
BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Insulin merupakan salah satu jenis protein terkecil di dunia yang terdiri dari 51 asam amino. Insulin terbuat dari bahan baku glukosa dan garam yang difermentasi menggunakan bakteri *E. coli*. Sampai saat ini, di Indonesia belum pernah didirikan pabrik insulin. Kebutuhan insulin di Indonesia dicukupi dengan cara mengimpor insulin dari luar negeri dalam bentuk kristal sehingga harga jualnya relatif mahal.

Insulin adalah hormon pertama yang ditemukan pada akhir tahun 1920 di Kanada oleh Sir Frederick Grant Banting dan Charles Herbert Best [1]. Banting adalah ilmuwan medis berkebangsaan Kanada. Ia lahir pada tanggal 14 November 1891 di Alliston, Ontario. Setelah menyelesaikan studi mengenai pengobatan di Universitas Toronto, ia membantu Pasukan Medis Tentara Kanada selama Perang Dunia I. Ketika perang berakhir, Banting kembali ke Kanada dan mengajar di Universitas Toronto. Ia dibantu oleh asistennya yang bernama Charles Herbert Best atau lebih dikenal dengan Best. Best lahir pada tanggal 27 Februari 1899 di West Pembroke, Maine, Amerika dari orangtua berkebangsaan Kanada. Pada usia 22 tahun, ia bekerja sebagai asisten Banting dan mempunyai peranan penting dalam penemuan hormon insulin sehingga namanya juga tercatat sebagai penerima Nobel dalam bidang obat-obatan [2].

Pada Oktober 1920, Banting dan Best berhasil menemukan insulin dengan cara mengikatkan benang di sekeliling saluran pankreas pada sepuluh ekor anjing. Ketika mereka memeriksa saluran pankreas tersebut beberapa minggu kemudian, semua sel pencernaan pada pankreas telah menghilang (mati dan diserap oleh sistem imunitas atau sistem kekebalan) dan yang tertinggal hanyalah ratusan islet. Kemudian mereka mengisolasi protein dari islet-islet tersebut dan menemukan insulin.

Seiring dengan perkembangan teknologi, pada tahun 1980 ditemukan cara untuk membuat insulin manusia. Setiap manusia mempunyai struktur insulin yang sama sehingga penggunaan insulin jenis ini tidak akan menyebabkan alergi. Penggunaan insulin untuk mengobati penderita diabetes mellitus mulai meluas dan kebutuhan akan insulin ini terus mengalami peningkatan sekitar 5 % sampai dengan 6 % setiap tahunnya. Jika di Indonesia dapat didirikan pabrik insulin, maka harga jualnya akan lebih murah dibandingkan jika diimpor dari luar negeri.

I.2. Sifat-Sifat Bahan Baku dan Produk

Bahan baku yang digunakan untuk pembuatan insulin adalah glukosa ($C_6H_{12}O_6$), natrium klorida ($NaCl$), udara (nitrogen dan oksigen), amonia (NH_3), air (H_2O), natrium hidroksida ($NaOH$) dan asam fosfat (H_3PO_4).

I.2.1. Glukosa ($C_6H_{12}O_6$)

Glukosa yang berupa bubuk putih dan memiliki titik leleh $153-156\text{ }^{\circ}C$ ini banyak digunakan untuk pembuatan sirup, gula jagung, gula anggur dan

sebagainya. Senyawa ini mempunyai rumus molekul $C_6H_6O_{12}$ dan mudah terbakar [3].

I.2.2. Natrium Klorida (NaCl)

Pada umumnya, masyarakat lebih mengenal natrium klorida ini sebagai garam. Garam yang dimaksud bisa berupa garam laut ataupun garam meja. Senyawa ini mempunyai bentuk fisik berupa kristal atau bubuk berwarna putih, titik lelehnya $804\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan titik didihnya $1413\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Natrium klorida dapat larut dalam air dengan kelarutan 35,7 g dalam 100 g air pada suhu $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kontak dengan kulit, mata atau saluran pernafasan dapat menyebabkan iritasi [4]. Cara penyimpanannya harus dihindarkan dari suhu tinggi dan tidak berkontak dengan air ataupun uap air [5].

I.2.3. Amonia (NH_3)

Amonia yang berbentuk gas biasanya disebut sebagai gas amonia. Gas ini tidak mempunyai warna, kelarutannya dalam air tinggi, memiliki titik leleh $-77,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan titik didih $-33,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Senyawa ini bersifat higroskopis, korosif, mudah terbakar dan beracun.

