

PEMURNIAN LIPASE MENGGUNAKAN TEKNIK IMMOBILISASI ION LOGAM PADA MATRIK ZIRCONIA AGAROSA

Chusnul Hidayat¹⁾, Sri Lestari²⁾, Supriyadi³⁾

Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada^{1,2,3)}

Jl. Sosio Yustisia, Bulaksumur Yogyakarta

Telepon (0274) 549650

E-mail : chusnul@gadjahmada.edu¹⁾

Abstrak

Lipase merupakan enzim yang dapat menghidrolisa dan mensintesa trigliserida dan banyak digunakan di berbagai industri. Lipase yang digunakan merupakan enzim murni. Di Indonesia ketersediaan lipase murni terbatas dan selama ini masih harus diimpor sehingga harganya relatif masih mahal. Salah satu permasalahan dalam penyediaan lipase adalah pemurnian lipase memerlukan biaya tinggi. Oleh karena itu, penelitian tentang pemurnian lipase dengan biaya murah dan efisien perlu dilakukan. Salah satunya adalah dengan menggunakan teknik Immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) karena IMAC mempunyai selektifitas tinggi, mudah dielusi dan mudah proses regenerasi kolom.

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan jenis ion logam sebagai ligan dan menentukan konsentrasi imidazol dalam running buffer yang sesuai untuk pemurnian lipase. Matrik zirconia agarose dibuat dengan teknik emulsi. Permukaan matrik dimodifikasi dengan imino diacetic acid (IDA). Ion logam yang digunakan untuk adsorpsi lipase adalah Ca^{2+} dan Cu^{2+} . Pada penelitian ini dipelajari pengaruh dari ion logam dan konsentrasi imidazol dalam running buffer (2 mM, 4 mM, dan 6 mM).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kapasitas adsorpsi dari Cu^{2+} amobil dalam mengikat lipase adalah 2 kali lebih tinggi dibandingkan dengan Ca^{2+} . Penambahan imidazol dalam pada running buffer (2 mM) dapat meningkatkan aktivitas spesifik lipase dari produk (17,57 U/mg) dan enzim yang teradsorpsi lebih mudah untuk dielusi. Kondisi paling baik pada pemurnian enzim lipase adalah penggunaan Cu^{2+} sebagai ligan dan running buffer yang mengandung 2 mM imidazol pada pH 7.

Kata kunci : lipase, zirconia agarosa, metal affinity, running buffer, imidazol

PENDAHULUAN

Kromatografi afinitas merupakan teknik pemisahan dan pemurnian sebagian besar molekul biologi berdasarkan susunan kimia molekul tersebut [1]. Dasar pemisahan pada kromatografi afinitas adalah pengikatan molekul protein yang mempunyai afinitas spesifik dengan ligan tertentu. Teknik ini berdasarkan interaksi yang spesifik antar material biologi misalnya enzim-substrat, enzim-inhibitor, antigen-antibodi dan sebagainya [2]. Molekul yang dimurnikan akan teradsorb oleh ligan yang teramobilisasi pada matrik. Ikatan yang terjadi antara protein dan ligan tersebut biasanya merupakan ikatan multivalen [3].

Immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) memanfaatkan pengikatan ion logam secara selektif pada gugus spesifik (misalnya histidin) dalam protein. Metode ini umumnya digunakan untuk pemurnian histidin dari protein. Tetapi metode ini juga digunakan

untuk pemurnian β -galaktosidase dan *yeast alcohol dehydrogenase*. Keberhasilan metode ini tergantung dari strategi elusi protein target dalam matrik [4]. Keuntungan dari IMAC adalah stabilitas ikatan logam dalam berbagai kondisi pelarut dan suhu, tingginya logam yang terikat yang menunjukkan banyak protein yang teradsorb dan kemudahan untuk mengelusi produk dan regenerasi ligan [5]. Menurut Arnold [6] IMAC merupakan salah satu teknik pemurnian yang mempunyai selektifitas tinggi karena enzim terikat pada ion logam yang teramobilisasi secara spesifik. Pada umumnya ion logam yang digunakan sebagai ligan pada IMAC adalah ion logam transisi (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}). Ion metal ini biasanya diamobilisasi menggunakan *iminodiacetic acid* (IDA). Fitton dan Santarelli [7] menggunakan Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} untuk pemurnian *Penicillin acylase*. Menurut Clemmitt dan Chase [5] ion logam yang biasa digunakan dalam IMAC adalah ion logam transisi

(Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}). Ion logam yang termasuk *hard metal ion* seperti Ca^{2+} dan Mg^{2+} juga dapat digunakan tetapi penggunaan dalam IMAC kurang berkembang.

