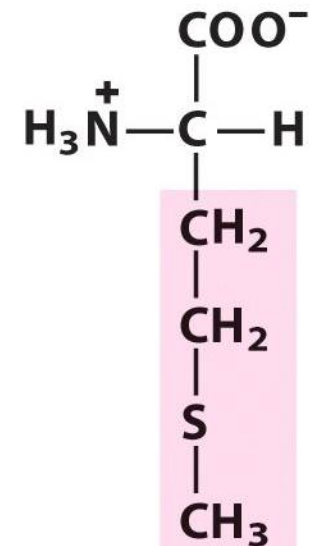
Valine



Leucine

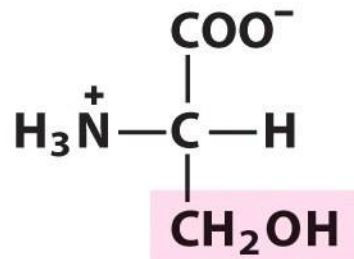


Isoleucine

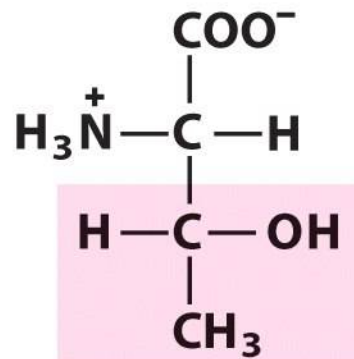


Methionine

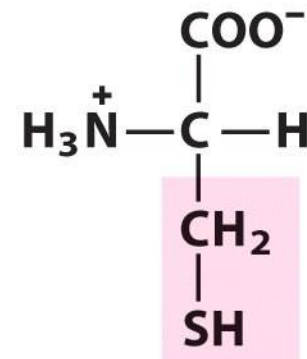
Polar, uncharged R groups



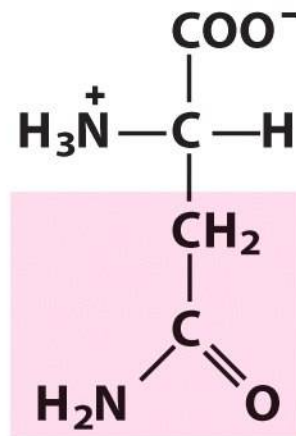
Serine



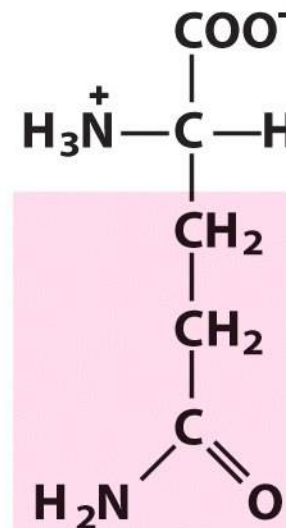
Threonine



Cysteine

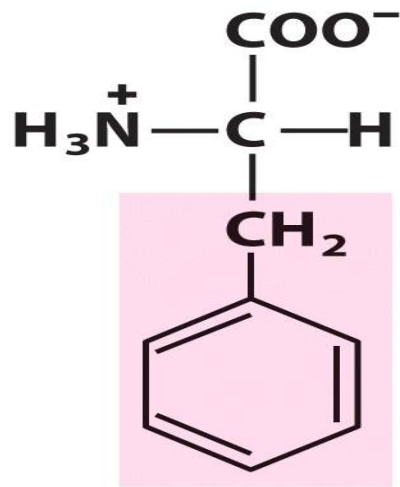


Asparagine

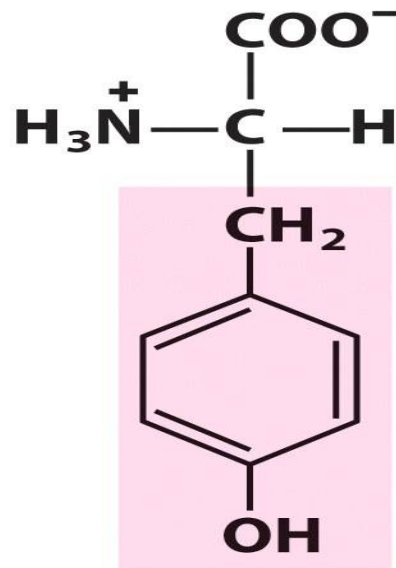


Glutamine

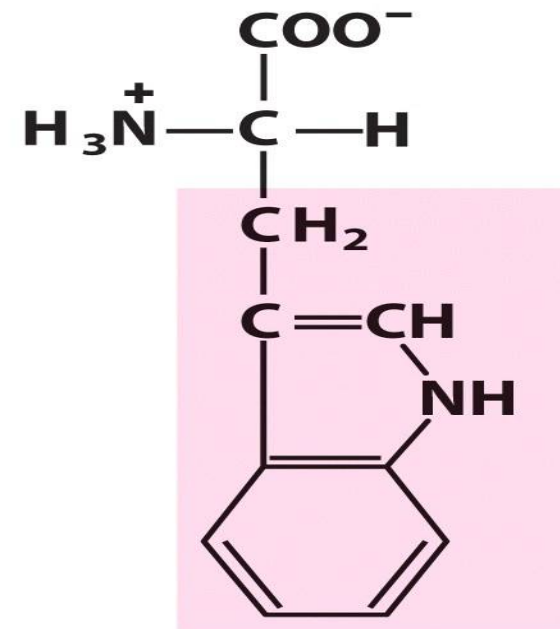
Aromatic R groups



Phenylalanine



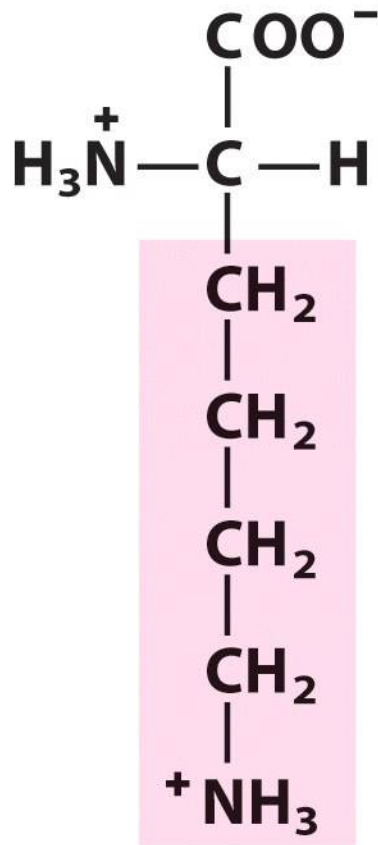
Tyrosine



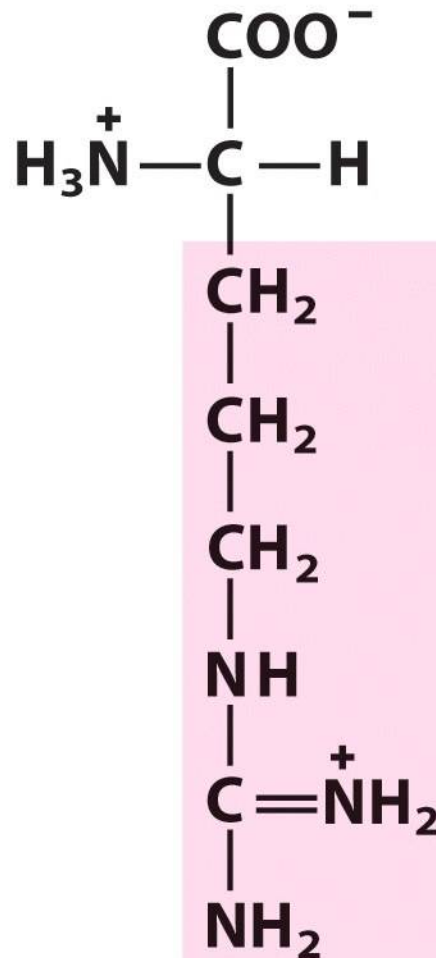
Tryptophan

Phenylalanine (Phe) & Tryptophan (Trp) non-polar
Tyrosine (Tyr) polar

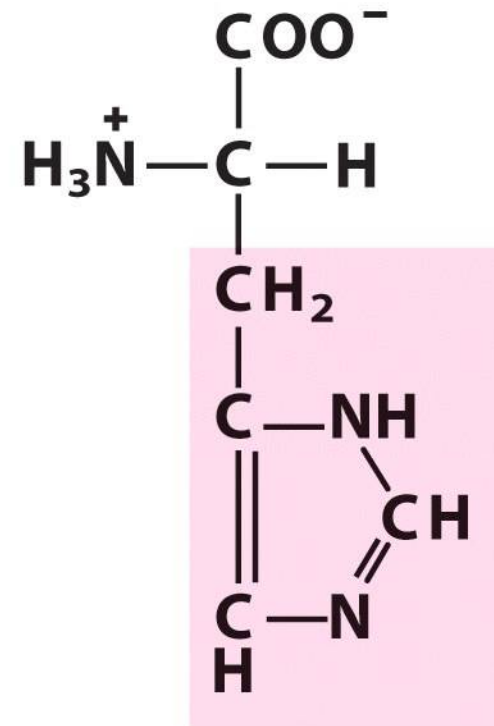
Positively charged R groups



Lysine

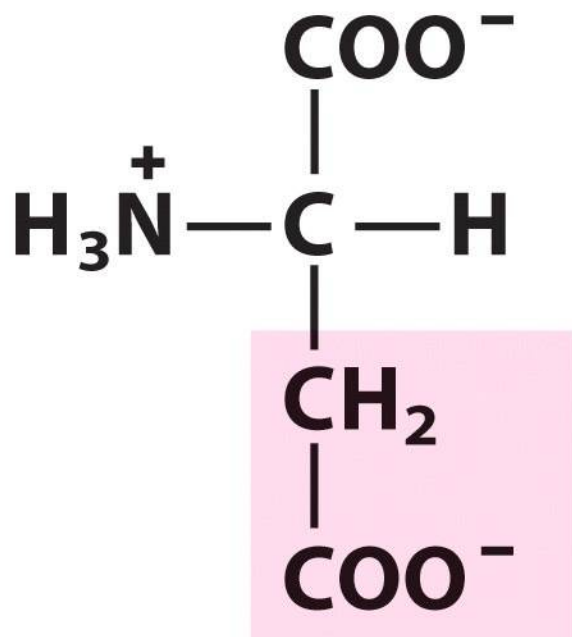


Arginine

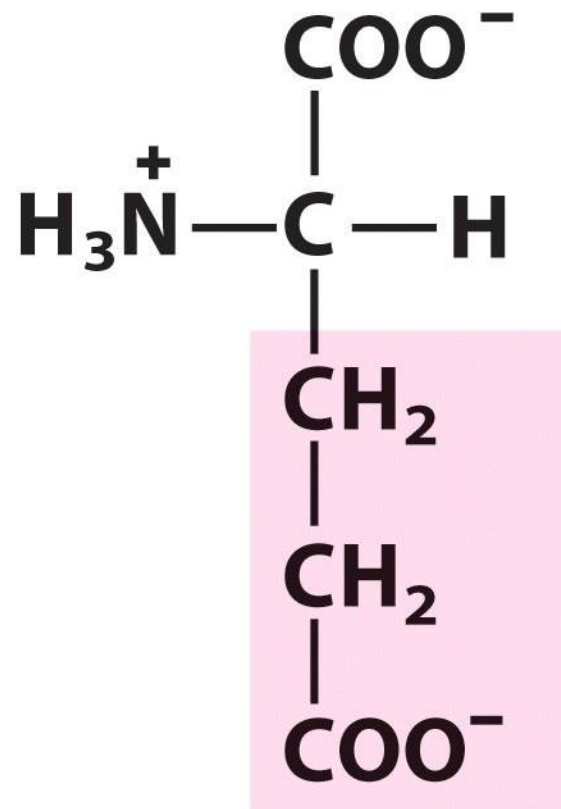


Histidine

Negatively charged R groups



Aspartate



Glutamate

PEPTIDA & PROTEIN

- PEPTIDA

- Polimer a.a < 100
- Ikatan peptida
- Berbagai peptida ada yang memiliki aktivitas biologis

- PROTEIN

- Polimer a.a. umumnya > 100
- Ikatan peptida
- Berbagai fungsi

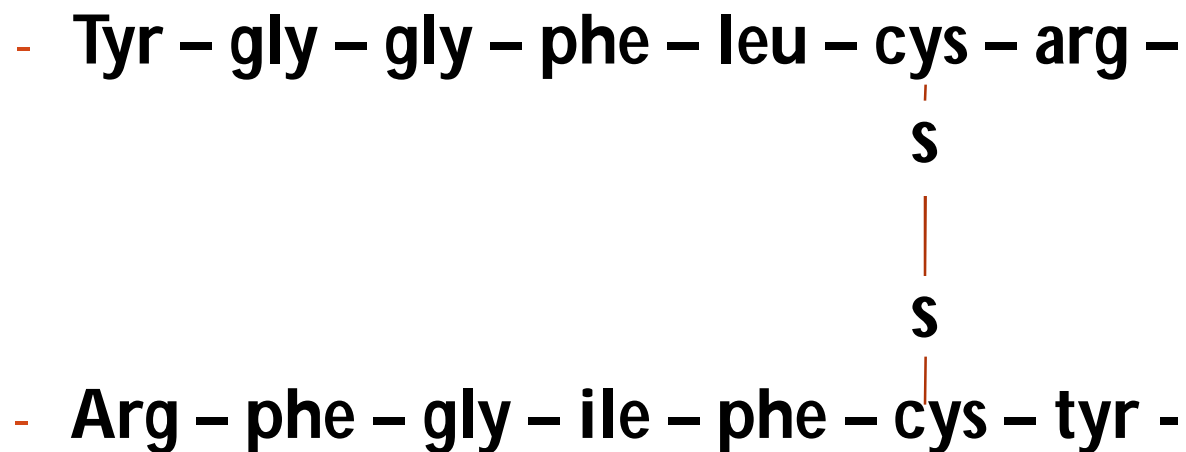
Tingkatan struktur protein

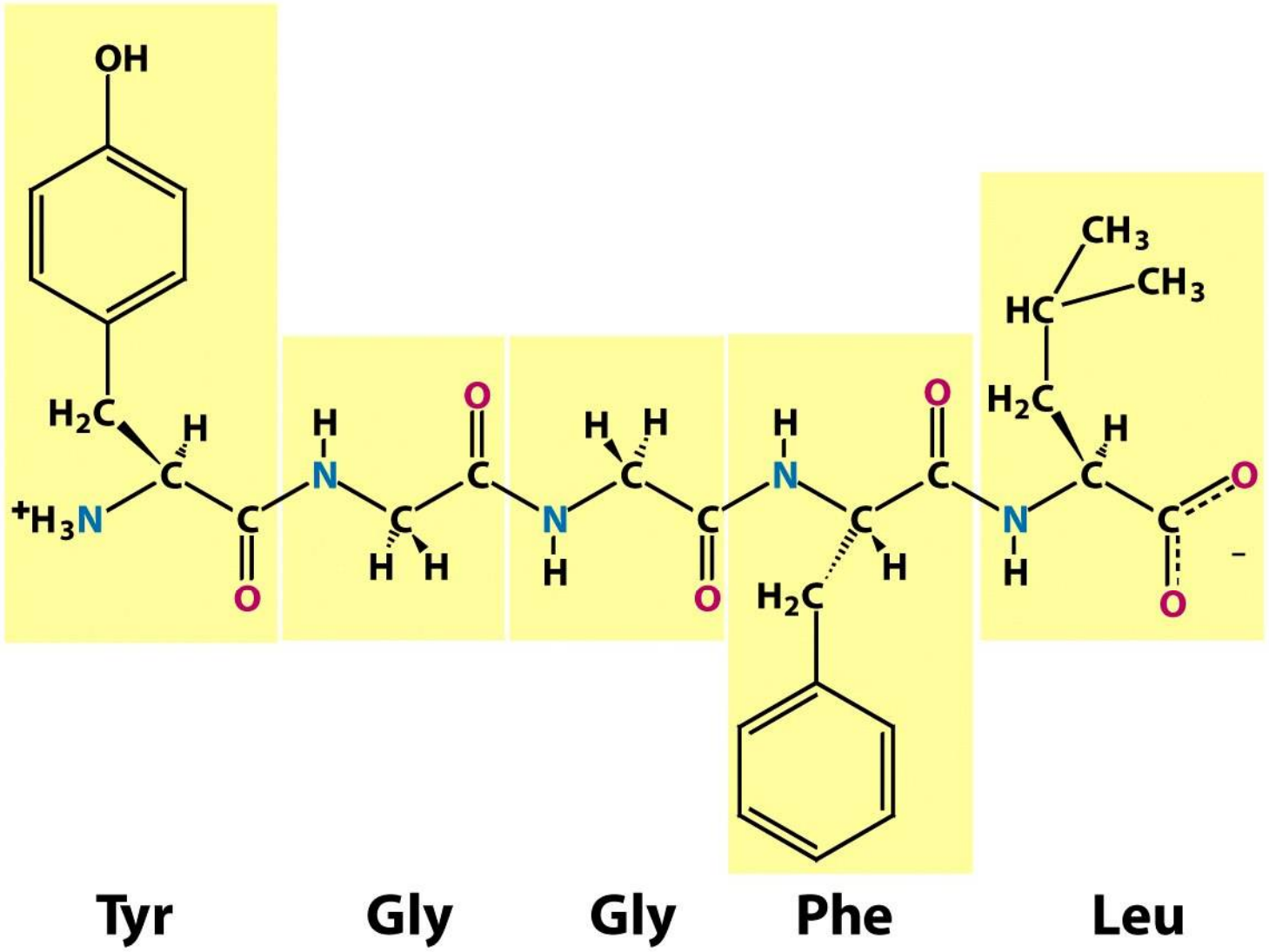
- Struktur primer
- Struktur sekunder
- Struktur tersier
- Struktur quartener

Definisi masing-masing tingkatan lihat handout review.

STRUKTUR PRIMER

- STRUKTUR PRIMER PROTEIN DITENTUKAN OLEH IKATAN KOVALEN ANTARA RESIDU ASAM AMINO YG MEMBENTUK IKATAN PEPTIDA DGN PENULISAN SAMA SEPERTI PENULISAN MOLEKUL SENYAWA ORGANIK.