Kontak dengan saluran pernafasan atau kulit dapat berakibat fatal. Pada konsentrasi 500 ppm dapat menimbulkan gangguan yang cukup serius pada kesehatan. Kontak dengan mata harus dihindari karena sangat berbahaya dan dapat menyebabkan kebutaan [6].

I.2.4. Natrium Hidroksida (NaOH)

Natrium hidroksida sering pula disebut sebagai soda kaustik, *lye* atau natrium hidrat. Bentuknya berupa padatan berwarna putih dan tidak berbau. Senyawa ini mempunyai angka kelarutan yang cukup tinggi yaitu sekitar 111 g dalam 100 g air. Titik didihnya 1390°C dan titik lelehnya 318°C . Sifatnya korosif dan mudah terbakar.

Senyawa ini dapat bereaksi dengan air dan berbagai jenis asam, sangat higroskopis dan dapat mengikat uap air dari udara serta bereaksi dengan karbondioksida dari udara untuk membentuk natrium karbonat. Kontak antara natrium hidroksida dengan asam atau dengan komponen organik pada senyawa halogen, dapat mengakibatkan terjadinya ledakan. Jika terhirup, senyawa ini dapat membahayakan saluran pernafasan [7].

I.2.5. Asam Fosfat (H_3PO_4)

Nama lain dari asam fosfat adalah hidrogen fosfat atau asam fosfat putih. Bentuk fisiknya berupa cairan yang tidak berwarna atau bening. Asam fosfat dapat larut sempurna dalam air, berapapun jumlah air yang digunakan. Titik didihnya 158°C dan mempunyai titik leleh 21°C [8]. Sifatnya korosif sehingga sebaiknya dihindarkan dari logam. Kontak dengan mata, kulit dan saluran pernafasan dapat menyebabkan iritasi [9].

Asam fosfat tidak berbahaya bagi lingkungan karena jika dibuang ke tanah, senyawa ini akan merembes hingga mencapai air tanah. Kemudian berbagai macam mineral yang terkandung dalam air tanah akan menetralkan sifat asamnya, sedangkan fosfatnya akan bergabung dengan mineral-mineral pada air tanah [8].

I.2.6. Insulin

Insulin dibuat dari 51 asam amino dan merupakan salah satu jenis protein terkecil yang diketahui. Insulin manusia mempunyai berat molekul 5734. Insulin terdiri dari dua rantai polipeptida, yang sering disebut sebagai rantai A dan rantai B. Rantai A mengandung 21 asam amino dan rantai B mengandung 30 asam amino. Insulin diproduksi sebagai proinsulin dan termasuk sebagai hormon aktif.

I.3. Kegunaan Produk

Insulin merupakan hormon dan dapat digolongkan sebagai protein. Insulin diproduksi oleh sekelompok sel pada pankreas yang disebut sel islet. Insulin ini berguna untuk mendeteksi peningkatan gula darah dalam tubuh setelah kita makan dan menjaga metabolisme karbohidrat, protein dan lemak. Tanpa insulin, kita dapat makan sebanyak-banyaknya karena kita selalu berada dalam kondisi lapar sebab sel-sel tubuh tidak dapat mengolah kalori yang terkandung dalam glukosa dengan baik.

Insulin dapat digunakan untuk mengobati penderita diabetes mellitus tipe 1. Penyakit ini jarang ditemukan dan biasanya menyerang manusia pada usia 14 tahun sampai dengan 40 tahun. Diabetes mellitus tipe 1 adalah suatu kondisi di mana tubuh dalam keadaan kekurangan insulin. Sel islet pada pankreas tidak dapat mencukupi kebutuhan insulin pada tubuh sehingga kadar gula darah berada pada level di bawah normal. Penderita yang mengalami gangguan ini akan kehilangan berat badannya hanya dalam beberapa hari.

Pengobatan dilakukan dengan injeksi insulin di bawah kulit sehingga insulin akan terikut dalam aliran darah dan dapat mencapai sel-sel tubuh yang membutuhkannya. Insulin tidak dibuat dalam bentuk pil sebab asam lambung akan menghancurkan insulin sebelum insulin sempat bekerja.