Ion metal ini biasanya diamobilisasi menggunakan *Iminodiacetic acid* (IDA) yang berikatan dengan epiklorohidrin atau *butanediol diglycidyl ether* (BDGE) [8]. Peningkatan konsentrasi BDGE akan meningkatkan kemampuan mengikat ion logam sehingga total protein teradsorb juga akan meningkat [9]. Pada penelitian Susan dkk. [10] dengan ion logam Cu^{2+} , adsorpsi protein optimum pada konsentrasi BDGE 40-45%.

Dalam pemurnian *Penicillin acylase*, Cu^{2+} merupakan ion logam terbaik dibanding dengan Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} karena menghasilkan *recovery* lebih dari 70% [7]. Sanchez dkk. [11] menggunakan Cu^{2+} untuk pemurnian enzim *Penicillin acylase* dari *Escherichia coli*. Menurut Clemmitt dan Chase [5] Ni^{2+} bagus digunakan dalam pemurnian β -galaktosidase. Penelitian Minarni [9] menunjukkan bahwa Cu^{2+} merupakan ion logam terbaik dalam pemurnian enzim lipase kecambah biji wijen daripada Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} .

Pada penelitian ini proses pemurnian lipase dilakukan menggunakan IMAC. Untuk mengetahui pengaruh imidazol terhadap pemurnian lipase, sebelum pemasukan sampel (enzim kasar), matrik diekuilibrasi dengan buffer fosfat (*running buffer*) yang mengandung imidazol. Tujuan dari penelitian adalah menentukan jenis ion metal, menentukan kondisi optimum adsorpsi dan menentukan konsentrasi imidazol pada proses elusi.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan Penelitian

Biji wijen diperoleh dari pasar di wilayah Yogyakarta. Sukrosa, EDTA, Span 85, Na_2CO_3 , imidazole, EDTA, isooktan, K_2HPO_4 , $3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , Na_2CO_3 , NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, metal (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) diperoleh dari Merck KGaA (Darmstadt, German). Butanediol diglycidyl ether, alumina, asam oleat, *olive oil*, Folin-Ciocalteu, K-tartrat, Bovine Serum Albumin dan agarose diperoleh dari Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Pembuatan Crude Enzim

Crude enzim dibuat sesuai dengan prosedur yang dilakukan oleh Minarni, [9]. Kecambah biji wijen (1 g) ditambah 5 ml 20 mM buffer mengandung 0,6 M sukrosa dan 1 mM EDTA pada pH 7., kemudian campuran dihomogenisasi selama 5 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit. Supernatan crude enzim yang digunakan sebagai sampel terdapat pada lapisan bagian tengah.

Purifikasi Enzim

Kolom yang digunakan berukuran 1 cm X 30 cm sebanyak 5 kolom. Kolom diisi adsorben matriks sebanyak 2 gram dalam setiap kolom. Matrik dalam setiap kolom dicuci dengan 25 ml aquades, kemudian ditambahkan sebanyak 6 ml metal ion. Matriks dicuci kembali dengan 25 ml aquadest. Pencucian dilanjutkan dengan menggunakan buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 M NaCl sebanyak 100 ml.

Selanjutnya 1 ml crude enzim dimasukkan kedalam setiap kolom dan dilanjutkan dengan pencucian menggunakan 15 ml buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 mM NaCl . Larutan yang keluar dari kolom ditampung dan dianalisa. Elusi I dilakukan menggunakan 10 ml buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 M NaCl dan 2 mM Imidazole. Elusi II dilakukan menggunakan 10 ml buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 M NaCl dan 20 mM Imidazole, Elusi III menggunakan 10 ml buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 M NaCl dan 100 mM Imidazole. Setiap larutan yang keluar dari kolom ditampung dan diuji aktivitas enzim serta protein terlarutnya.