Amino-terminal residue



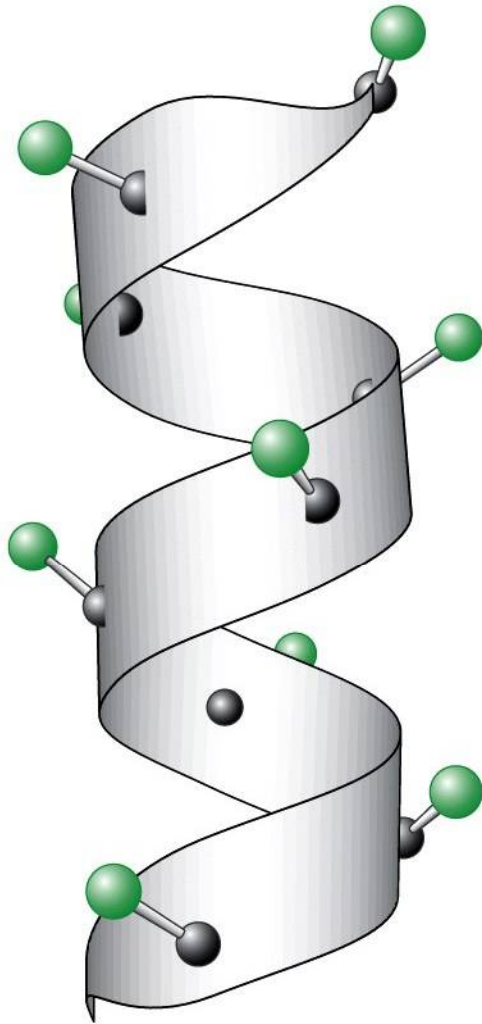
Carboxyl-terminal residue

Figure 2-19
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

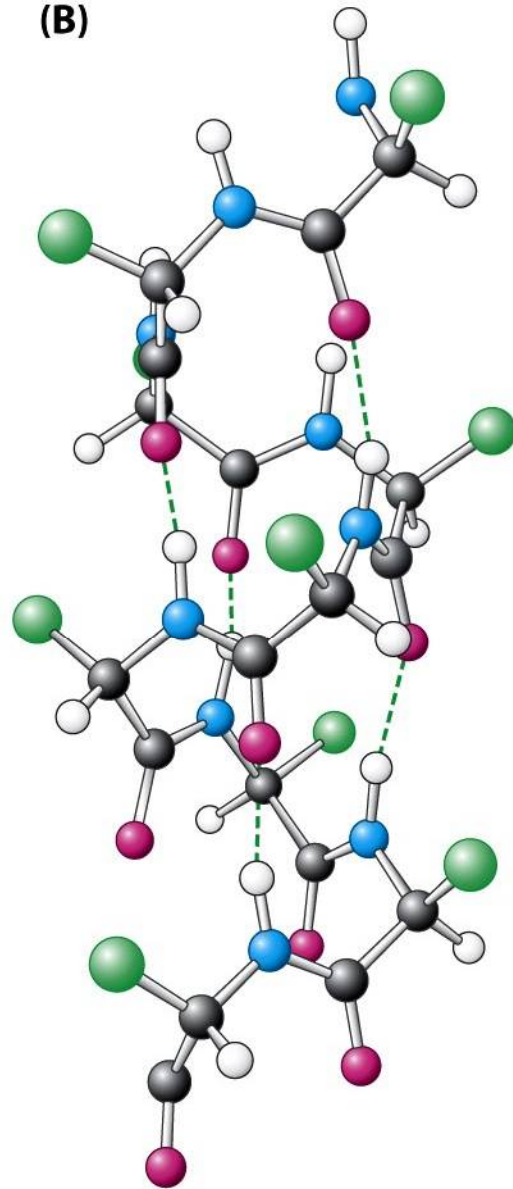
Struktur sekunder

- Lipatan dari struktur primer karena pembentukan ikatan hidrogen antara H dari ggs $-NH$ dgn O dari gugus $-C=O$ pada tulang punggung peptida atau protein
- Akan memungkinkan terbentuknya konformasi spiral (*helix*)
- Bila ikatan hidrogen terjadi antar polipeptida maka akan terbentuk rantai paralel berkelok (konformasi β) sehingga membentuk struktur lembaran berlipat (*pleated sheet*)
- Terdapat 3 macam struktur sekunder:
 - α -heliks
 - β -sheet (lapisan beta)
 - β -turn

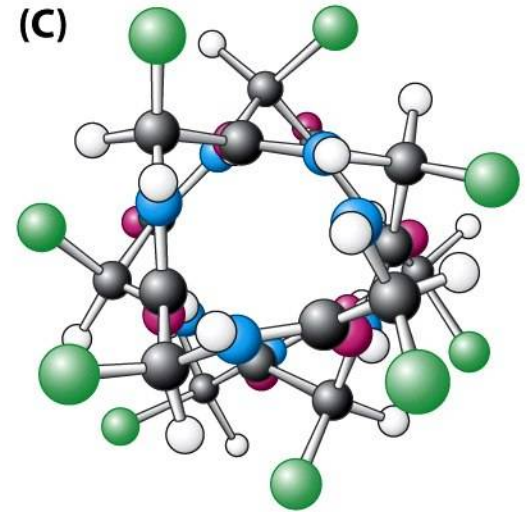
(A)



(B)



(C)



(D)

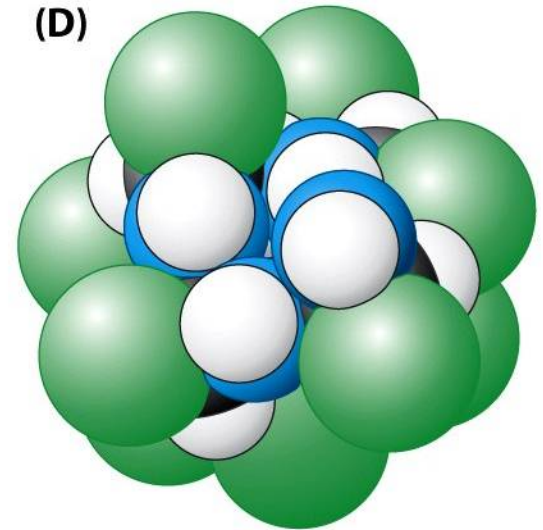
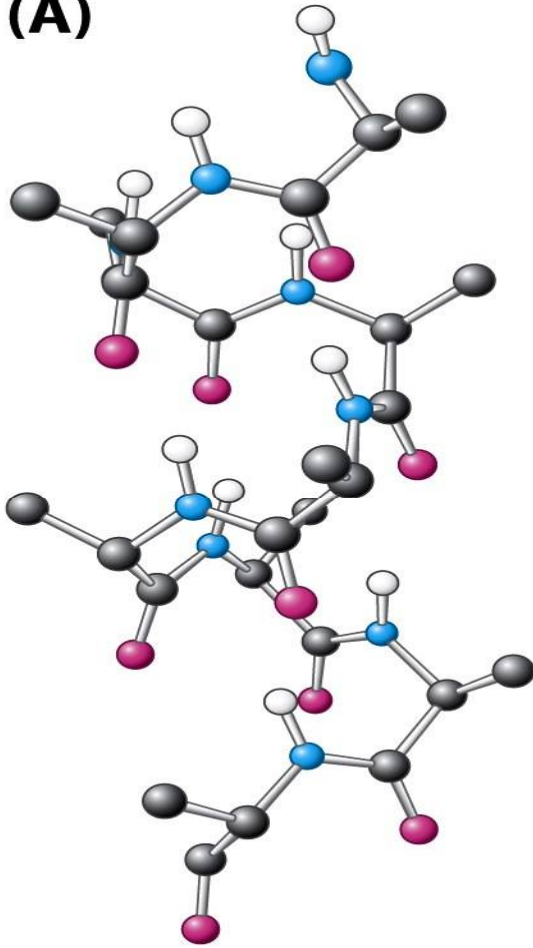
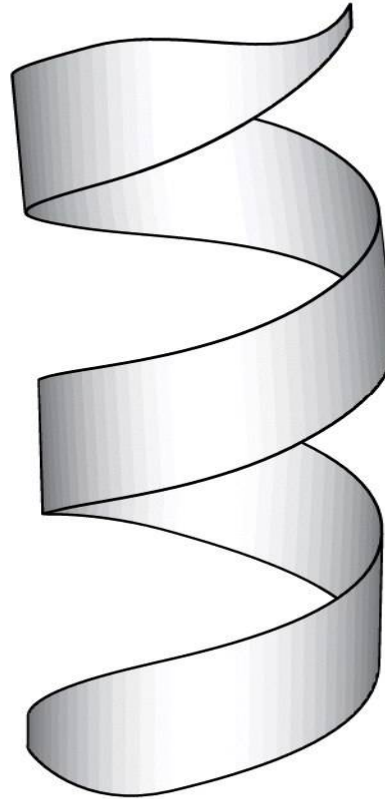


Figure 2-29
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

(A)



(B)



(C)

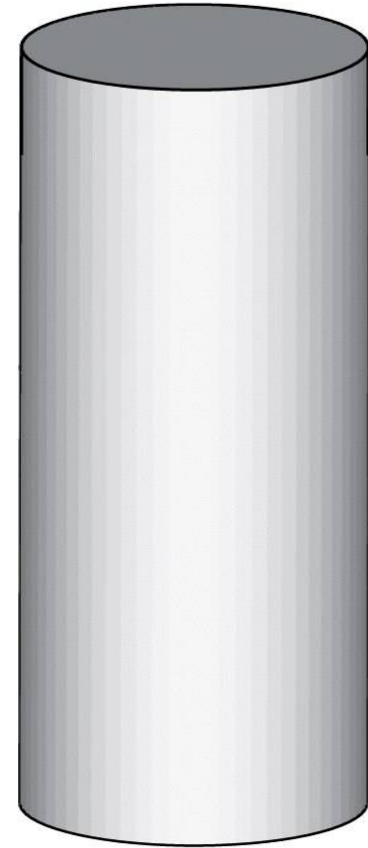
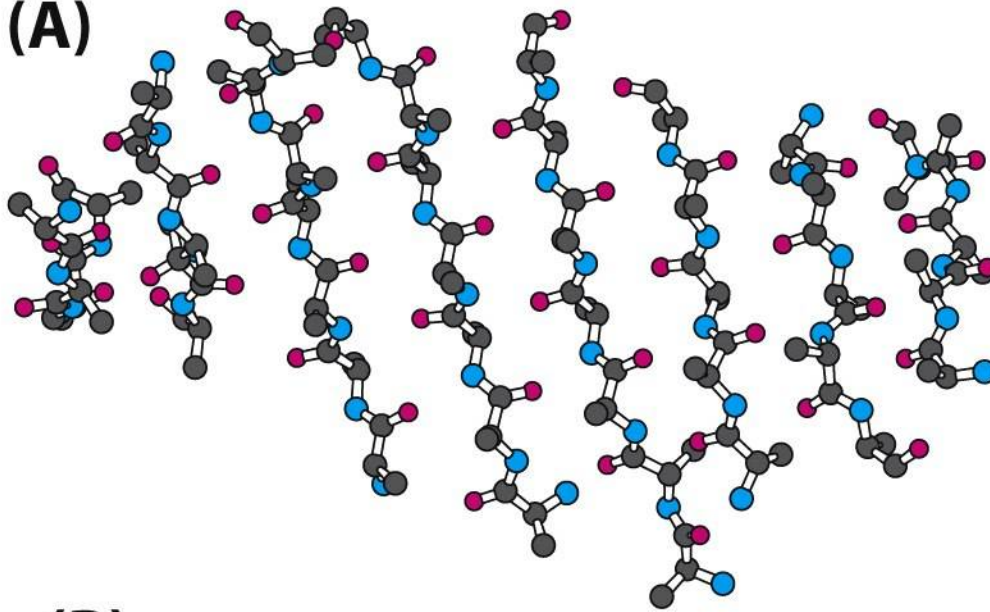


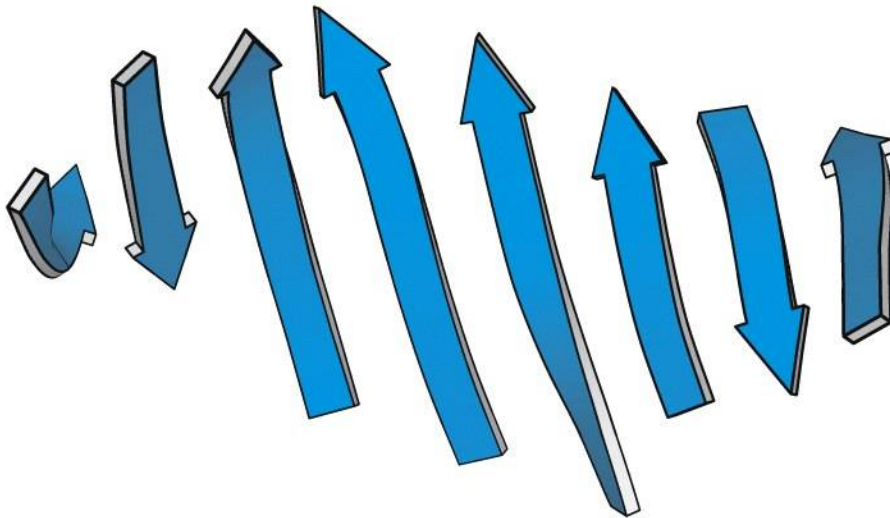
Figure 2-32
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Berbagai cara penggambaran struktur α -heliks

(A)



(B)



A. β -sheet dgn model bola kayu

B. & C. β -sheet model pita, perhatikan arah panah

(C)

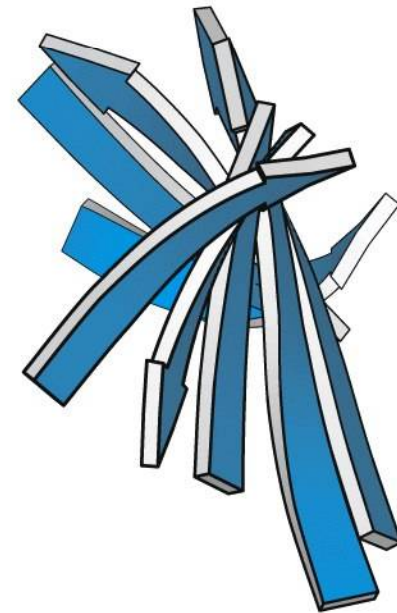


Figure 2-39
Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

Struktur tersier

- **Terbentuk akibat Interaksi struktur-struktur sekunder (α -*helik* atau konformasi β) sehingga melipat (*folding*) dalam suatu rantai polipeptida membentuk struktur 3 dimensi**
- **Distabilkan oleh ikatan kovalen dan non kovalen: Ikatan hidrogen, ionik, interaksi hidrofob, van der waals dan ikatan disulfida antar rantai samping rantai polipeptida**

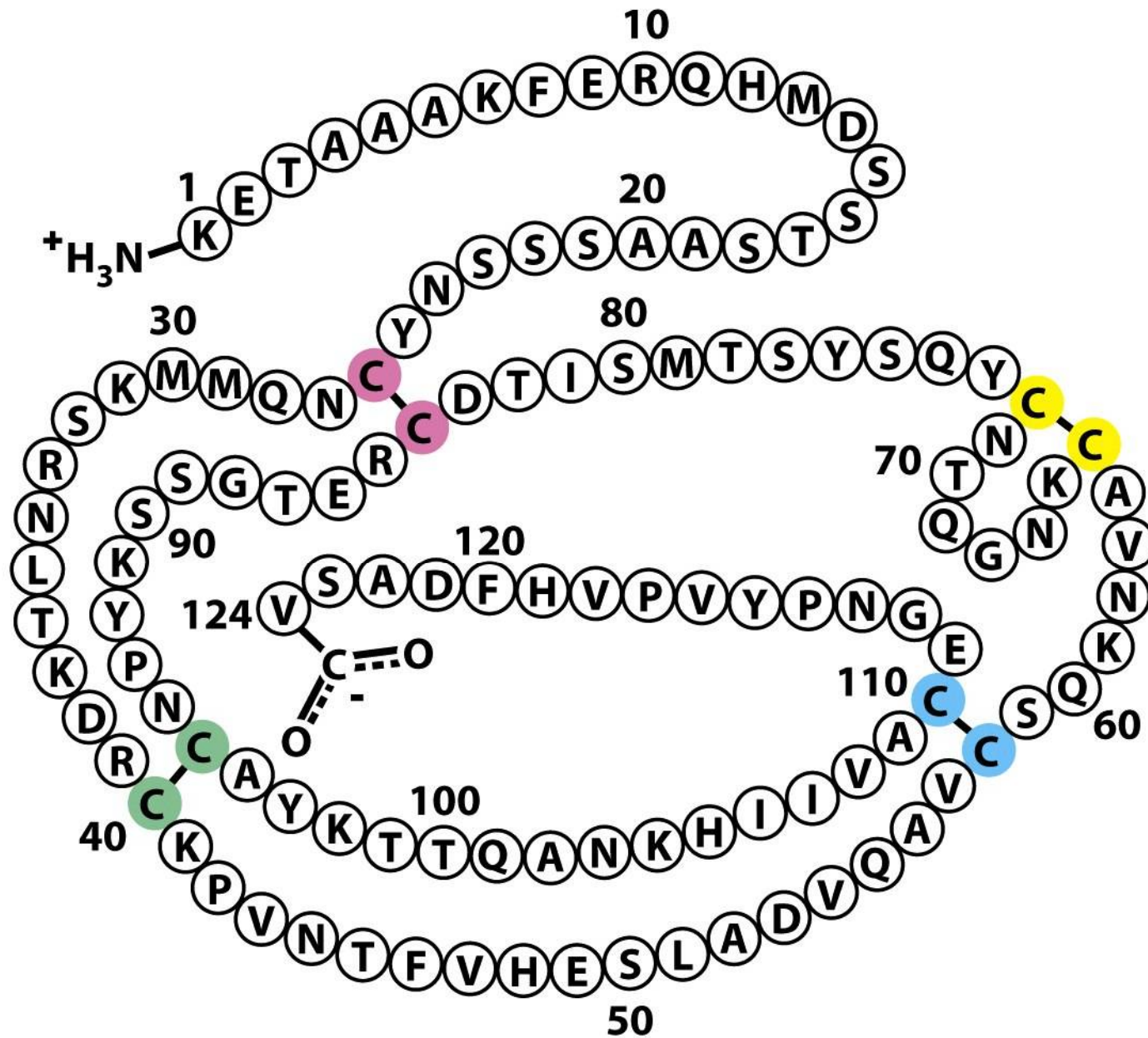


Figure 2-56
 Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W.H. Freeman and Company

Sekuens asam amino ribonuklease

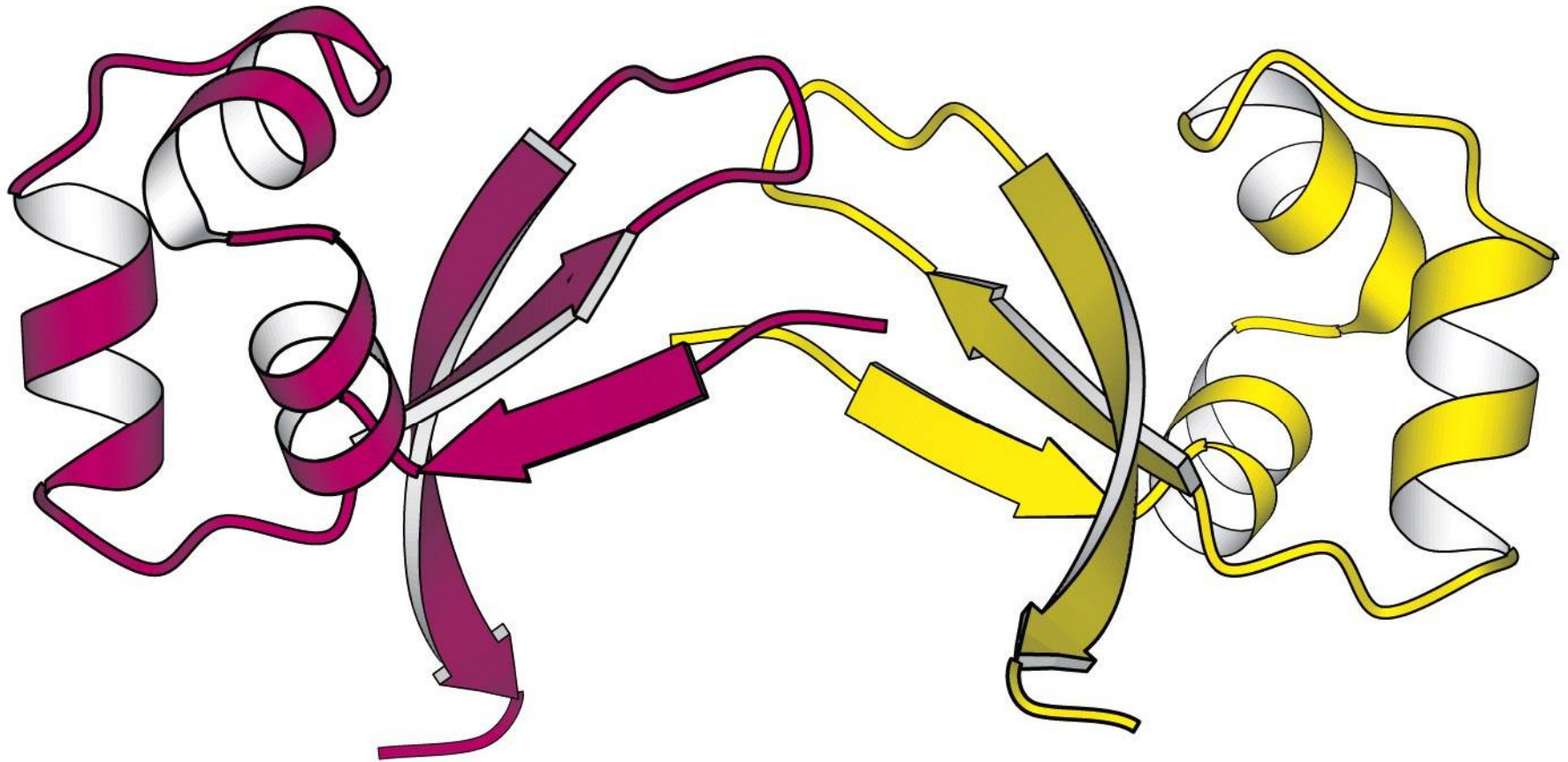
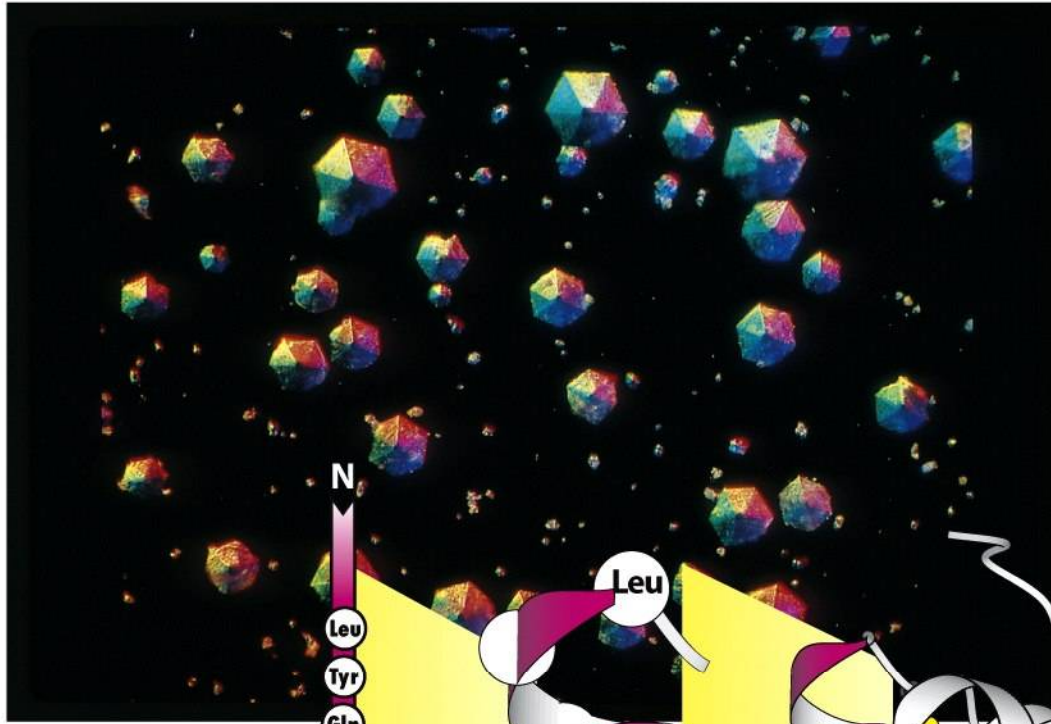