Tubuh dapat pula mengalami suatu keadaan yang disebut *insulin resistance* atau lebih dikenal dengan diabetes mellitus tipe 2. Penyakit ini terjadi pada manusia di atas usia 40 tahun hingga usia lanjut. Pada kasus ini, level insulin sedikit lebih tinggi dari level normal. Sel-sel tubuh penderita tidak dapat atau lambat dalam merespon insulin sehingga tidak dapat mengabsorpsi gula dengan baik. Kadar gula darah akan lebih tinggi dari keadaan normal. Pengobatannya dengan cara menjalankan diet agar diperoleh berat badan yang ideal dan injeksi insulin jika diperlukan.

BAB II

URAIAN DAN PEMILIHAN PROSES

BAB II

URAIAN DAN PEMILIHAN PROSES

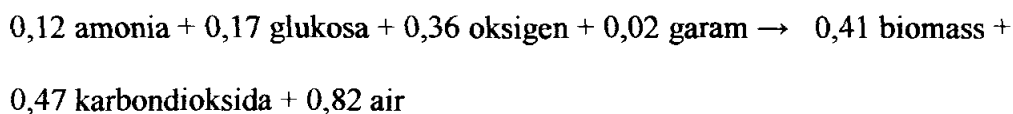
II.1. Proses Pembuatan Insulin

Secara garis besar, proses pembuatan insulin dibagi menjadi empat tahap, yaitu tahap fermentasi, tahap *primary recovery*, tahap reaksi dan yang terakhir adalah tahap *final purification*. Proses pembuatan insulin harus melewati empat tahap tersebut di atas agar dapat menghasilkan insulin dengan mutu yang baik. Sampai saat ini belum ditemukan proses lain untuk membuat insulin sehingga semua pabrik insulin dalam pembuatannya menggunakan proses di atas.

II.2. Uraian Proses

Tahap awal pembuatan insulin adalah dengan proses **Fermentasi**. Pada proses ini, media fermentasi disiapkan dalam tangki stainless steel (V-101) dan disterilisasikan di heat sterilizer (ST-101). Kompresor (G-101) dan filter (AF-101) berguna untuk mengalirkan udara dan amonia menuju fermentor (V-102). Dalam fermentor terdapat bakteri *E. coli* untuk menghasilkan Trp-proinsulin (Tryptophan-proinsulin). Waktu fermentasi adalah 18 jam dengan suhu 37 °C. Trp-proinsulin berakumulasi ke dalam sel *E. coli* sebagai IB's (*Inclusion Body*). Pada kondisi awal, diasumsikan jumlah IB's sebesar 20 % dari total berat kering.

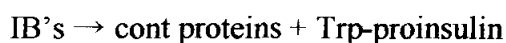
Reaksinya sebagai berikut :



Setelah fermentasi selesai, tahap berikutnya adalah **Primary Recovery**. Pada tahap ini, larutan dari fermentor yang disebut *broth* dimasukkan dalam surge tank (V-106) sebelum disentrifugasi dalam centrifuge (DS-101) yang berguna untuk menghilangkan impurities. Dalam blending tank (V-109), larutan diencerkan menggunakan WFI (*Water for Injection*), EDTA dan TRIS-Base. Kemudian digunakan homogenizer (HG-101) dan selanjutnya larutan disentrifugasi lagi, lalu dimasukkan dalam blending tank (V-110). Larutan yang keluar dari blending tank akan disentrifugasi ulang agar kandungan impurities tidak terlalu besar. Volume slurry pada akhir tahap primary recovery ini sebanyak 1400 L.

Tahap selanjutnya adalah tahap **Reaksi** yang dapat dikelompokkan seperti di bawah ini :

Inclusion Body (IB's) Solubilization. Tahap reaksi ini meliputi pelarutan IB's yang akan dimasukkan dalam tangki (V-103) dan dicampur dengan urea dan MrETOH. Waktu reaksinya adalah 8 jam supaya kelarutan IB's mencapai 95 %. Reaksinya pelarutannya yaitu :



Setelah reaksi pelarutan selesai, urea dan MrETOH dicampur dengan WFI dan larutan akan dipekatkan menggunakan diafilter (DF-101) dengan waktu operasi 6 jam dan yieldnya 98 %. Biomass, debris dan IB's akan dihilangkan menggunakan dead-end filter (DE-101).