Matrik yang telah dipergunakan diregenerasi melalui pencucian matrik menggunakan buffer phosphate 20 mM yang mengandung 0,5 M NaCl dan 50 mM EDTA sebanyak 10 ml dan terakhir dicuci dengan 50 ml aquadest selanjutnya matrik dapat dipergunakan untuk purifikasi enzim kembali.

Analisa Aktivitas Enzim

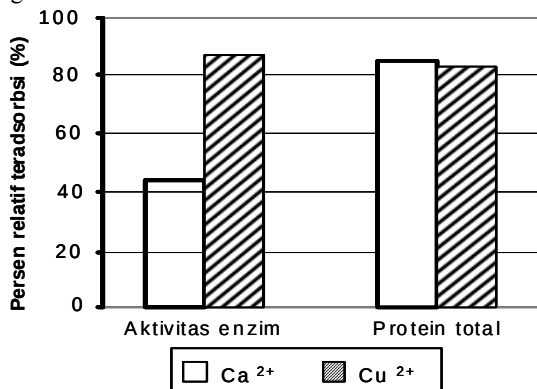
Analisis aktivitas enzim dilakukan dengan mengambil sebanyak 20 – 100 μl larutan enzim, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 ml *olive oil*. Larutan diinkubasi di dalam shaker waterbath pada suhu 37 °C selama 20 menit dengan kecepatan 120 rpm. Setelah diinkubasi, supernatan dimasukkan ke dalam ice bath selama 5 menit dengan tujuan untuk menghentikan reaksi. Selanjutnya supernatan diambil lapisan minyaknya sebanyak 200 μl untuk dianalisis konsentrasi asam oleat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Ion Logam pada Running Buffer tanpa Imidazol

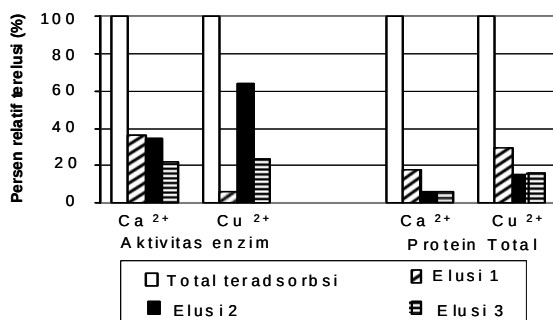
Seleksi ion logam dilakukan untuk memilih ion logam yang mempunyai kemampuan adsorpsi dan selektivitas tinggi sehingga dapat menghasilkan lipase dengan kemurnian yang tinggi. Ion logam yang digunakan adalah Ca^{2+} dan Cu^{2+} . Elusi dilakukan tiga tahap menggunakan imidazol dengan konsentrasi 2 mM (elusi I), 20 mM (elusi II) dan 100 mM (elusi III) dalam buffer fosfat pH 7. Adsorpsi lipase dan total protein dapat dilihat pada Gambar 5. Ion logam Ca^{2+} dapat mengadsorpsi lipase dan total protein masing-masing sebesar 43,80% dan 85,62%. Pada ion logam Cu^{2+} , lipase dan total protein yang teradsorpsi masing-

masing adalah 86,77% dan 83,36%. Dari data tersebut dapat terlihat bahwa Cu^{2+} mampu mengikat protein yang lebih spesifik dari pada Ca^{2+} . Hal ini sesuai dengan Arnold [6], yang menyatakan bahwa histidin dalam protein terikat lebih kuat pada Cu(II)-IDA dibanding dengan IDA yang berikatan dengan ion logam lain.



Gambar 5. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap adsorpsi lipase dan protein total pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* tanpa imidazol pada pH 7, NaCl 0,5 M.

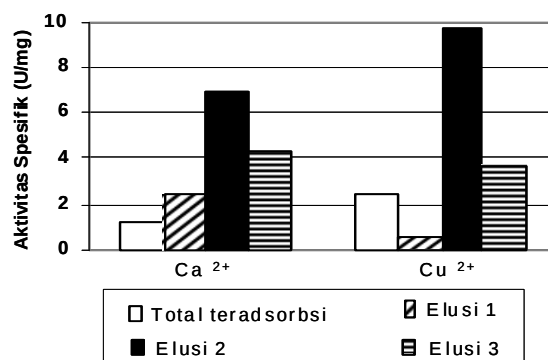
Hasil elusi lipase dan protein total dapat dilihat pada Gambar 6. Pada ion logam Ca^{2+} , lipase dan total protein yang teradsorpsi dapat dielusi masing-masing sebanyak 93,77% dan 29,66%. Pada ion logam Cu^{2+} , 94,23% lipase yang teradsorpsi dapat dielusi, sedangkan total protein dapat dielusi adalah sebanyak 60,98%.