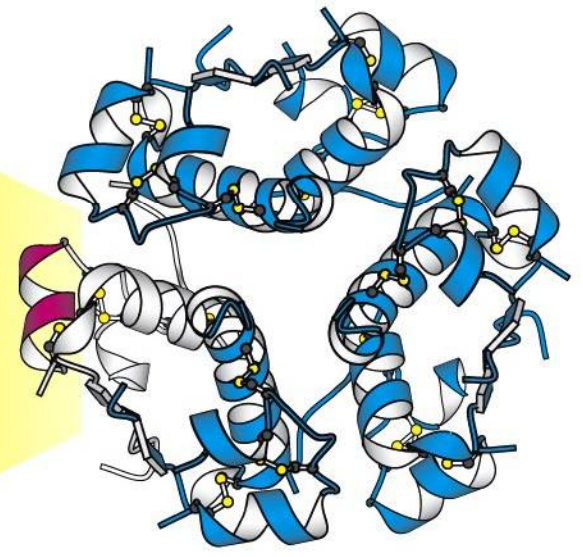
Figure 2-53
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

STRUKTUR KUARTENER

- PADA UMUMNYA PROTEIN GLOBULAR DENGAN BM >50.000 DALTON MERUPAKAN SUATU OLIGOMER YANG DIBENTUK DARI BEBERAPA POLIPEPTIDA
- SEBAHAGIAN BESAR PROTEIN OLIGOMER AKAN MENGALAMI DISOSIASI PADA pH TINGGI ATAU RENDAH ATAU DALAM LARUTAN UREA ATAU LARUTAN GARAM BERKONSENTRASI TINGGI
- DENATURASI PROTEIN GLOBULAR INI TERJADI AKIBAT DISOSIASI RANTAI POLIPEPTIDA DAN MERENGGANJANYA SATUAN RANTAI POLIPEPTIDA



N
Leu
Tyr
Gln
Leu
Glu
Asn
Tyr
C



Primary structure **Secondary structure**

Tertiary structure

Quarternary structure

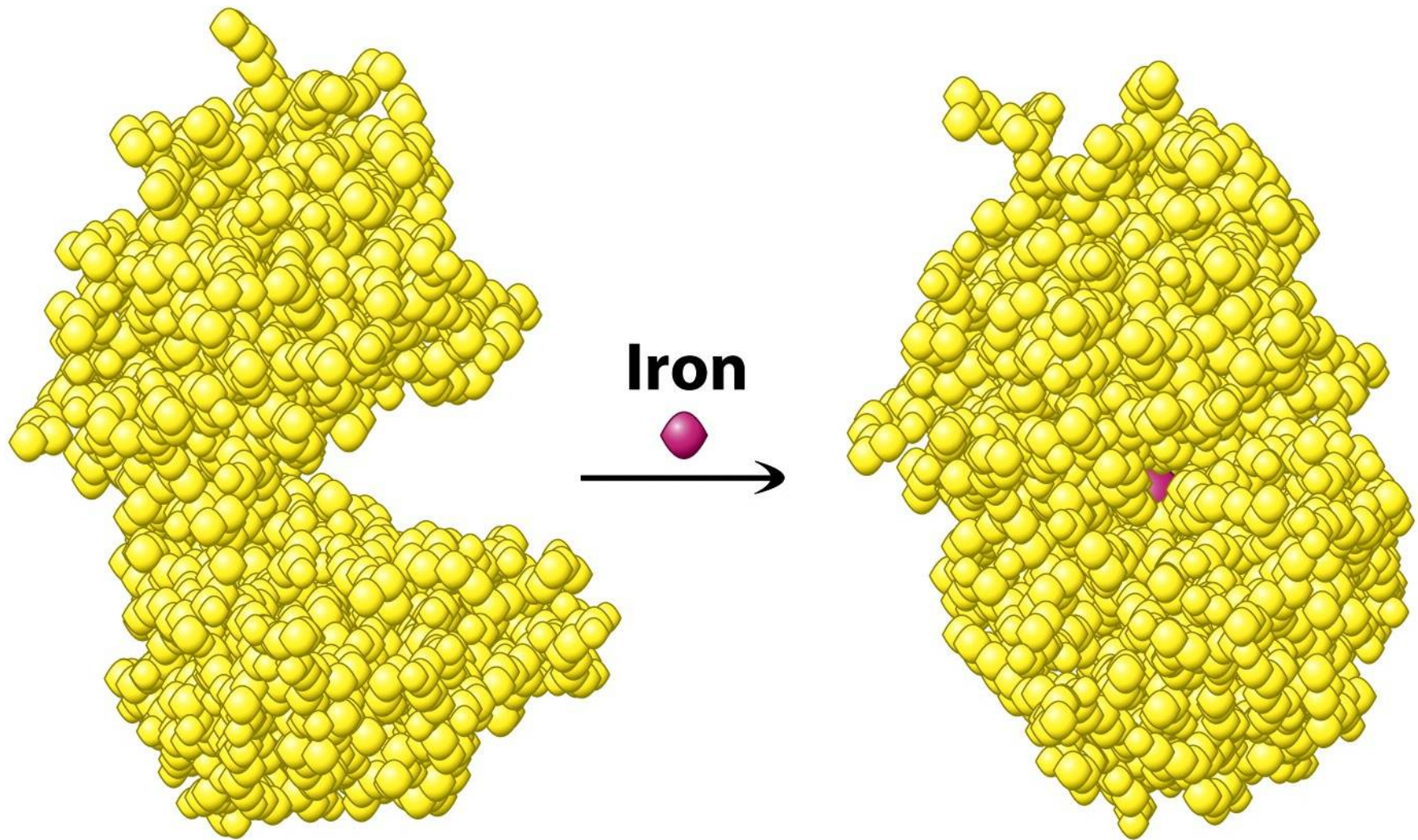


Figure 2-3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

STRUKTUR KWARTENER DEOKSI HEMOGLOBIN

Contoh protein globular

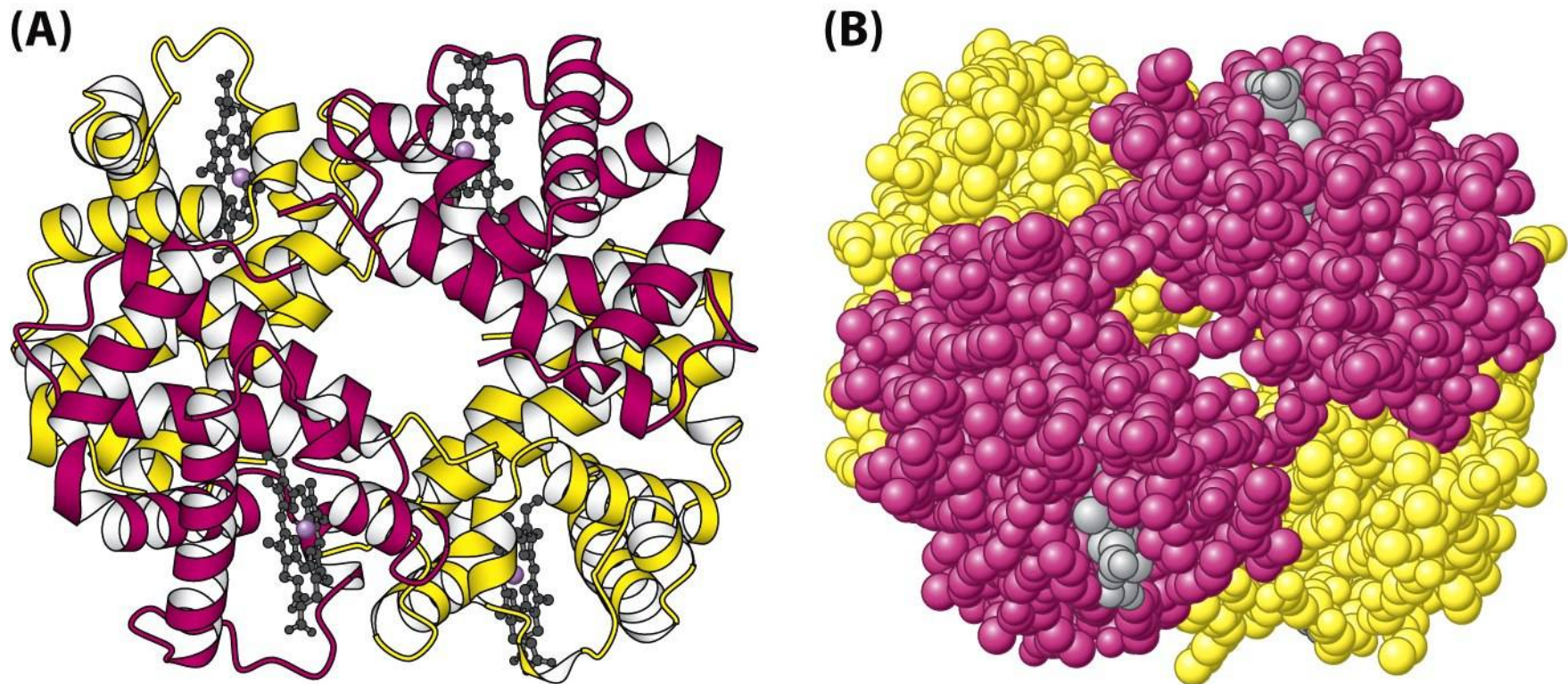


Figure 2-54
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

A. STRUKTUR PITA, B. STRUKTUR BOLA. Hemoglobin terdiri dari 2 rantai α & 2 rantai β

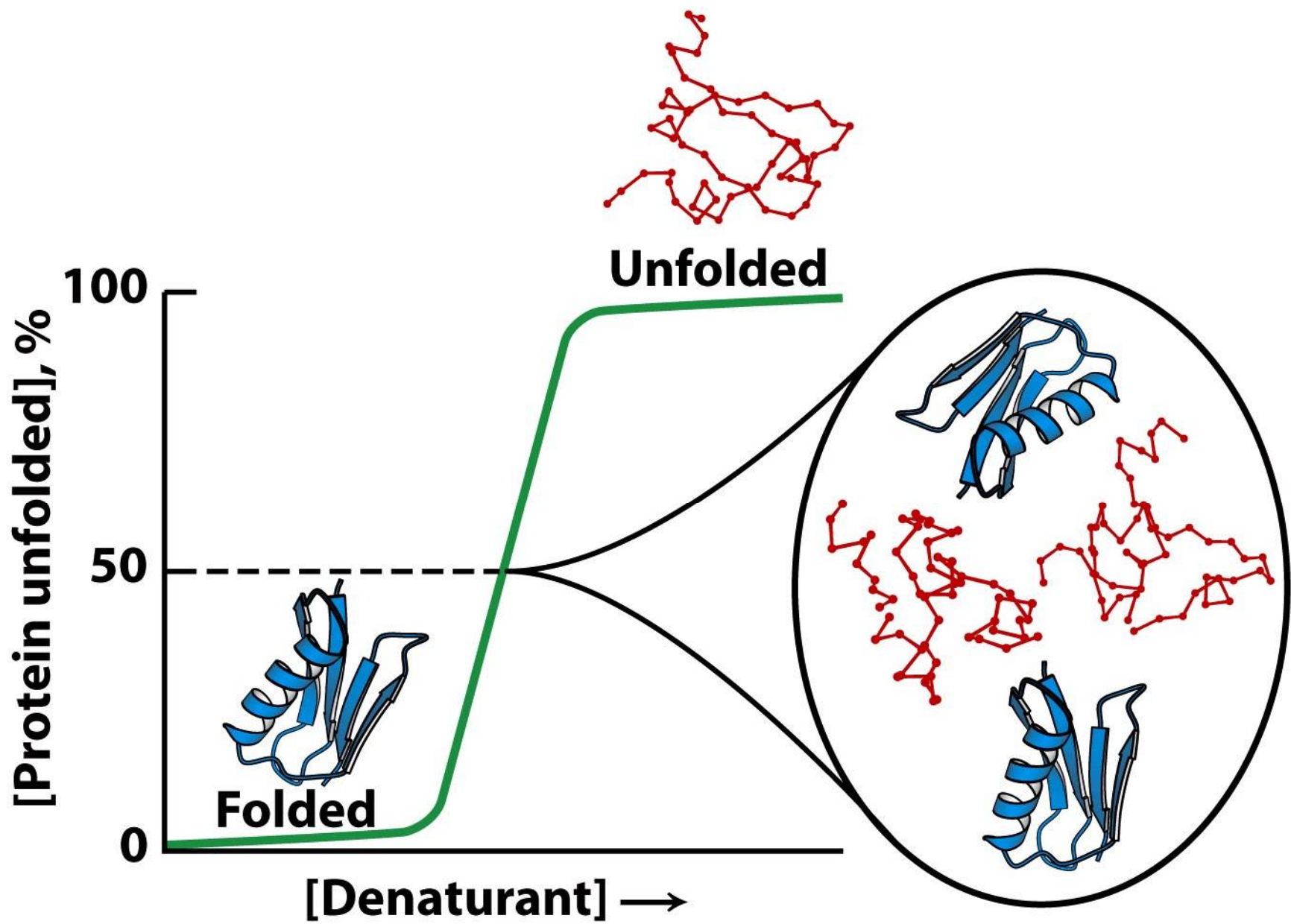


Figure 2-64
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

FAKTOR PENDENATURASI PROTEIN

- Temperatur & pH ekstrim
- Detergen
- Pengocokan kuat
- Pelarut organik & garam, karena mengendapkan
- Urea

Protein yg terdenaturasi kehilangan struktur sekunder, tersier dan kwartenernya kehilangan fungsi biologis

TERDENATURASI = UNFOLDED = KUMPARAN
ACA**K** 

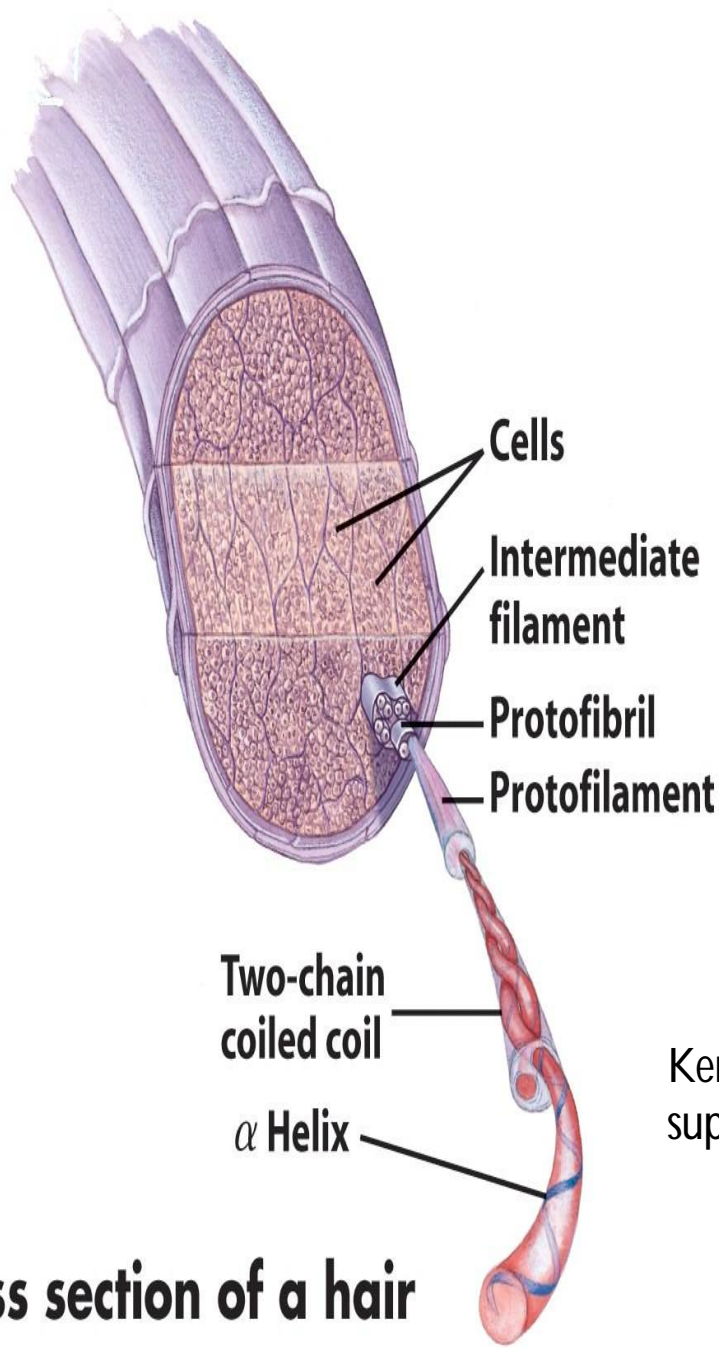
Berdasarkan struktur protein dibagi dua yaitu

- Protein globular: contoh hemoglobin
- Protein serat: contoh keratin, kolagen, sutera.

Struktur protein sangat mempengaruhi fungsinya


PROTEIN SERAT

- Rantai PP tersusun dalam untaian atau lembaran memanjang dgn struktur relatif lebih sederhana dari protein globular
- Memiliki peran penting dalam anatomi dan fisiologi hewan
- Disintesis didalam sel epidermis kulit berbentuk filamen yang kemudian berkumpul membentuk serupa tali atau kabel (konformasi α helix kekanan).
- Terbentuknya struktur sangat ditentukan oleh jenis asam amino penyusunnya, jika PP banyak mengandung glu bagian rantai sulit membentuk helix karena muatan negatif pada rantai samping akan tolak-menolak.