Inclusion Body (IB's) Solubilization akan dilanjutkan dengan **CNBr Cleavage**. CNBr direaksikan dengan larutan dari dead-end filter selama 12 jam pada suhu 20 °C. Reaksinya yaitu seperti di bawah ini :

Trp-proinsulin $\rightarrow$ cont proteins + denatured proinsulin

Asam format, CNBr yang tidak bereaksi dan gas sianida akan dihilangkan menggunakan rotary vacuum evaporator (CSP-101) yang beroperasi selama 1 jam.

Setelah CNBr Cleavage, tahapan selanjutnya adalah **Sulfitolysis**. Sulfitolysis dari *denatured* proinsulin berlangsung dalam tangki (V-105). Produknya berupa proinsulin-S SO₃. Campuran hasil sulfitolysis mengandung 50 % (w/w) guanidine HCl, 0,35 % amonium bikarbonat (NH₄HCO₃), 3 % Na₂SO₃ dan 1,5 % Na₂O₆S₄. Waktu reaksi adalah 12 jam dan yieldnya mencapai 95 %. Setelah reaksi sulfitolysis selesai, larutan sulfitolysis ditambah dengan WFI sehingga konsentrasi akhir guanidine HCl sebesar 20 % (w/w). Setelah itu dilakukan filtrasi menggunakan diafilter (DF-101). Kemudian proinsulin-S SO₃ akan dikromatografi menggunakan kolom kromatografi (C-101). Larutan yang masuk kolom kromatografi mengandung 69,5 % (w/w) WFI, 29 % urea dan 1,5 % NaCl. Resin yang digunakan adalah resin penukar kation. Diasumsikan untuk *loading* kolom kromatografi ini dibutuhkan waktu 30 menit dan kapasitas total dari resin adalah 20 mg/mL.

Setelah melalui kolom karomatografi, larutan akan mengalami proses **Refolding**. Refolding terjadi dalam tangki (V-107). Reaksinya yaitu :

proinsulin-S SO₃ $\rightarrow$ proinsulin

Reaksi terjadi pada suhu 8 °C selama 12 jam, yield yang dicapai sebesar 85 %. Setelah refolding selesai, larutan dialirkan menuju diafilter (DF-102). Kemudian proinsulin-S SO₃ dimurnikan lagi secara kromatografi dalam kolom kromatografi (C-102). Diasumsikan untuk *loading* kolom kromatografi ini dibutuhkan waktu 30 menit dan kapasitas total dari resin adalah 20 mg/mL.

Tahap selanjutnya setelah refolding adalah ***Enzymatic Conversion***. Penghilangan ikatan C-peptida dari proinsulin-S SO₃ berlangsung secara enzimatis (menggunakan tripsin dan carboxypeptidase B) dalam tangki (V-108). Tripsin memutus ikatan pada lysine dan residu arginine, sedangkan carboxypeptidase B menghilangkan asam-asam amino. Suhu reaksi 30 °C dan waktunya adalah 4 jam, yieldnya 95 %. Reaksinya adalah :

proinsulin → cont proteins + insulin

Selesainya reaksi pada konversi enzim menunjukkan berakhirnya tahap reaksi. Tahapan pembuatan insulin selanjutnya adalah tahap **Final Purification**. Pada final purification, larutan hasil konversi enzim dialirkan ke diafilter (DF-102). Kolom kromatografi (C-103) digunakan untuk memurnikan larutan insulin. Diasumsikan untuk *loading* kolom kromatografi ini dibutuhkan waktu 30 menit dan kapasitas total dari resin adalah 20 mg/mL. Kemudian larutan difiltrasi lagi dengan diafilter (DF-103) dan dimasukkan dalam kolom kromatografi (C-104). Diasumsikan untuk *loading* kolom kromatografi ini dibutuhkan waktu 30 menit dan kapasitas total dari resin adalah 15 mg/mL. Larutan ini akan difiltrasi dengan diafilter (DF-103).

Purification juga dilengkapi dengan kolom kromatografi untuk filtrasi gel (C-105). Diasumsikan untuk *loading* kolom kromatografi ini dibutuhkan waktu 30 menit.

Larutan yang keluar akan dipekatkan dengan diafilter (DF-104) sehingga dalam 500 L larutan terkandung 12,8 kg insulin.

Selanjutnya larutan dialirkan ke kristaliser (V-111) yang beroperasi selama 12 jam pada suhu 5 °C sehingga terbentuk kristal insulin. Akhirnya, kristal tersebut akan dikeringkan menggunakan freeze dryer (FDR-101). Kemurnian dari kristal insulin ini mencapai 99,5 % hingga 99,9 %.