Gambar 6. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap elusi lipase dan protein total teradsorpsi pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* tanpa imidazol pH 7, NaCl 0,5 M. Elusi I : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 2 mM imidazol; elusi II : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol; elusi III : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol. Total protein dan lipase teradsorpsi adalah 100%.

Pada elusi I, lipase yang teradsorpsi pada ion logam Ca^{2+} lebih mudah dielusi dibanding dengan Cu^{2+} (6 kali). Selain itu, protein pada Cu^{2+} lebih mudah dielusi dibanding dengan protein yang terikat pada Ca^{2+} (1,6 kali). Hal ini menunjukkan bahwa lipase terikat lemah pada Ca^{2+} dibandingkan dengan lipase yang terikat pada Cu^{2+} . Elusi I pada ion logam Cu^{2+} dapat melepas banyak kontaminan protein. Pada elusi II, lipase yang teradsorpsi pada Cu^{2+} telah banyak yang terelusi (64,13%) sehingga penggunaan Cu^{2+} sebagai ligan lebih menguntungkan dibanding dengan Ca^{2+} pada kondisi *running buffer* tanpa imidazol.

Gambar 7 menunjukkan aktivitas spesifik lipase pada adsorpsi dan elusi pada ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} . Aktivitas teradsorpsi pada ion logam Cu^{2+} terlihat 2 kali lebih tinggi dari Ca^{2+} . Pada elusi II dengan konsentrasi imidazol 20 mM, ion logam Cu^{2+} juga menghasilkan aktivitas spesifik yang tinggi (9,73 U/mg). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ion logam Cu^{2+} mengikat lipase lebih baik dari pada Ca^{2+} . Hal ini juga terjadi pada penelitian Fitton dan Santerelli [7] pada pemurnian *Penicillin acylase*. Cu^{2+} merupakan ion logam yang terbaik dibanding dengan Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . *Recovery* yang diperoleh lebih dari 70%. Sanchez dkk. [11] juga menggunakan Cu^{2+} untuk pemurnian enzim *Penicillin acylase* dari *Escherichia coli*. Penelitian Minarni [9] menunjukkan pula bahwa Cu^{2+} merupakan ion logam terbaik dalam pemurnian lipase dari kecambah biji wijen dibanding dengan Ni^{2+} , Zn^{2+} dan Fe^{2+} .



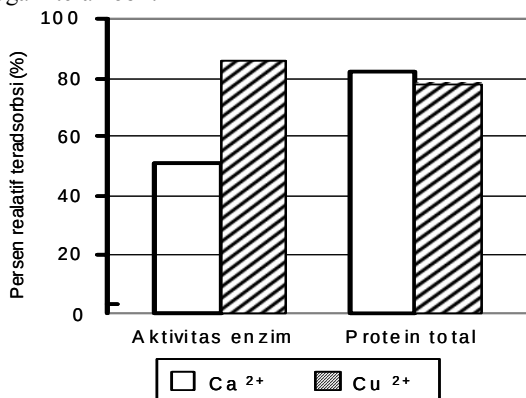
Gambar 7. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap aktivitas spesifik lipase pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* tanpa imidazol pH 7, NaCl 0,5 M. Elusi I : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 2 mM imidazol; elusi II : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol; elusi III : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 100 mM imidazol.

Seleksi Ion Logam pada Running Buffer dengan Imidazol

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan imidazol pada *running buffer* dalam seleksi ion logam. Elusi dilakukan 2 tahap. Hal ini berdasarkan pada penelitian Minarni [9] yang menyatakan bahwa elusi dua tahap merupakan kondisi terbaik pada pemurnian lipase. *Running buffer* pada penelitian tersebut mengandung 2 mM imidazol.

Gambar 8 menunjukkan bahwa dengan penambahan imidazol pada *running buffer*, lipase dan protein total teradsorbsi pada ion logam Ca^{2+} masing-masing adalah 51,21% dan 82,11%. Pada ion logam Cu^{2+} , lipase dan protein total yang teradsorbsi masing-masing sebesar 86,15% dan 77,91%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan imidazol pada *running buffer*, lipase teradsorbsi lebih baik pada ion logam Cu^{2+} daripada ion logam Ca^{2+} .