Cross section of a hair

Keratin α helix — 

Two-chain coiled coil — 

Protofilament {  } 20-30 Å

Protofibril {  }

Keratin dari rambut juga kuat karena juga membentuk serat superheliks. Kuat & kaku karena ikatan disulfida antar heliks

PROTEIN GLOBULAR

- **Rantai PP berlipat menjadi suatu bentuk globular yang kompak**
- **Konformasi lebih kompleks dari protein serat**
- **Fungsi biologis lebih beragam termasuk semua enzim**
- **Fungsi: sebagai sistem tranpor, anti bodi, hormon, komponen membran, ribosom dll**
- **Jika protein globular terdanutasi, struktur rangka ikatan peptida tetap utuh, tetapi rantai polipeptida membuka secara acak dan mengalami perubahan konformasi ruang.**
- **Biasanya menjadi tidak larut pada sistem pH netral.**

Enzim III,

- Biokatalis
- Spesifik
- Selektif

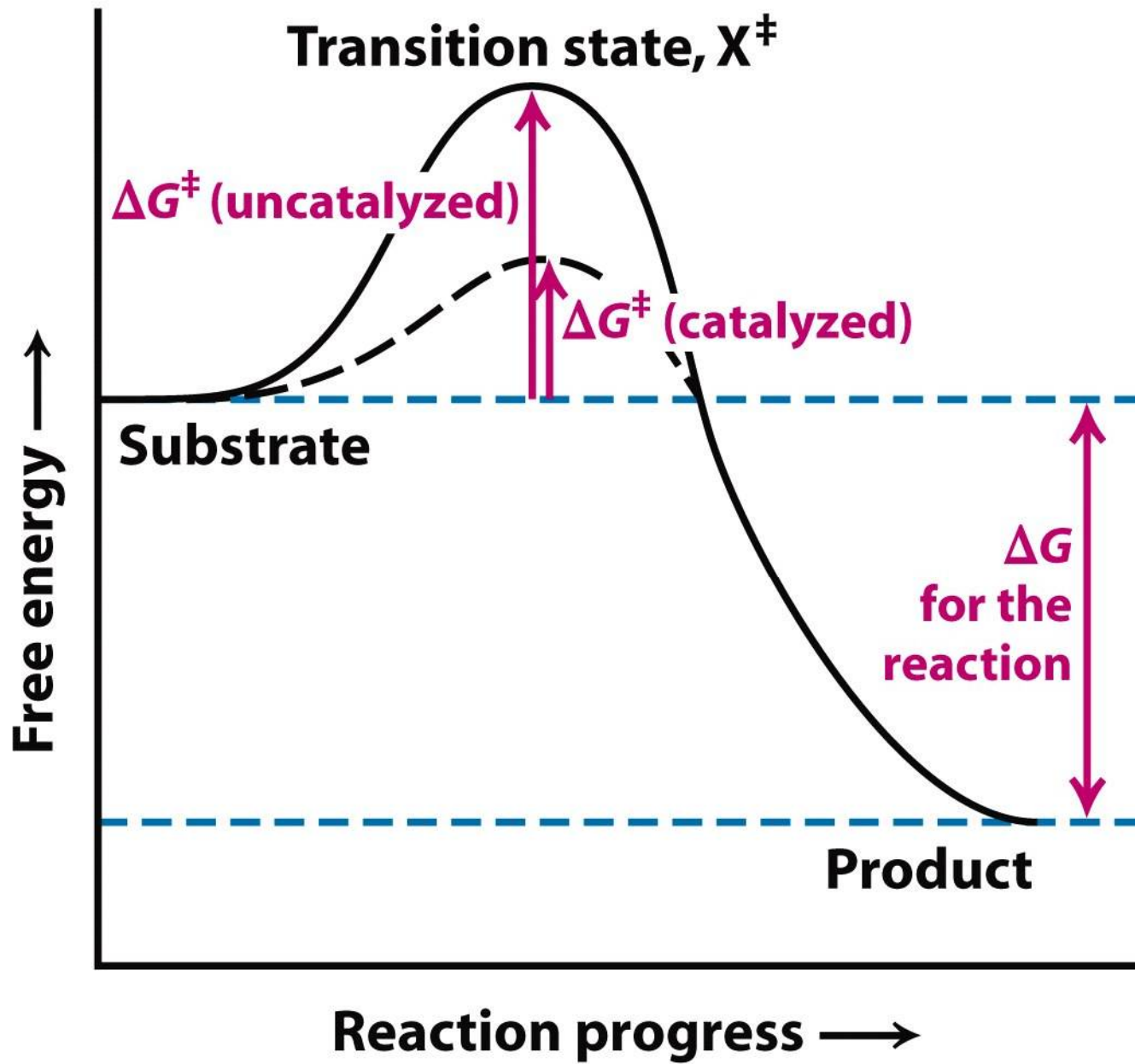


Figure 8-3
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

TABLE 8.8 Six major classes of enzymes

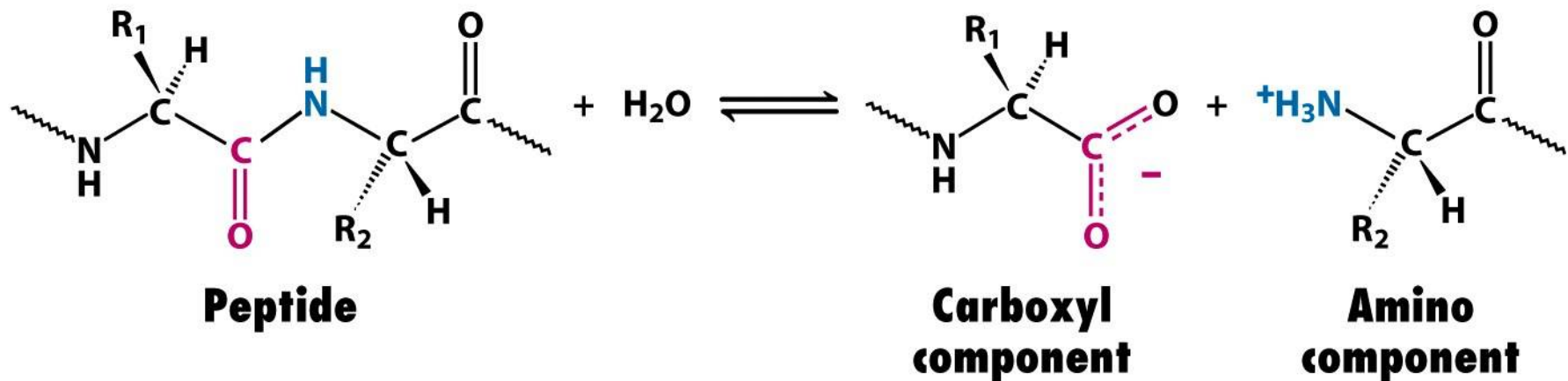
Class	Type of reaction	Example	Chapter
1. Oxidoreductases	Oxidation–reduction	Lactate dehydrogenase	16
2. Transferases	Group transfer	Nucleoside monophosphate kinase (NMP kinase)	9
3. Hydrolases	Hydrolysis reactions (transfer of functional groups to water)	Chymotrypsin	9
4. Lyases	Addition or removal of groups to form double bonds	Fumarase	17
5. Isomerases	Isomerization (intramolecular group transfer)	Triose phosphate isomerase	16
6. Ligases	Ligation of two substrates at the expense of ATP hydrolysis	Aminoacyl-tRNA synthetase	30

Table 8-8
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Penomoran enzim berdasarkan konvensi internasional

- Contoh: EC 2.7.1.1 untuk ATP:glucose phosphotransferase.
- EC= Enzyme classification
- Digit pertama (2): Klas transferase
- Digit kedua (7): subklas fosfotransferase
- Digit ketiga (1): fosfotransferase dengan akseptor gugus OH.
- Digit keempat (1): D-glucosa sebagai akseptor gugus fosfat.

**Reaksi hidrolisis ikatan peptida pada protein,
dapat dikatalisis oleh protease (enzim yang
memotong protein)**



Unnumbered figure pg 206b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Enzim ada yg harus diaktifkan

- Kofaktor
- Koenzim
- Gugus Prostetik
- Holoenzim
- Apoenzim

Apa itu kofaktor enzim?

- Kofaktor enzim:
Komponen kimia
tambahan
yang diperlukan untuk
mengaktifkan enzim

- Ditinjau dari kebutuhannya akan kofaktor, enzim dibagi dalam 2 golongan:
 1. Yang perlu kofaktor untuk aktif
 2. Yan tidak perlu kofaktor untuk aktif

Berdasarkan senyawa kimia yang membentuk kofaktor, ada 2 jenis kofaktor

1. Ion anorganik. Contoh: Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}
2. Ko-enzim: kofaktor yang merupakan senyawa organik (senyawa dengan atom C) atau molekul metalloorganik (kompleks senyawa atom C dengan metal seperti Zn atau Fe).

Banyak vitamin adalah prekursor dari koenzim.

Apoenzim + Ko-faktor \longrightarrow Holoenzim

- Apoenzim : Enzim tidak aktif (bagian protein dari enzim tanpa kofaktornya)
- Holoenzim: Enzim aktif

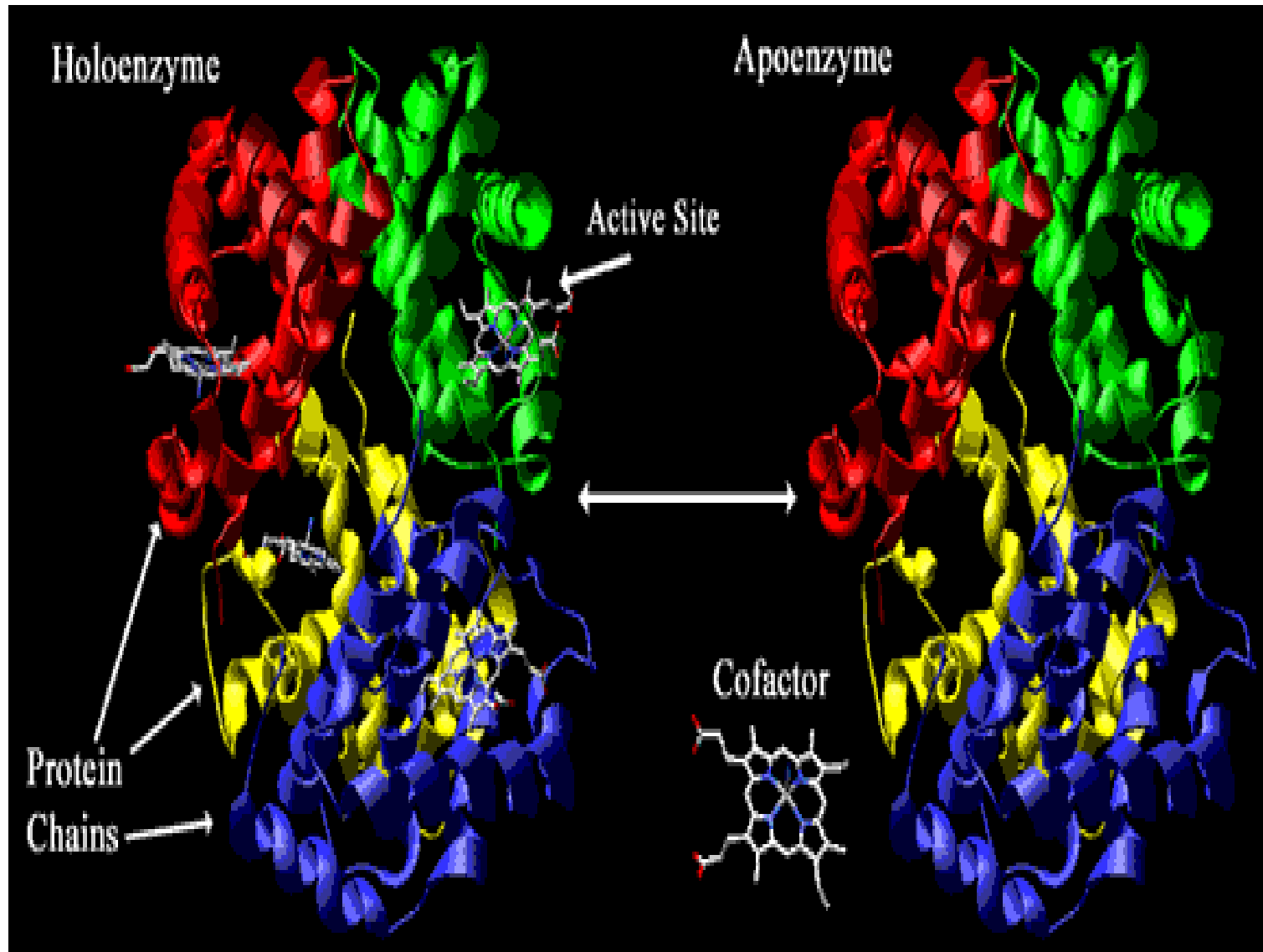


TABLE 8.2 Enzyme cofactors

Cofactor	Enzyme
Coenzyme	
Thiamine pyrophosphate	Pyruvate dehydrogenase
Flavin adenine nucleotide	Monoamine oxidase
Nicotinamide adenine dinucleotide	Lactate dehydrogenase
Pyridoxal phosphate	Glycogen phosphorylase
Coenzyme A (CoA)	Acetyl CoA carboxylase
Biotin	Pyruvate carboxylase
5'-Deoxyadenosyl cobalamin	Methylmalonyl mutase
Tetrahydrofolate	Thymidylate synthase
Metal	
Zn ²⁺	Carbonic anhydrase
Zn ²⁺	Carboxypeptidase
Mg ²⁺	<i>EcoRV</i>
Mg ²⁺	Hexokinase
Ni ²⁺	Urease
Mo	Nitrate reductase
Se	Glutathione peroxidase
Mn	Superoxide dismutase
K ⁺	Propionyl CoA carboxylase

Table 8-2

Biochemistry, Sixth Edition

© 2007 W. H. Freeman and Company

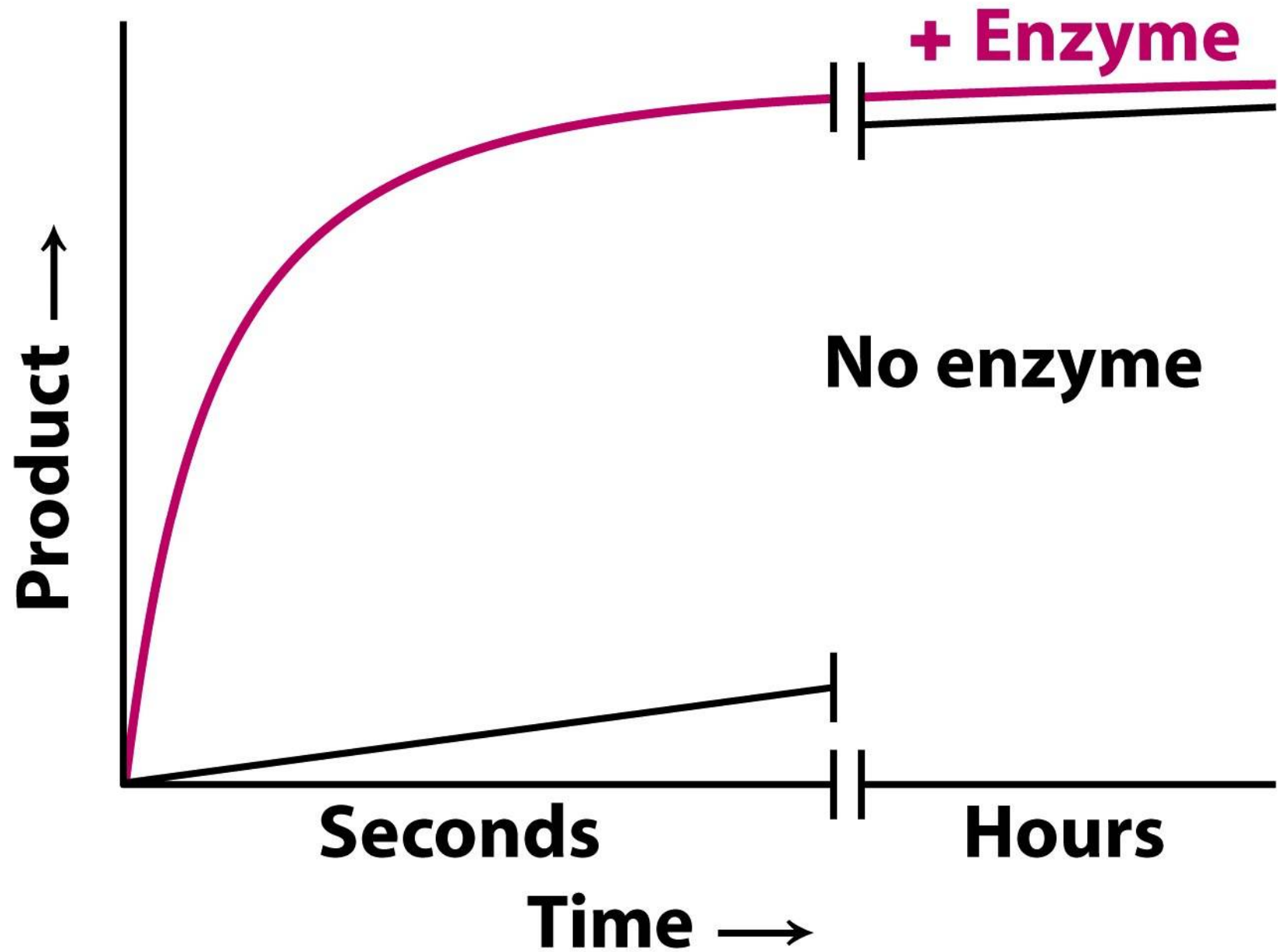
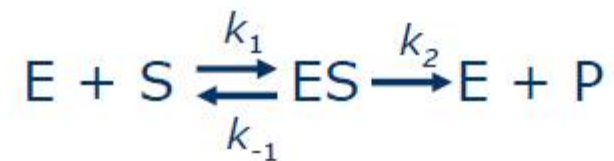


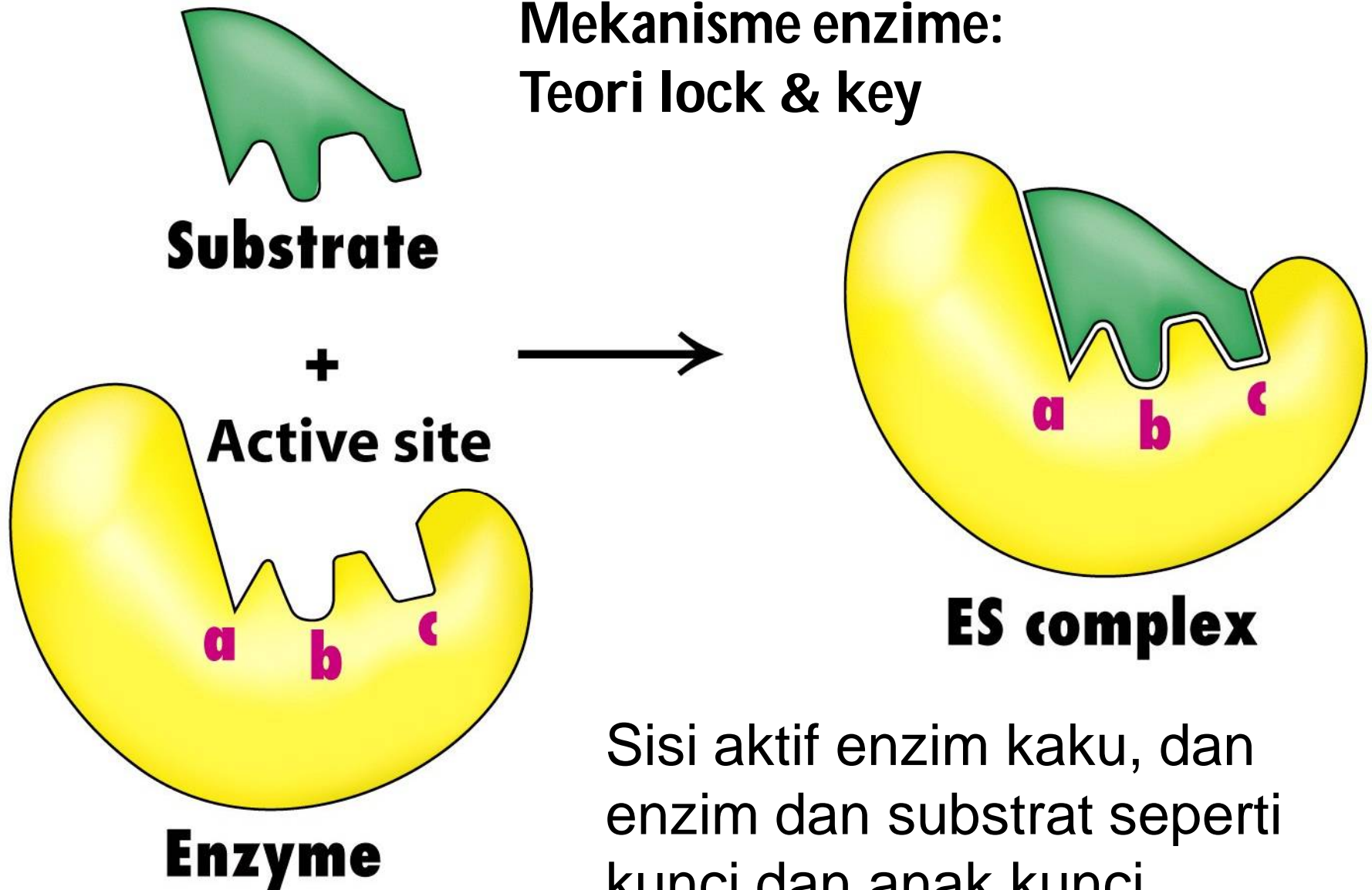
Figure 8-2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Formula for a simple enzyme-catalyzed reaction



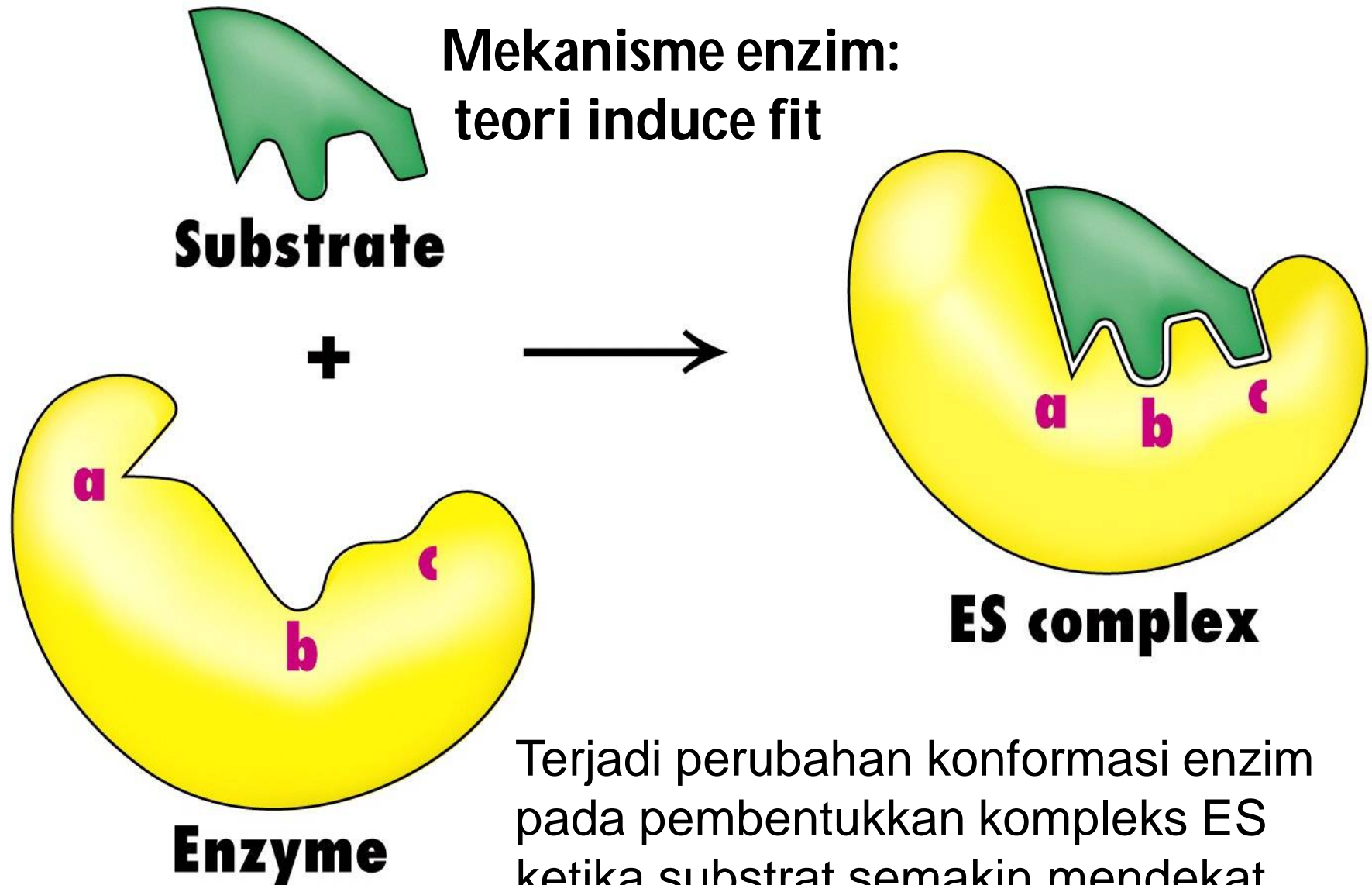
- E = free enzyme
- S = substrate
- ES = enzyme-substrate complex
- P = product

Mekanisme enzime: Teori lock & key



Sisi aktif enzim kaku, dan enzim dan substrat seperti kunci dan anak kunci

Mekanisme enzim: teori induce fit

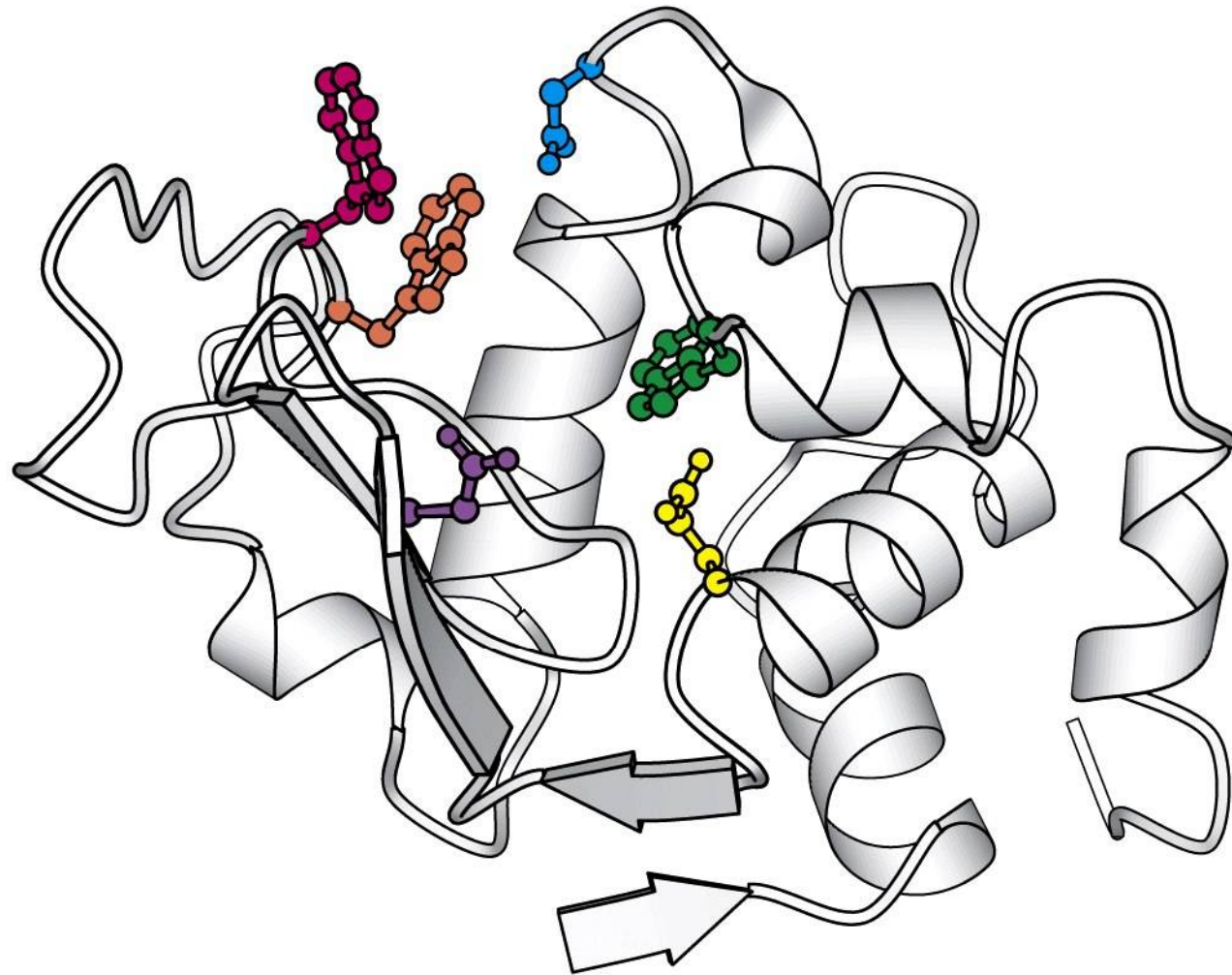


Terjadi perubahan konformasi enzim pada pembentukan kompleks ES ketika substrat semakin mendekati enzim

Sisi aktif enzim

- Bagian dari enzim yang terlibat langsung pada proses katalitik
- Pusat katalitik enzim: Residu asam amino yang berperan pada proses katalitik

(A)



Ilustrasi asam amino pada sisi aktif suatu enzim

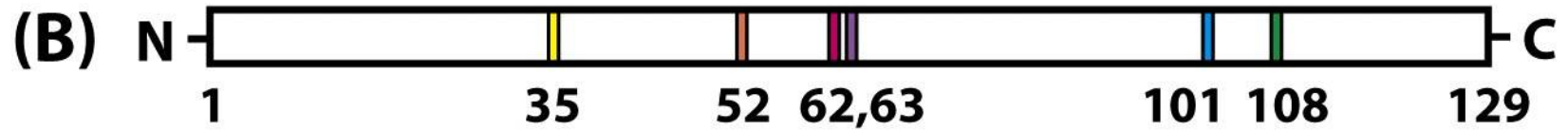


Figure 8-7
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

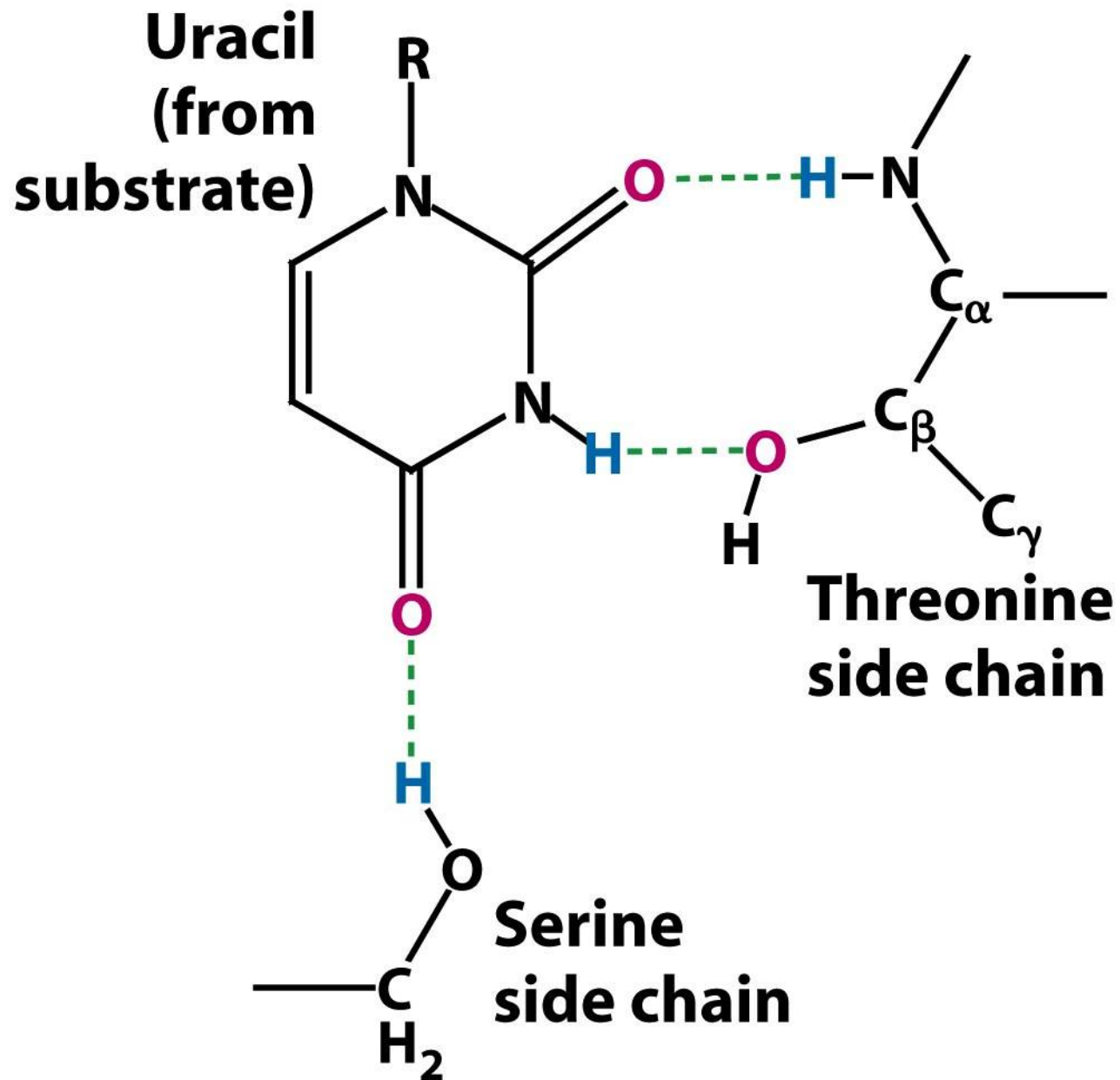


Figure 8-8
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

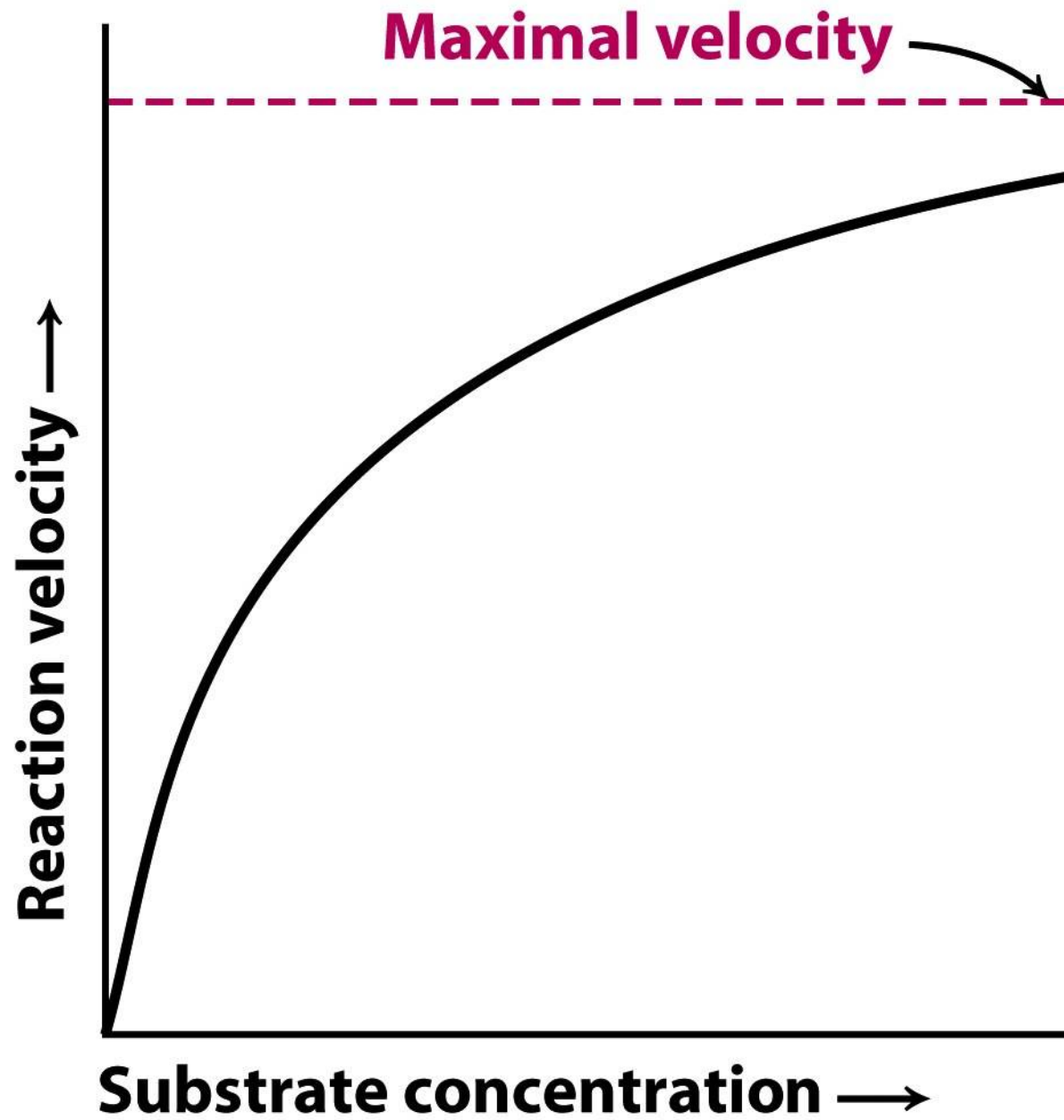
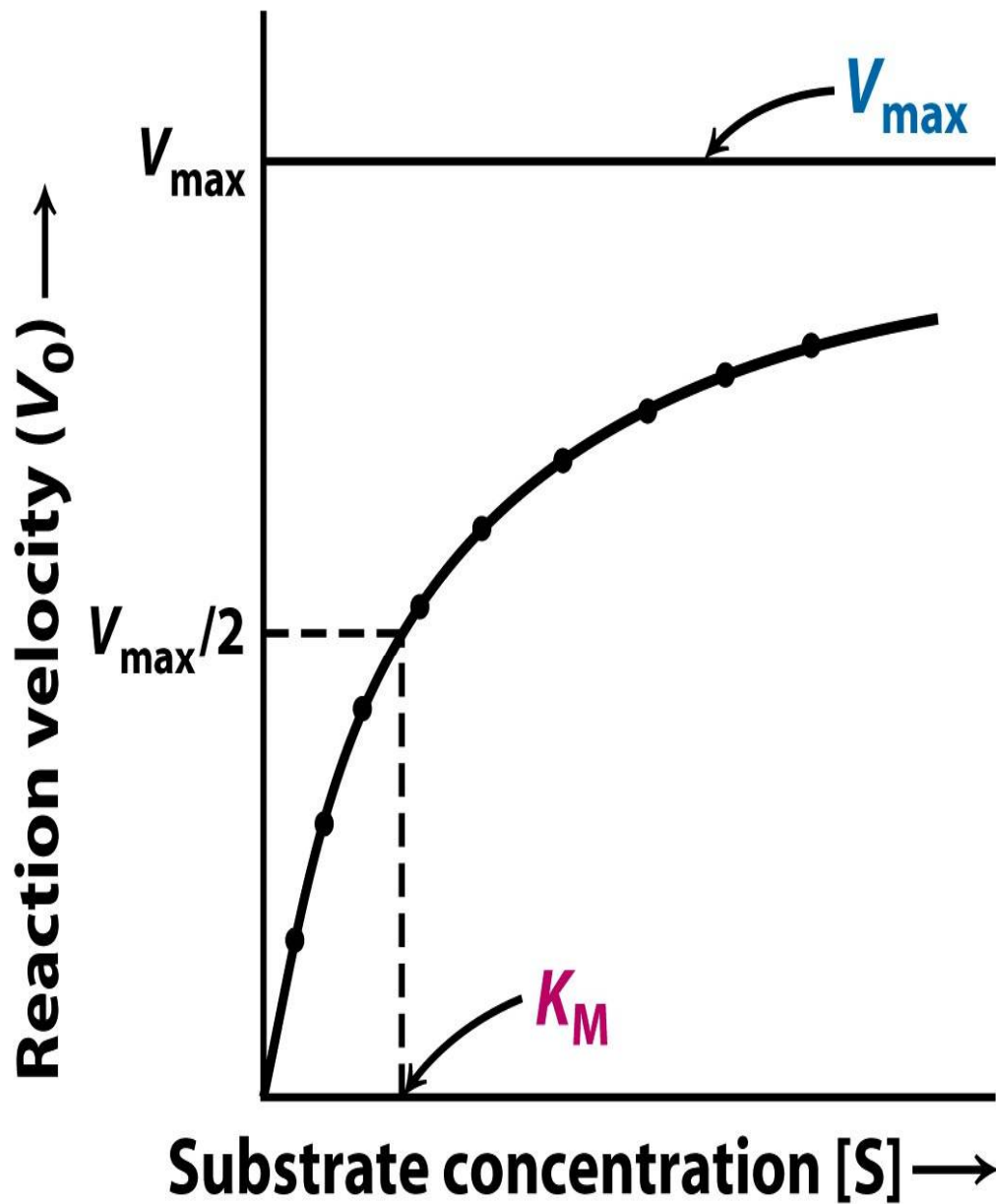
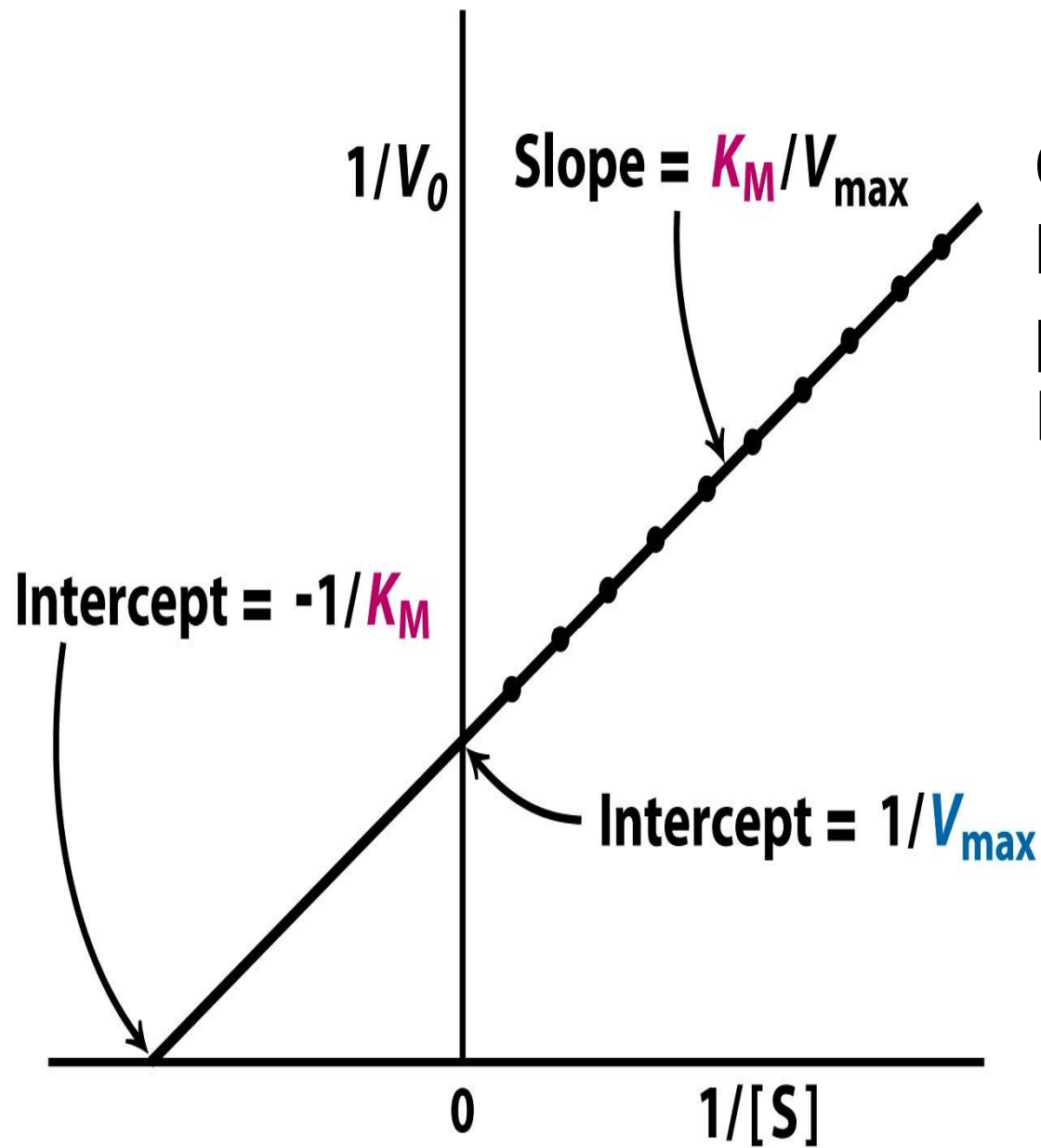