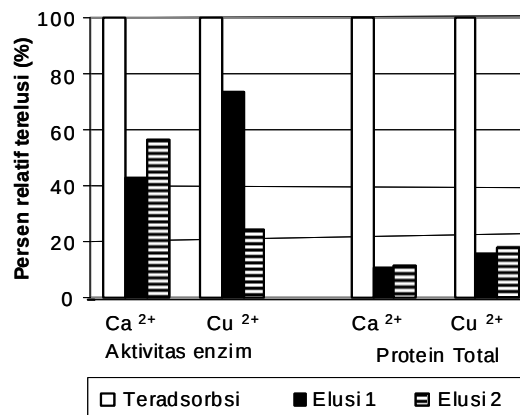
Penambahan imidazol pada *running buffer* menyebabkan protein total yang teradsorbsi turun sebanyak 3,5-6% pada ion logam Ca^{2+} dan ion logam Cu^{2+} . Hal ini menunjukkan bahwa penambahan imidazol dalam *running buffer* dapat meningkatkan selektivitas protein teradsorbsi sehingga hanya protein yang memiliki afinitas pengikatan yang tinggi yang dapat berikatan dengan ion logam. Hal ini sesuai dengan penelitian Hidayat dkk.. [4] yang menyatakan bahwa kolom matrik yang diekuilibrasi dengan buffer yang mengandung 2 mM imidazol dan 0,5 M NaCl maka hanya protein yang mempunyai afinitas pengikatan tinggi yang dapat berinteraksi dengan ion logam teramobil.



Gambar 8. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap adsorpsi lipase dan protein total pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* mengandung 2 mM imidazol pH 7, NaCl 0,5 M.

Gambar 9 menunjukkan bahwa pada ion logam Ca^{2+} , 99,37% lipase yang teradsorbsi dapat dielusi, sedangkan total protein dapat dielusi sebanyak 21,28%. Pada ion logam Cu^{2+} lipase dan total protein yang dapat dielusi masing-masing adalah 97,43% dan 33,15%. Pada elusi I, lipase yang terikat pada ion logam Cu^{2+}

lebih mudah untuk dilepas dibanding dengan Ca^{2+} (1,7 kali). Hal ini menunjukkan bahwa lipase yang terikat pada ion logam Cu^{2+} mudah untuk dilepas dengan konsentrasi imidazol rendah (2 mM). Pada elusi II, aktivitas terelusi rendah (23,71%) sedangkan protein total terelusi sebesar 18,07%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan ion logam Cu^{2+} sebagai ligan, pada elusi I sebagian lipase sudah dapat terelusi sedangkan elusi II akan melepas lipase serta sebagian kontaminan yang terikat kuat.

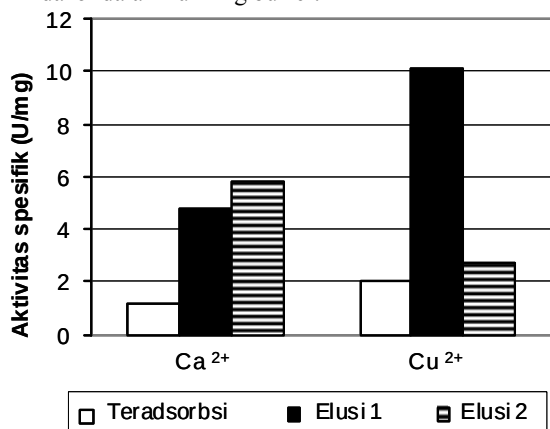


Gambar 9. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap elusi lipase dan protein total teradsorbsi pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* mengandung 2 mM imidazol pH 7, NaCl 0,5 M. Elusi I : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl 20 mM imidazol; elusi II : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol. Total protein dan lipase teradsorbsi adalah 100%.