Figure 8-4
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



Grafik Michaelis-Menten



Grafik Lineweaver-Burk untuk penentuan K_M & V_{\max}

Figure 8-13
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Substrate

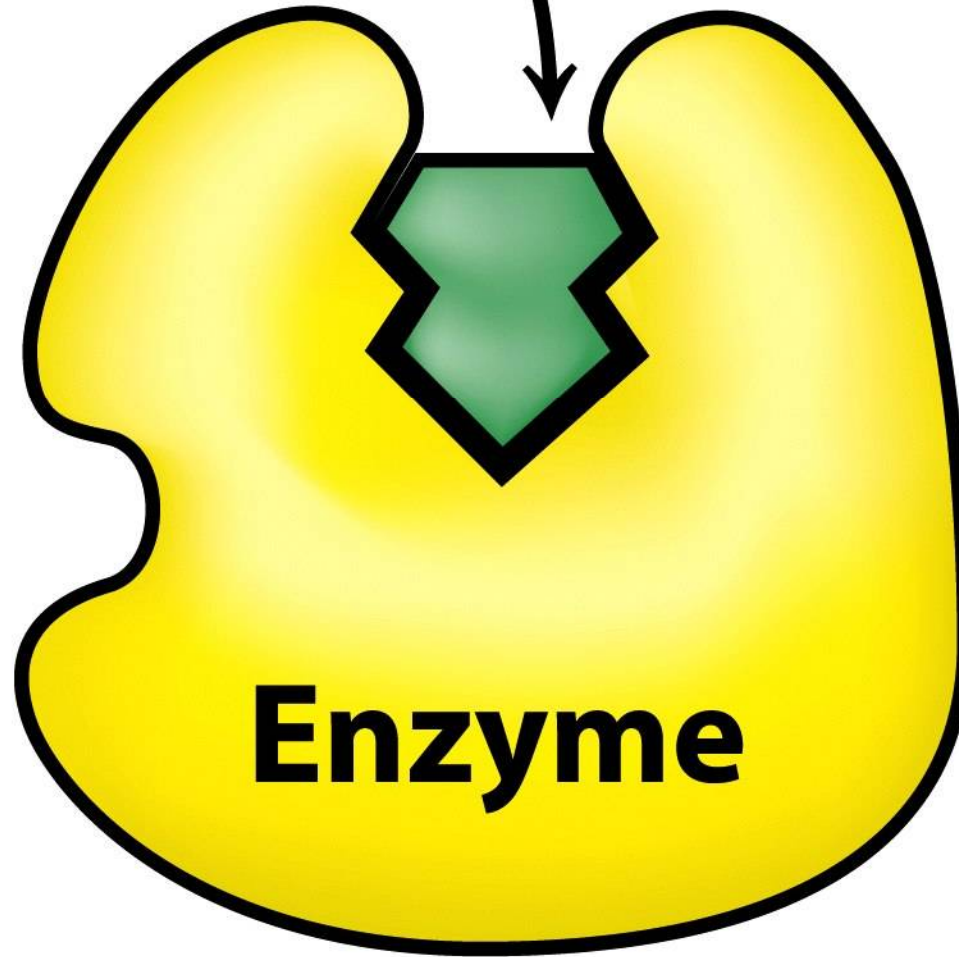


Figure 8-15a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Competitive inhibitor

Inhibisi kompetitif:
inhibitor mirip substrat,
dan mengikat di tempat
pengikatan substrat/situs
katalitik. Dapat
dihilangkan dgn naikkan
konsentrasi substrat

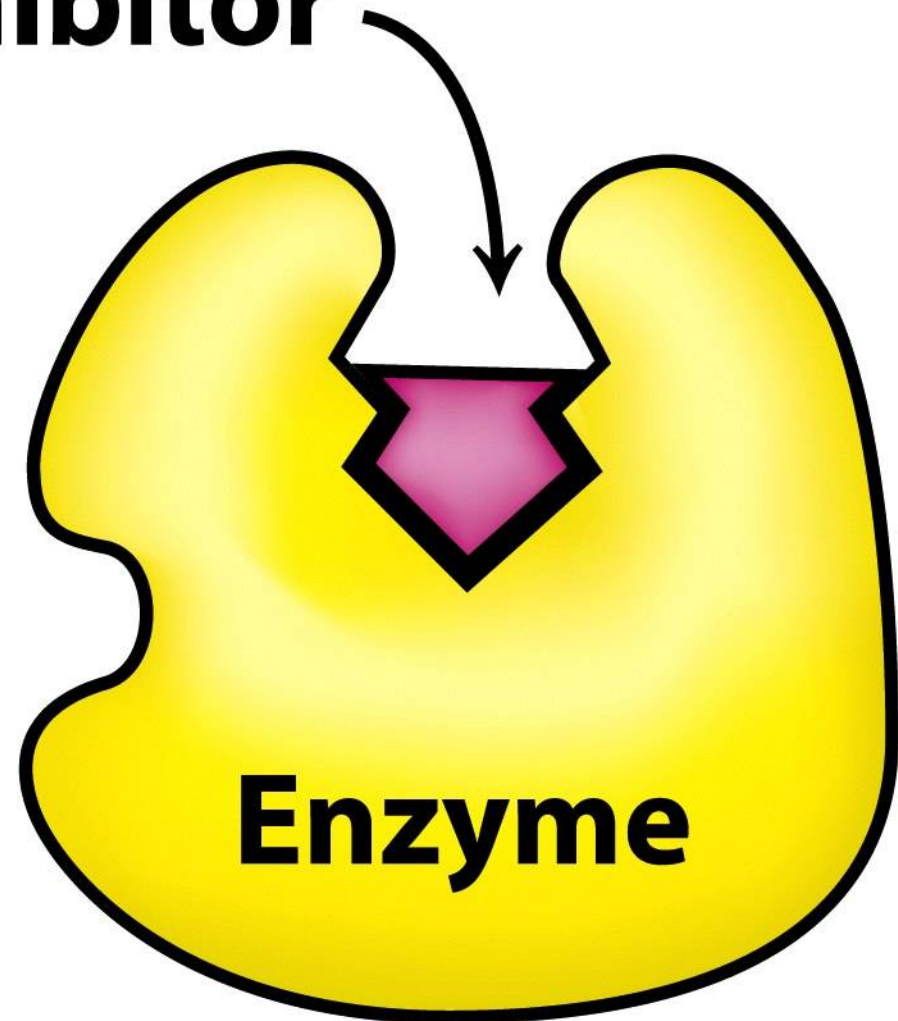
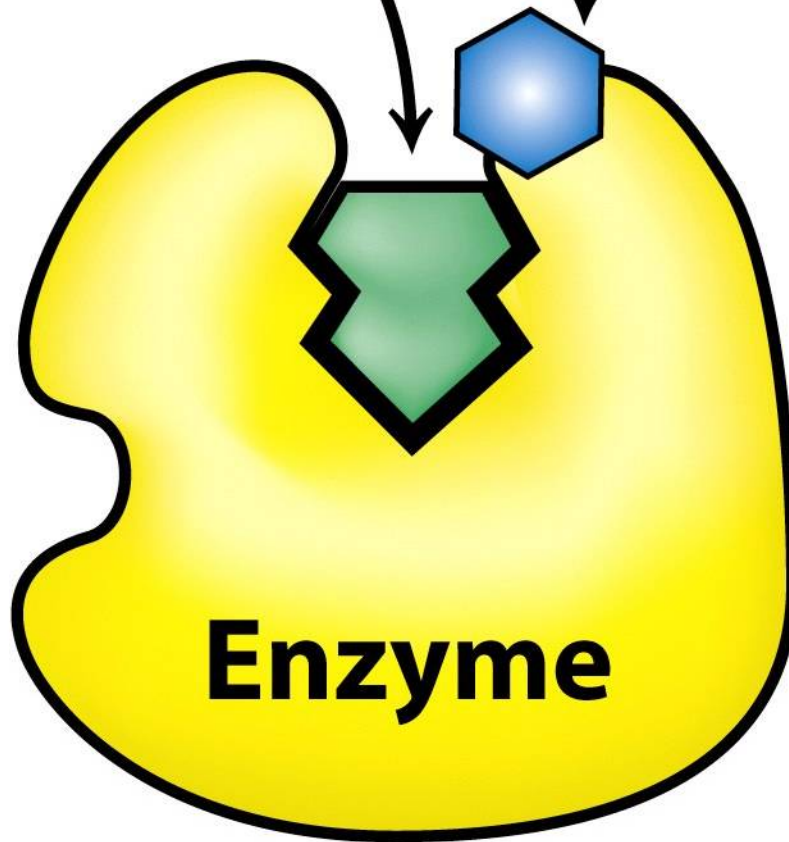


Figure 8-15b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Substrate

Uncompetitive inhibitor



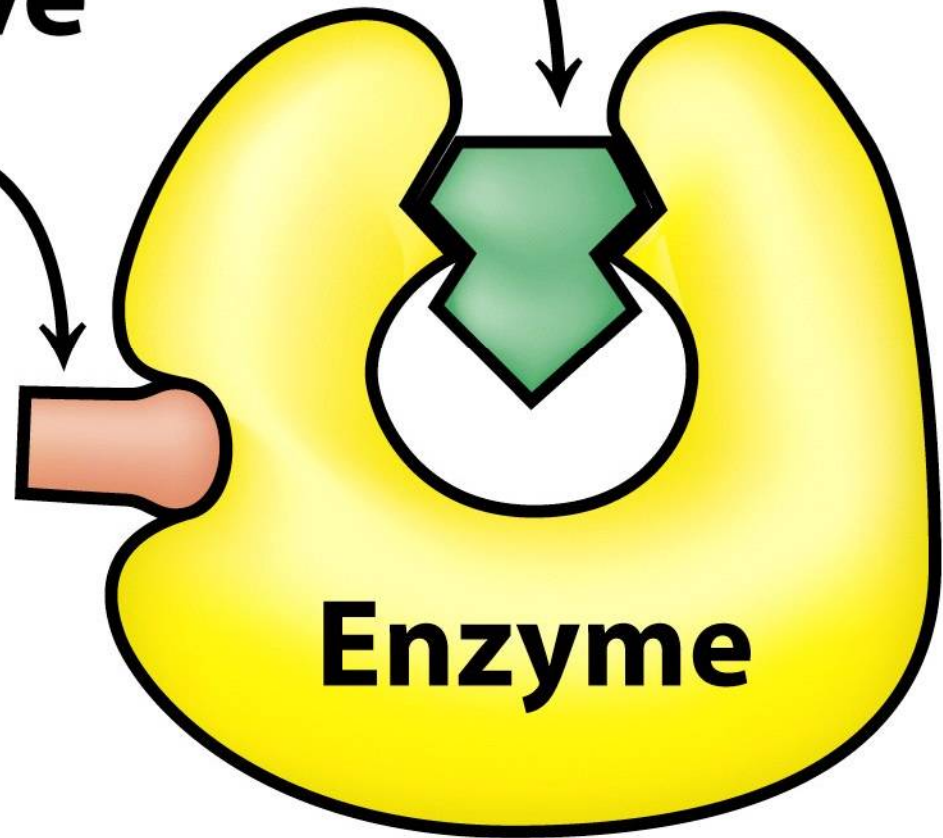
Inhibitor
mengikat
kompleks ES, tapi
tidak mengikat
enzim bebas

Figure 8-15c
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

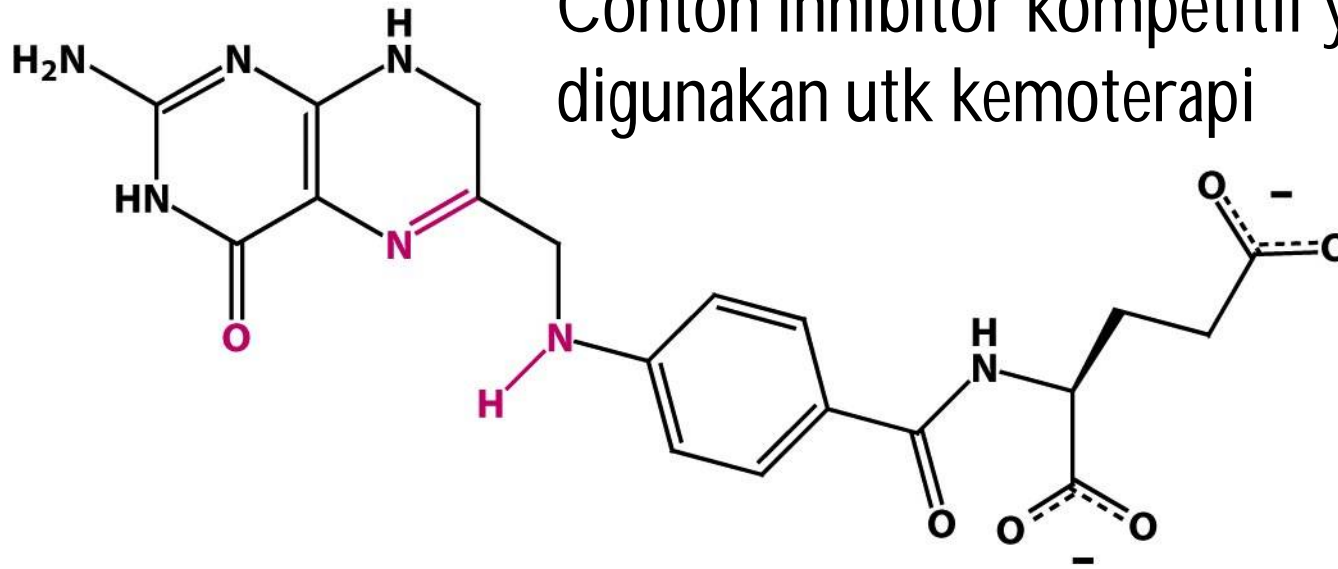
Noncompetitive inhibitor

Inhibitor dapat mengikat enzim bebas dan kompleks ES, pada tempat yg berbeda dgn situs aktif

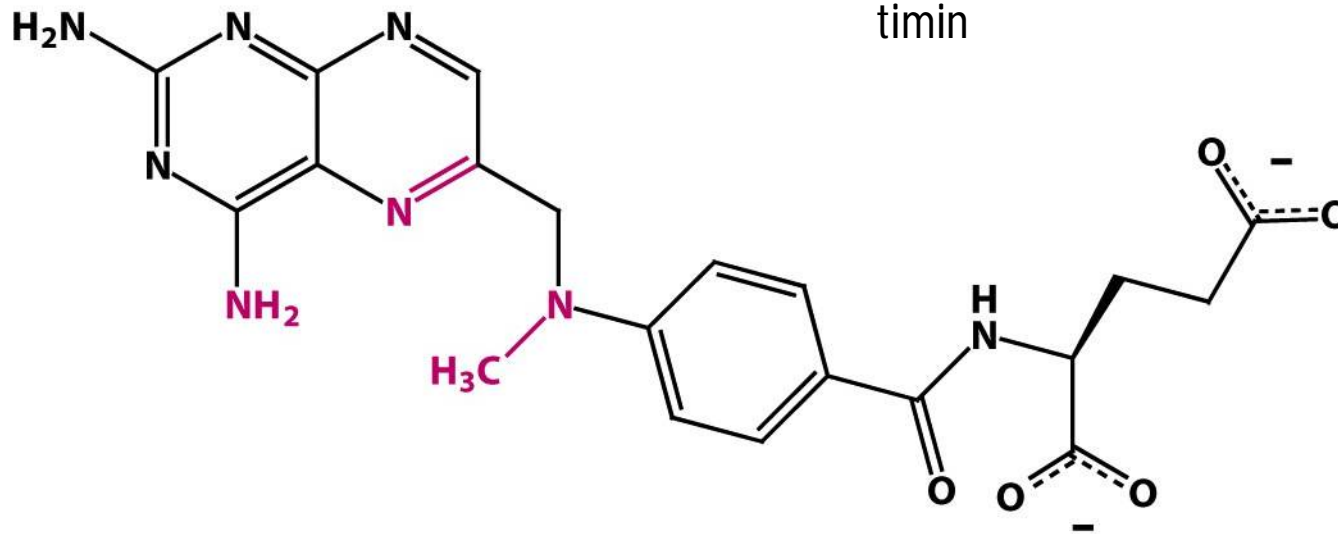
Substrate



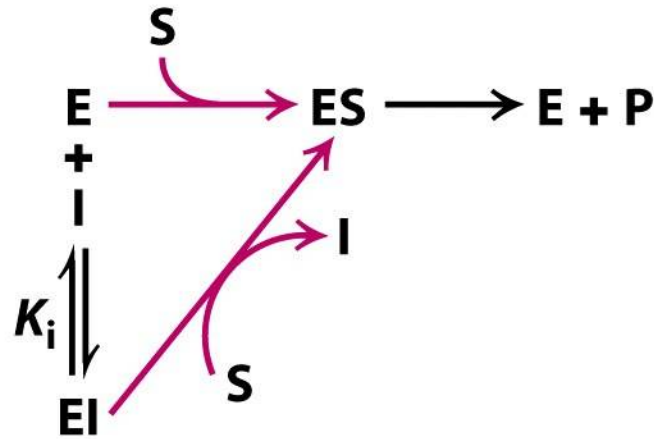
Contoh inhibitor kompetitif yg digunakan utk kemoterapi



Dihydrofolate Substrat dihidrofolat reduktase, sintesis timin



Methotrexate



Inhibisi kompetitif

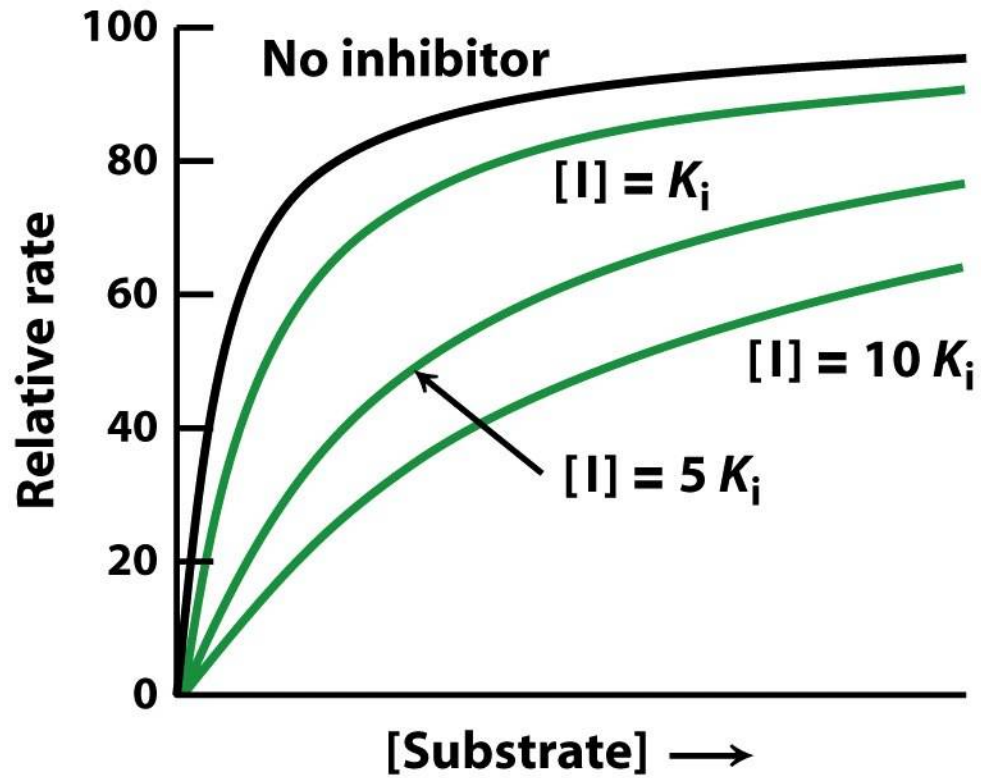


Figure 8-17
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

INHIBISI UNKOMPETITIF

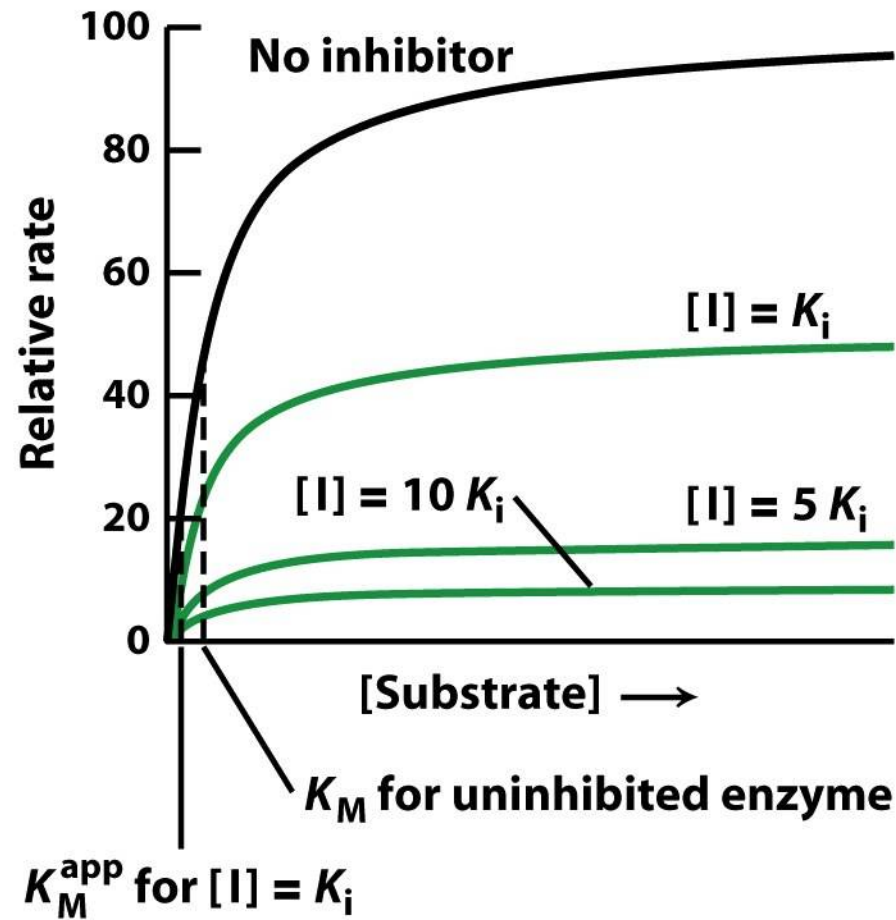
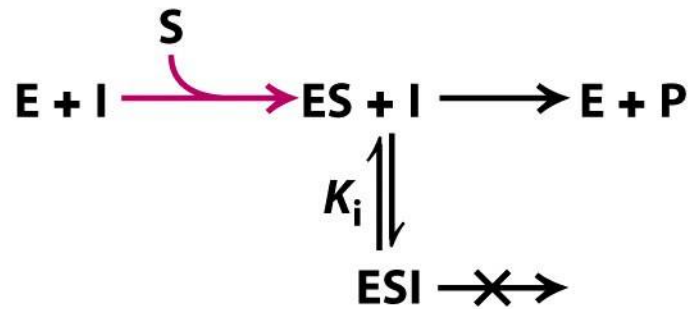


Figure 8-18
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W. H. Freeman and Company

Inhibisi nonkompetitif

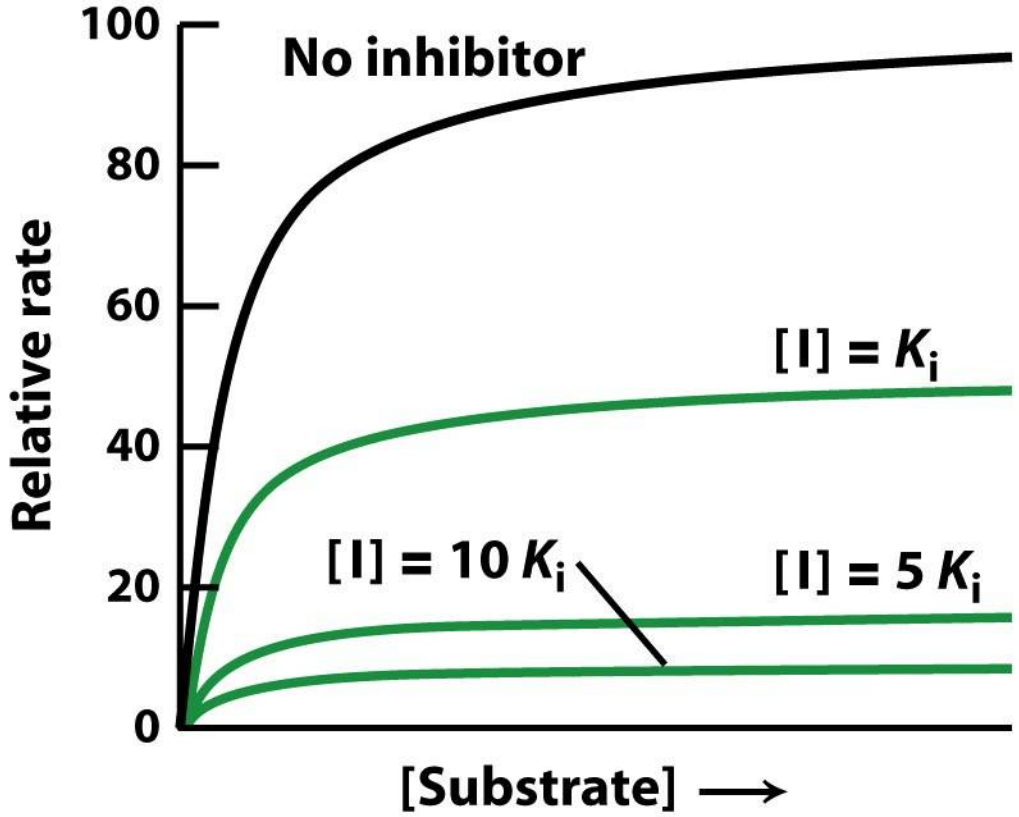
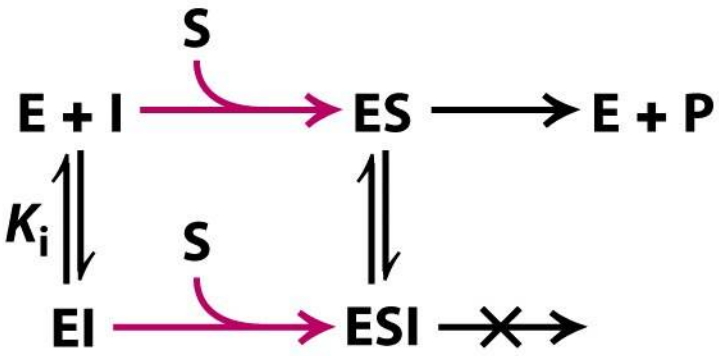


Figure 8-19
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

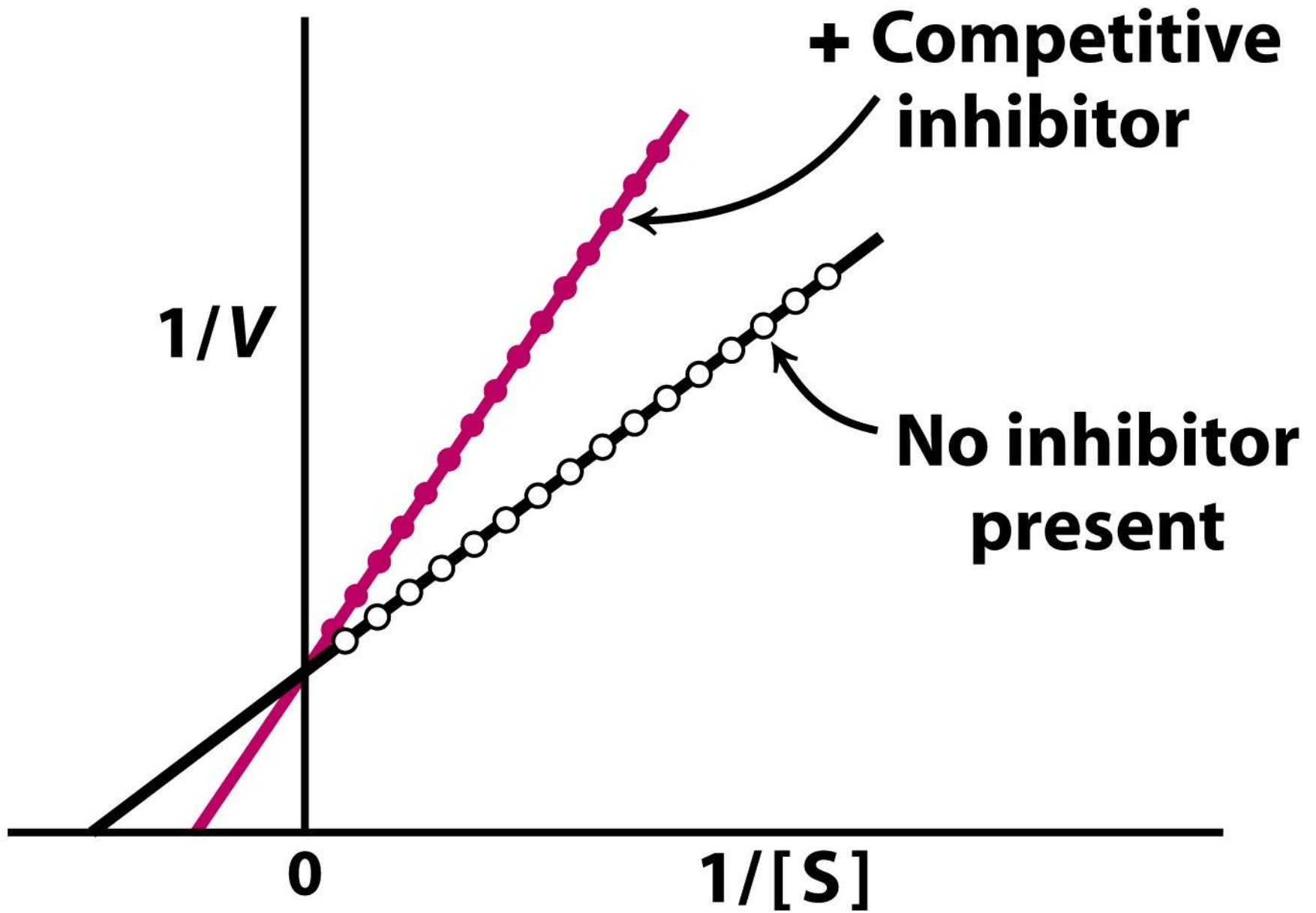


Figure 8-20
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

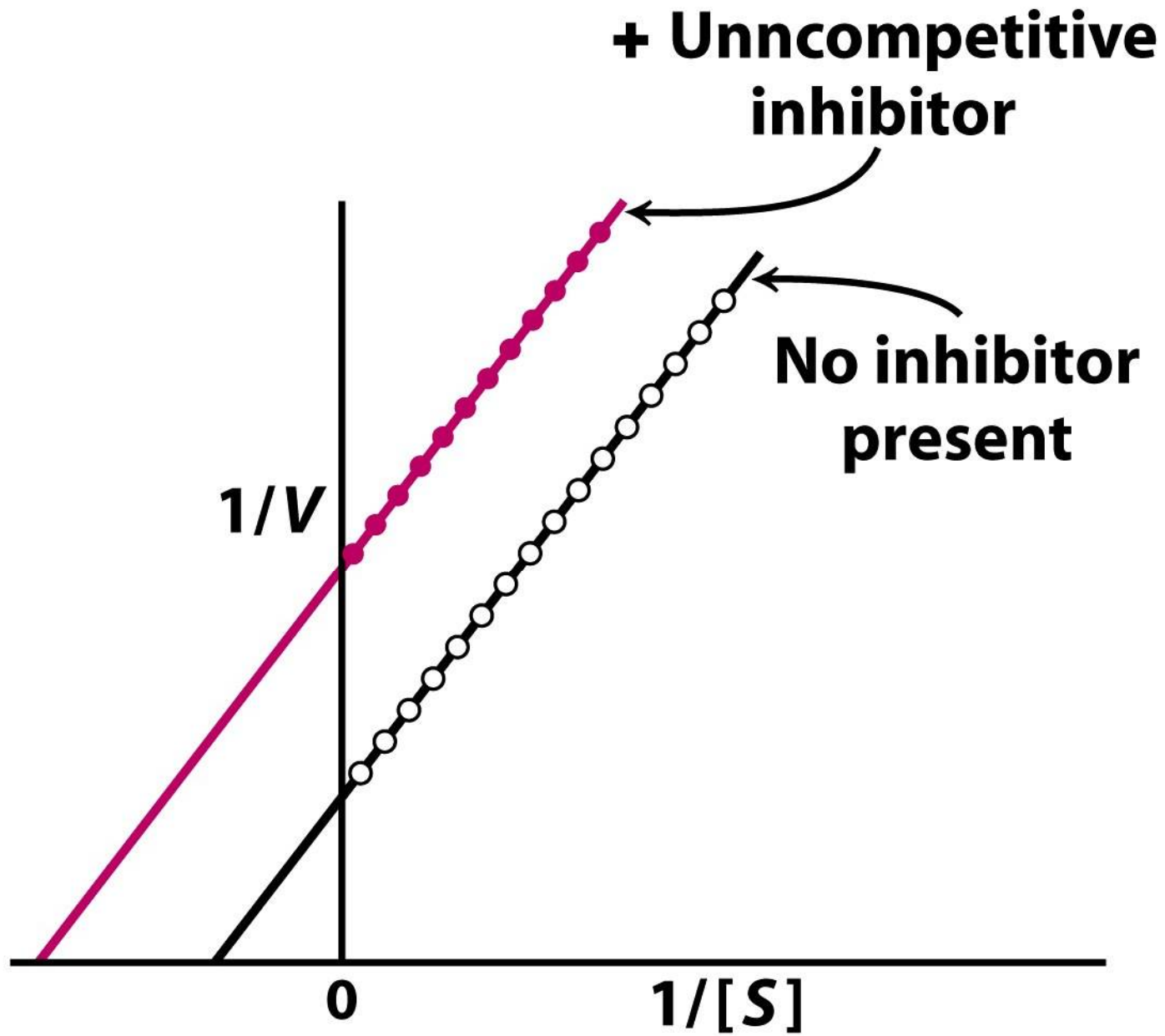


Figure 8-21
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

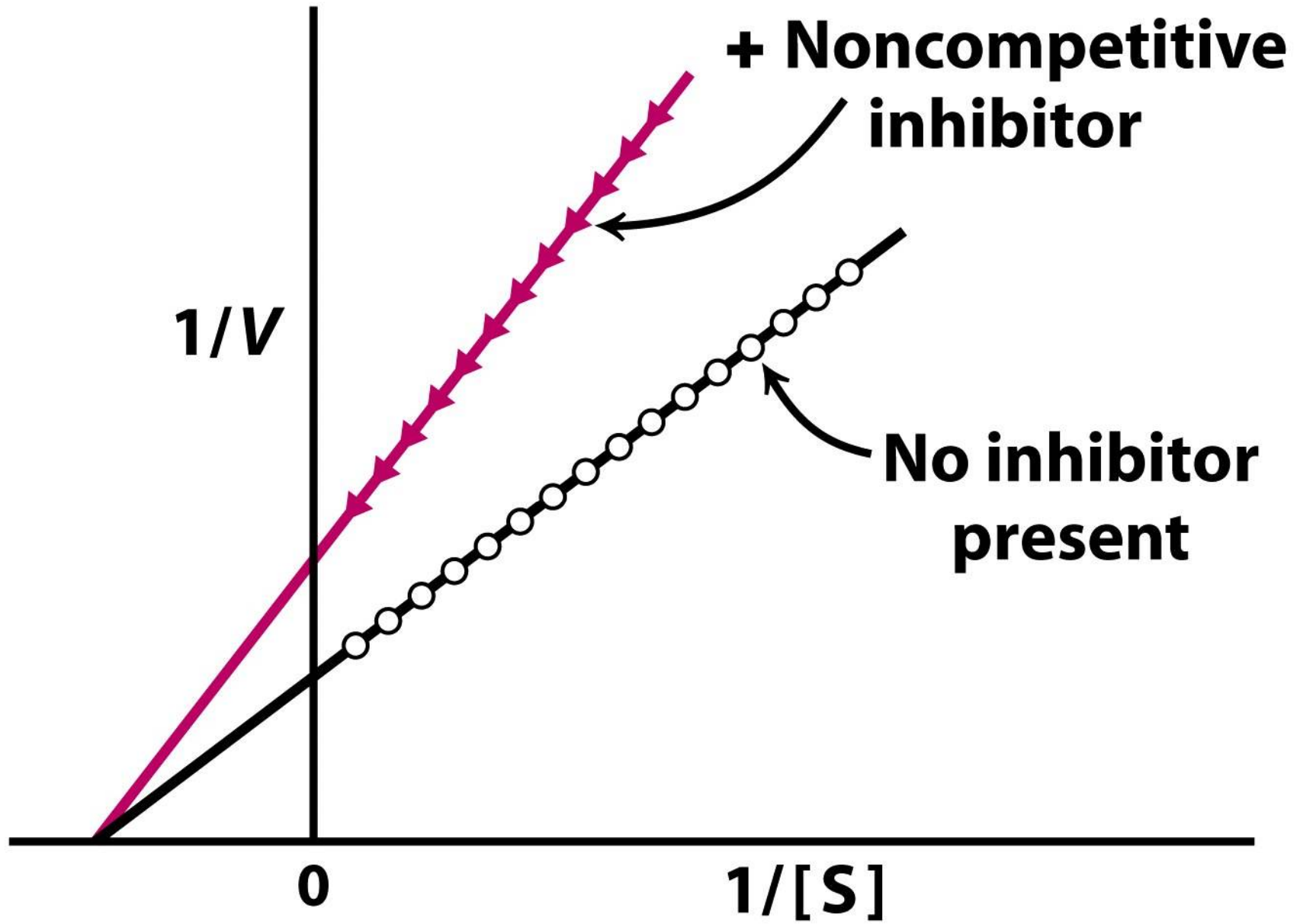
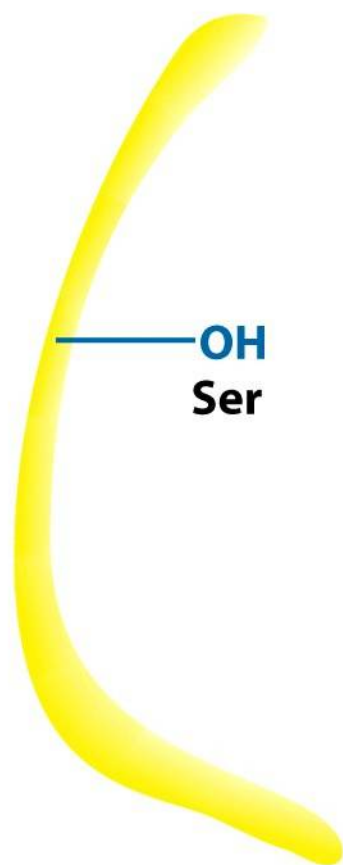
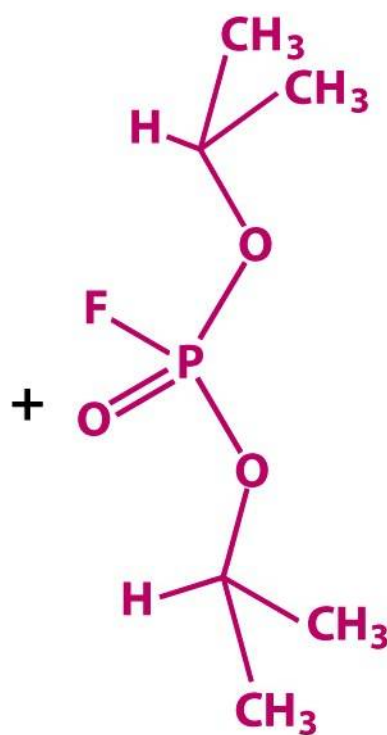