Gambar 10 menunjukkan aktivitas spesifik dari lipase yang diadsorbsi oleh Ca^{2+} dan Cu^{2+} pada penambahan imidazol dalam *running buffer*. Dari gambar dapat dilihat bahwa ion logam Cu^{2+} mempunyai aktivitas spesifik lebih baik dari ion logam Ca^{2+} . Hal ini ditunjukkan dengan aktivitas spesifik teradsorbsi dan elusi I pada Cu^{2+} yang lebih tinggi 2 kali lipat dari Ca^{2+} . Penambahan imidazol dalam *running buffer* berpengaruh terhadap hasil pemurnian. Pada ion logam Cu^{2+} , penambahan imidazol dalam *running buffer* tidak berpengaruh terhadap lipase teradsorbsi tetapi protein total menurun sehingga aktivitas spesifik meningkat. Hal ini sesuai dengan penelitian Clemmitt dan Chase [5] yang menyatakan bahwa penambahan imidazol pada *running buffer* 6 mM dapat mencegah terjadinya pengikatan kontaminan protein sehingga meningkatkan aktivitas spesifik dan faktor purifikasi. Menurut Hidayat dkk. [4] elusi dua tahap masih menghasilkan *enzyme recovery* yang rendah karena terjadi ikatan multivalen antara gugus fungsional protein dan kontaminan dengan ion logam. Pengikatan multivalen ini dapat ditekan dengan menyequilibrasi kolom

dengan buffer yang mengandung imidazol sebelum sampel dimasukkan dalam kolom. Imidazol akan berikatan kompleks dengan ion logam sehingga hanya protein yang mempunyai afinitas pengikatan yang tinggi yang dapat teradsorbsi.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada kondisi *running buffer* yang mengandung imidazol (2 mM), imobilisasi ion Cu^{2+} pada matrik dapat mengikat lipase lebih baik dari Ca^{2+} serta lipase dapat dielusi dengan baik sehingga ion logam Cu^{2+} dipilih untuk penelitian selanjutnya. Untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi imidazol dalam *running buffer* terhadap pemurnian lipase maka dilakukan optimasi imidazol dalam *running buffer*.

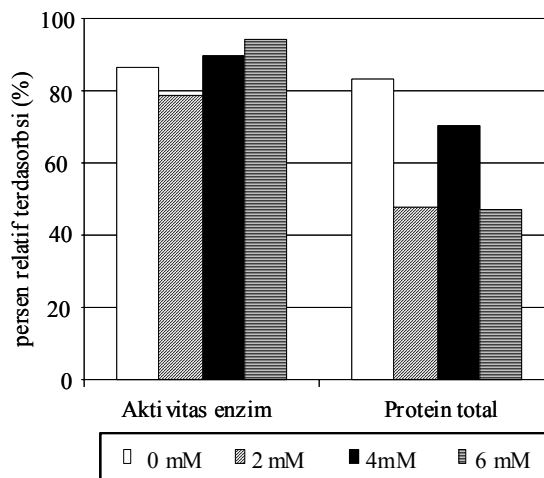


Gambar 10. Pengaruh ion logam Ca^{2+} dan Cu^{2+} sebagai ligan terhadap aktivitas spesifik lipase pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. *Running buffer* mengandung 2 mM imidazol pH 7, NaCl 0,5 M. Elusi I : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl 20 mM imidazol; elusi II : Buffer fosfat pH 7 mengandung 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol.

Optimasi imidazol dalam *running buffer* dilakukan dengan penambahan berbagai konsentrasi imidazol (0 mM imidazol, 2 mM imidazol, 4 mM imidazol, 6 mM imidazol) dalam *running buffer*. Ion logam yang digunakan adalah Cu^{2+} karena berdasarkan penelitian ini, ion logam Cu^{2+} dapat mengikat lipase lebih baik dari Ca^{2+} . Dalam penelitian ini digunakan elusi dua tahap. Elusi I dengan menggunakan buffer fosfat (pH 7 mengandung 0,5 M NaCl dan 20 mM imidazol) yang berfungsi untuk melepas kontaminan protein sehingga diharapkan sebagian besar kontaminan protein yang mempunyai afinitas pengikatan rendah akan terelusi. Elusi II dengan buffer fosfat pH 7 yang mengandung 0,5 M NaCl, 100 mM Imidazol.

Dari gambar 11 dapat dilihat bahwa lipase teradsorbsi pada *running buffer* dengan konsentrasi imidazol 0 mM, 2 mM, 4 mM dan 6 mM adalah sebesar 86,77%, 79,06%, 89,74% dan 94,76%, sedangkan protein total yang teradsorbsi adalah sebesar 83,36%, 47,42%,

70,55% dan 47,27%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan peningkatan konsentrasi imidazol akan cenderung meningkatkan lipase teradsorbsi dan menurunkan protein total teradsorbsi. Peningkatan konsentrasi imidazol dalam *running buffer* dapat meningkatkan selektivitas adsorben terhadap lipase yang mempunyai afinitas yang tinggi.