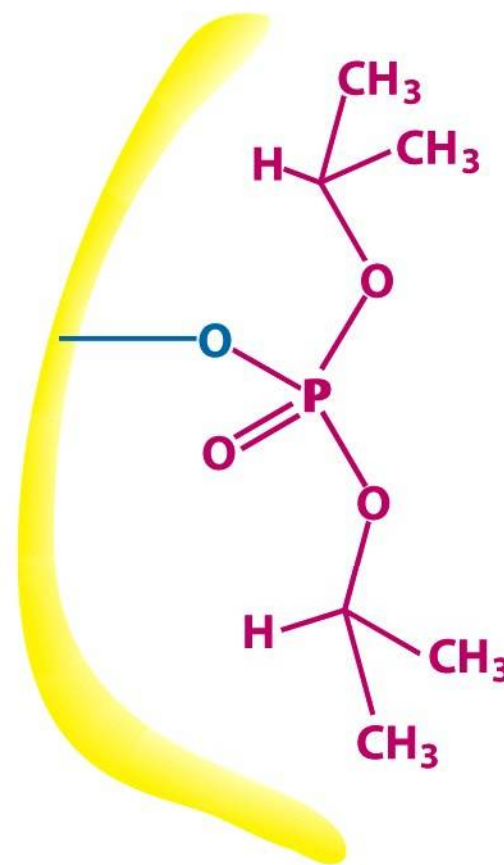
Figure 8-22
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company



**Acetylcholin-
esterase**



DIPF



**Inactivated
enzyme**



Figure 8-23
Biochemistry, Sixth Edition
 © 2007 W.H. Freeman and Company

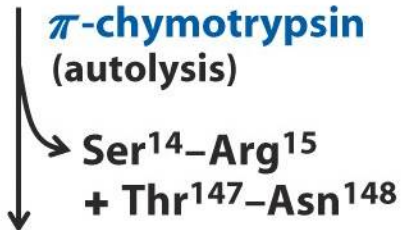
**Inhibisi irreversibel-banyak
 organofluorofosfat utk insektida/senjata
 kimia**

Contoh zimogen

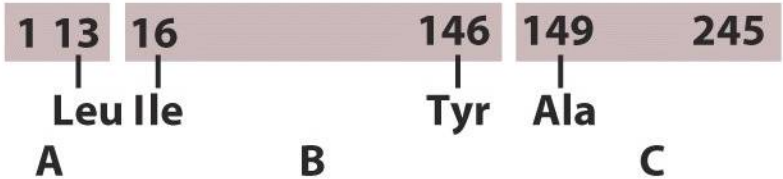
Chymotrypsinogen
(inactive)



π-Chymotrypsin
(active)



α-Chymotrypsin
(active)



Trypsinogen
(inactive)



Trypsin
(active)



Isozim

- Protein enzim yang berbeda yang mengkatalisis reaksi yang sama.
- Berasal dari lebih dari satu gen dalam satu organisme
- Homopolimer atau heteropolimer
- Memiliki respons yang berbeda terhadap faktor lingkungan
- Aktif pada jaringan yang berbeda
- Dapat digunakan untuk membedakan galur atau varietas
- Isozim bukan Isoform enzim

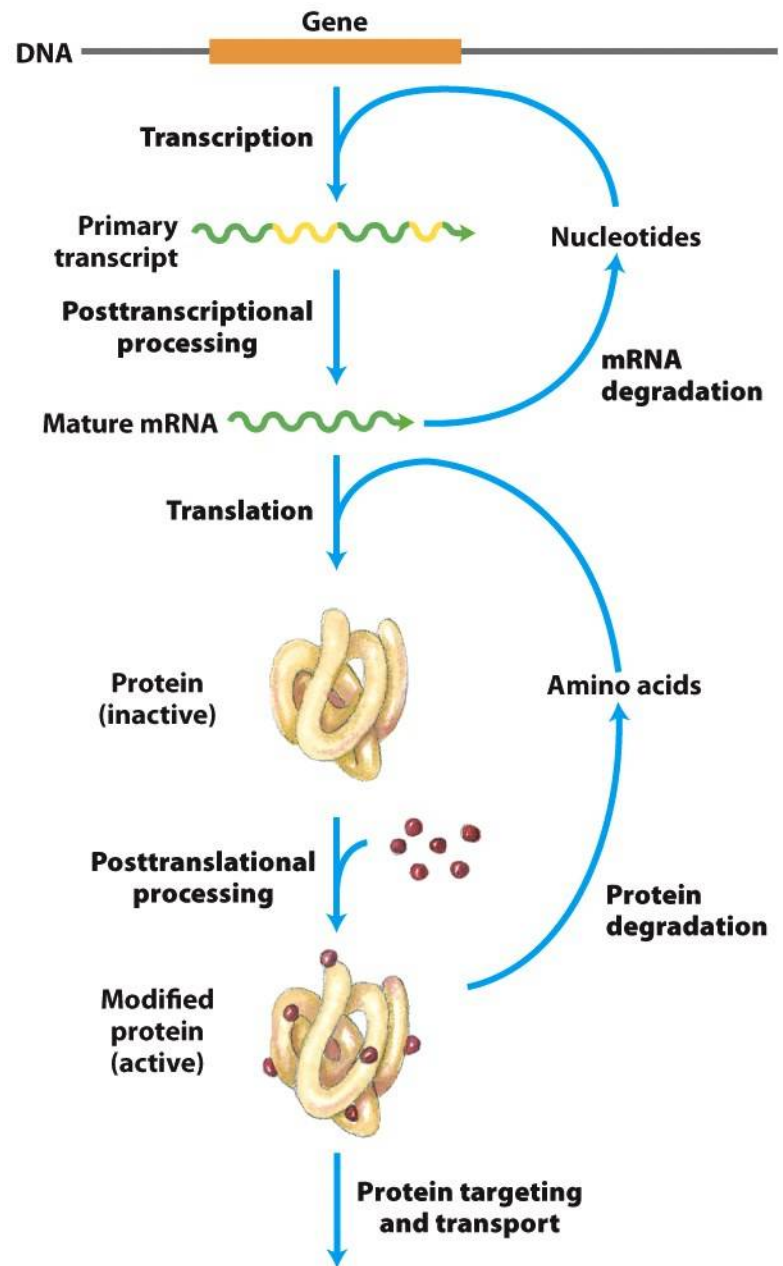


Figure 28-1
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

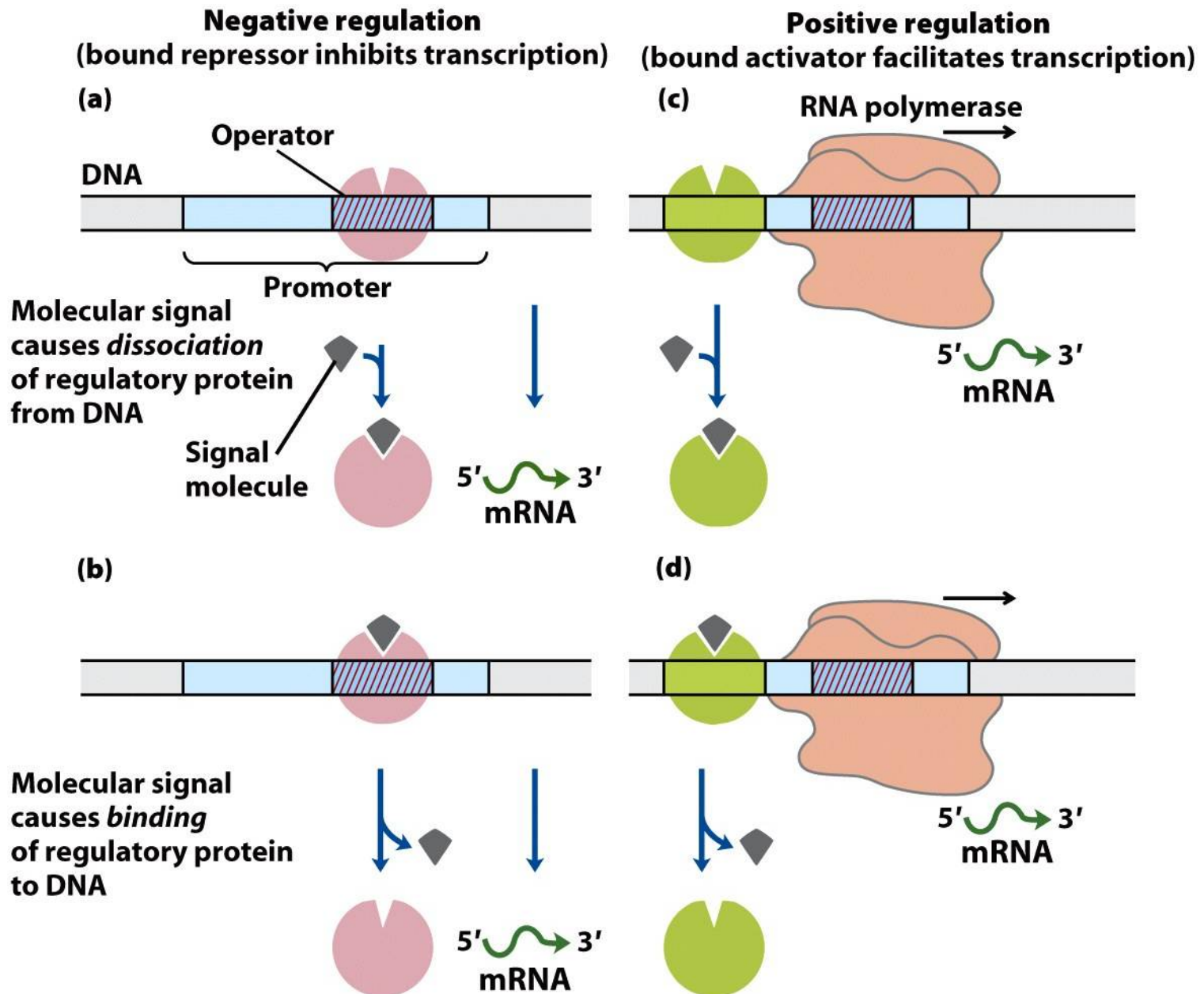
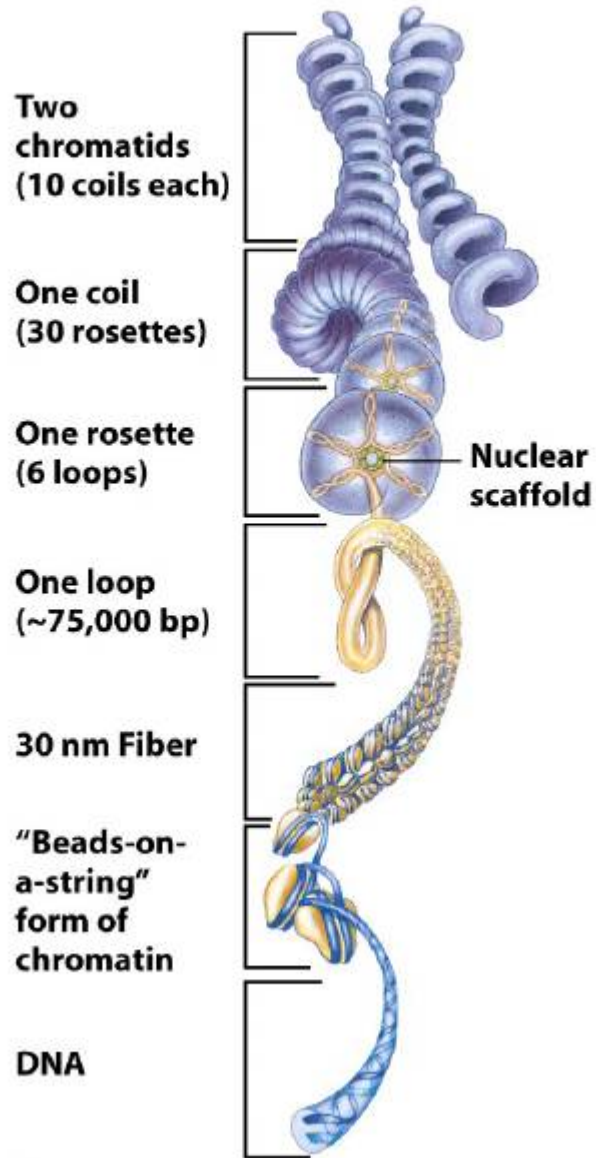


Figure 28-4
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

Compaction of DNA in a eukaryotic chromosome.



i/s

TEKNIK PENELITIAN PROTEIN TANAMAN

Sifat asam basa:

1. Ditentukan oleh gugus R asam-asam amino penyusun polipeptida (protein) tersebut.
2. Sedikit juga ditentukan oleh gugus amino (NH_2) dan karboksilat (COOH) yang terdapat pada kedua ujung polipeptida tersebut
3. Ionisasi gugus R sangat ditentukan oleh gugus R asam amino tetangganya (PI protein: pH dimana jumlah muatan positif sama dengan muatan negatif dalam molekul tersebut sehingga daya larut protein minimum dan tidak bergerak bila diletakkan pada medan listrik)
4. Pada pH diatas titik isoelektrik protein akan bermuatan negatif dan akan bergerak ke anoda dan sebaliknya

PEMISAHAN PROTEIN

1. Pemisahan protein dari campuran berbagai senyawa atau dari berbagai protein lainnya (yang memiliki bentuk, ukuran dan sifat berbeda) dapat dilakukan dengan cara pengendapan, kromatografi, perbedaan kelarutan, elektroforesis dll
2. Berdasarkan tempat beradanya, protein dapat di bedakan atas intra selular dan ekstra selular
3. Untuk memisahkan atau memurnikan protein tersebut pada umumnya dikaukan dengan metode yang sudah standar (sama) akan tetapi tahapan awanya tentu berbeda karena letak protein tersebut juga berbeda (inta/ekstra sel)

Teknik Pemecahan Sel

- Tergantung dari jenis sel yang akan dipecah (hewan, tumbuhan atau mikroorganisme)
- Teknik sonikasi
- Grinding
- Votex
- Cara kimia
- DII

ISOLASI ENZIM

SEL (SUMBER ENZIM TANAMAN)

ISOLASI

CRUDE ENZYMES

(FRAKSI 0-20% ; FRAKSI 20-40% ; FRAKSI 40-60% ; FRAKSI 60-80% ; FRAKSI 80-100%) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

FRAKSI AKTIF

- KROMATOGRAFI KOLOM GEL FILTRASI SEPHADEX G75
- KROMATOGRAFI KOLOM PENUKAR ION DEAE CELLULOSE

1. KARAKTERISASI ENZIM
2. ELEKTROFORESIS (SDS PAGE)

Isolasi dan Pemurnian Enzim

- Ekstrak enzim kasar (intra / ekstra sel)
- Fraksionasi dengan amonium sulfat
- Dialisis
- Pemekatan
- Chromatografi (filtrasi Gel, Penukar ion, Afinitas, HPLC dll)
- Uji kemurnian (elektroforesis)
- Penentuan parameter kinetika

Teknik Isolasi dan Pemurnian Enzim

Pemisahan ekstrak enzim kasar (crude extract)

1. Pemecahan sel : (kimiawi/fisik)
 - alkali (NaOH), Lisozim dan EDTA, Detergen
 - voter elvehjem (hand-operator or motordriven glass homogenizer (
 - blender (food processor)
 - ultrasonic probe
 - vibrating glass bead mill
 - dll (pendinginan mendadak/osmosis
2. Media ekstraksi: Bufer yg mendekati pKa
3. Ektraselular enzim diambil dari media

Sentrifuga

- Teknik pemisahan berdasarkan berat molekul
- Dapat digunakan untuk pemisahan atau pemurnian protein, partikel, dan atau organel sel
- Laju sedimentasi dalam cairan merupakan fungsi perbedaan densitas antara partikel dengan medium, viskositas medium, bentuk partikel, dan kekuatan sentrifuga
- Jadi protein besar akan tersedimentasi lebih dulu dari protein yang berukuran lebih kecil

Jenis sentrifuga

- 1. Sentrifuga klinik (± 6000 rpm, mak 10mL biasanya tidak pakai pendingin, ragi, eritrosit dll)**
- 2. Sentrifuga mikro: 12.000rpm, tidak ada pendingin vol. 1,5L, yeast, eritrosit dll)**
- 3. Sentrifuga berpendingin kecepatan tinggi: 25.000rpm, untuk mengumpulkan MO, sel, organel dan pengendapan protein**
- 4. Ultra sentrifuga: 80.000rpm, besar, berpendingin, untuk penelitian biokimia dan klinik dgn volume sampel besar**
- 5. Ultra sentrifuga analitik: 70.000rpm, untuk memisahkan organel sel yang kecil spt. Ribosom, RNA dengan isotop dll.**

Lanjutan

4. Fraksionasi dengan Ammonium sulfat

- Solubilitas dlm air tinggi, tdk mengandung zat toksik terhadap enzim, murah, bisa sebagai stabilisator enzim
- Teknik awal dalam proses pemurnian enzim dan untuk pemekatan
- Kelarutan molekul protein di dalam suatu pelarut ditentukan oleh distribusi muatan grup hidrofilik dan hidrofobik pada permukaan
- 'Salting out' effect tergantung kepada sifat-sifat hidrofobik dari protein.
- Penambahan garam akan mengikat molekul air yg ada pada protein dan akan membuka tapak hidrofobik
- Tapak hidrofobik akan saling berinteraksi sehingga terjadi agregasi, namun untuk menghindari denaturasi termal, maka harus dilakukan pada suhu dingin 0-5°C

Dialisis

- Untuk memisahkan molekul besar dari molekul yang lebih kecil melalui membran semipermeabel (selofan)
- Selofan mengandung beberapa senyawa spt. Sulfur, ion logam dll, oleh sebab itu harus dicuci dulu sebelum digunakan
- Didihkan 30mnt selofan dalam alkali EDTA (Na_2CO_3 10g/L, EDTA ammol/L) kemudian cuci dgn aquades

Kromatografi kolom filtrasi gel

- Memisahkan protein berdasarkan bobot molekul dan ukuran molekul
- Seperti sephadex (gel dektran) dan diberi kode G dan angka dibelakangnya menunjukkan pengembangannya didalam air (G25 = pengembangan 25 kali)
- Bila larutan protein dari berbagai ukuran molekul dilewatkan ke dalam kolom filtrasi gel, maka molekul yg berukuran kecil akan masuk kedalam pori gel dan keluar lebih lambat.
- Molekul berukuran lebih besar akan keluar lebih cepat dan lewat diantara partikel gel.

Kromatografi kolom penukar ion

- Pemisahan terjadinya karena pertukaran ion sejenis antara zat yg berbeda dalam fasa mobil dengan zat yg terikat pada fasa stasioner.
- Dipengaruhi oleh kerapatan muatan, distribusi muatan, dan ukuran komponen yg dipisahkan
- Matrik berupa material inert seperti polistiren, divinil benzen atau polisakarida yang berikatan dngan molekul ion tertentu (DEAE, CM dan Asam sulfonat)

Lanjutan

- DEAE selulosa memberikan amino nitroge
- N pada pH 9 berikatan dengan molekul bermuatan negatif (penukar anion) untuk protein yg stabil diatas PI
- Suatu protein bermuatan negatif dilewatkan ke matrik DEAE selulosa maka protein tersebut akan terikat, apabila kedalam kolom dialirkan garam, maka beberapa protein akan terlepas kembali sebanding dengan pengikatan muatan ionik dari garam tersebut

SDS-PAGE

- Elektroforesis adalah teknik pemisahan protein berdasarkan bentuk, ukuran dan muatannya.
- Matrik yg sering digunakan adalah Poli Akrilamida atau agarosa
- Elektroforesis SDS dapat menganalisis protein secara kualitatif dan kuantitatif
- Pada elektroforesis SDS penambahan tiol akan memutus ikatan disulfida pada protein dan akan berikatan dengan SDS membentuk muatan negatif
- Kecepatan migrasinya ditentukan oleh berat molekul polipeptida-SDS
- Dengan menggunakan protein standar maka akan didapat berat molekulnya

KARAKTERISASI ENZIM

- pH OPTIMU
- SUHU OPTIMUM
- LAMA INKUBASI OPTIMUM
- KINETIKA REAKSI (K_m dan V_{max})
- PENENTUAN N TERMINAL
- PENENTUAN C TERMINAL
- ANALISIS URUTAN ASAM AMINO
- MODIVIKASI STRUKTUR (KIMIA / GENETIK)