Gambar 11. Pengaruh konsentrasi imidazol dalam *running buffer* terhadap adsorbsi lipase dan protein total pada pemurnian lipase menggunakan matrik Zirconia agarosa. Ion logam yang digunakan sebagai ligan adalah Cu^{2+} .

Dari hasil optimasi elusi maka *running buffer* yang mengandung 2 mM imidazole dipilih sebagai kondisi optimum karena enzim yang terikat lebih mudah untuk dielusi dan menghasilkan enzim dengan aktivitas spesifik yang tinggi (17,57 U/mg). Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa lipase belum terdesorbsi secara sempurna karena sebagian besar enzim yang teradsorbsi belum terelusi. Hal ini ditunjukkan dengan persentase aktivitas terelusi yang kurang dari 50% dari total aktivitas teradsorbsi sehingga diperlukan strategi untuk meningkatkan hasil elusi, salah satunya adalah dengan menaikkan konsentrasi imidazol pada buffer yang digunakan untuk elusi serta meningkatkan volume elusi.

KESIMPULAN

Kapasitas adsorpsi dari Cu^{2+} amobil dalam mengikat lipase adalah 2 kali lebih tinggi dibandingkan dengan Ca^{2+} . Penambahan imidazol pada *running buffer* dapat meningkatkan selektivitas adsorben dalam mengikat protein. Kondisi optimum pemurnian enzim lipase adalah penggunaan Cu^{2+} sebagai ligan dan *running buffer* yang mengandung 2 mM imidazol pada pH 7.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Liesine, J., Racaityte, K., Morkeviciene, M., Valancius, P. dan Bumelis, V., 1997. Immobilized Metal Affinity Chromatography of Human Growth Hormone Effect of Ligand Density. *J. Kromatogr. A*. 764:27-33
- [2] Stanbury, P.F. dan Whitaker, A., 1984. *Principle of Fermentation Technology*. Pergamon Press. Ltd. Oxford, England.
- [3] Deutscher dan Murray, P., 1990. *Guide to Protein Purification*. Academic Press, Sandiego-California.
- [4] Hidayat, C., Mikio, N., Mutsumi, T. dan Tosihomi, Y., 2003. Development of New Dye-Metal Agarose-Coated Alumina Matrix and Elution Strategy for Purification of Alcohol Dehydrogenase. *J. Bioscience, Bioeng.* 95, 2:133-138
- [5] Clemmitt, R.H. dan Chase, H.A., 2000. Immobilized Metal Affinity Chromatography of β -galactosidase from Unclarified *Escherichia coli* Homogenated Using Expanded Bed Adsorption. *J. Chromatogr. A*, 27-43
- [6] Arnold, F.H., 1991. Metal Affinity Separation-a New Dimension in Protein Processing. *Biotechnology*, 9:151-156
Fitton, V. dan Santarelli, X., 2001. Evaluation of Immobilized Metal Affinity Chromatography for Purification of penicillin acylase. *J. Chromatogr. B*, 135-140
- [7] Armisen, P., Mateo, C., Cortes, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., Garcia, J.L., fernandez-lafrente, R., Guison, J.M., 1999 Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate support. *J. Chromatography. A*, 848: 61-70.
- [8] Minarni, W.S., 2005. *Matrik Alumina Agarosa untuk Pemurnian Enzim Lipase dari Kecambah Biji Wijen*. Tesis S2. Program Pasca Sarjana FTP UGM, Yogyakarta
- [9] Susan, M., O'Brien, Owen, R.T., Thomas dan Dunnill, P., 1996. Non Porous Magnetic Chelator Supports for Protein Recovery by Imobilized Metal Affinity Adsorption. *J. Biotech.* 50:113-125.
- [10] Sanchez, J., Verdoni, N., Fitton, V. dan Santerelli, X., 2001. Efficient Two-Step Chromatographic Purification on penicillin acylase from Clarified *Escherichia coli* Ultrasonic Homogenate. *J. Chromatogr. B*, 753: 45-50