ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

NOVIYATI

OPTIMASI KONSENTRASI AMONIUM SULFAT PADA FRAKSINASI UNTUK ISOLASI PARSIAL PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL *Solanum laciniatum* Ait.

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2005

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lembar Pengesahan

OPTIMASI KONSENTRASI AMONIUM SULFAT PADA FRAKSINASI UNTUK ISOLASI PARSIAL PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL *Solanum laciniatum* Ait.

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

2005

Oleh :

NOVIYATI
NIM. 050112449

Skripsi ini telah disetujui
Oleh :

Pembimbing Utama	Pembimbing Serta
Prof. Dr. Gunawan Indrayanto, Apt.	Drs. A. Toto Poernomo, M.Si., Apt.
NIP : 130 541 814	NIP : 131 755 998

Tiga hal yang bisa menyelamatkan dan membuat tenang hati manusia…

Pertama, bersyukur atas apa yang telah diberikan Allah SWT kepada kita

Kedua, sabar dengan semua cobaan dari Allah SWT

Dan yang ketiga, ridho dengan apa yang terjadi terhadap kita.

Sebuah persembahan untuk :

Bapak dan Ibu tercinta

Atas semua kasih sayang, cinta, dan doa yang telah diberikan

Dan atas semua kerja keras yang telah dilakukan selama ini

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayahNya sehingga skripsi **"OPTIMASI KONSENTRASI AMONIUM SULFAT PADA FRAKSINASI UNTUK ISOLASI PARSIAL PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL *Solanum laciniatum* Ait."** ini akhirnya dapat terselesaikan.

Dengan terselesainya skripsi ini, saya sangat bersyukur dan berterima kasih atas semua bantuan yang telah diberikan. Perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto dan Drs. A. Toto Poernomo, Apt. MSi selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, wawasan, bantuan moril maupun materiil, nasehat, dorongan dan semangat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
2. Dr. Hj. Isnaeni, Apt. MSi dan Dra. Noor Erma NS.,MS selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Prof. Dr. Noor Cholies Zaini, Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas selama saya menyelesaikan pendidikan program sarjana di fakultas farmasi ini.
4. Dra. Tutiek Purwanti, MSi selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan serta dorongan kepada saya selama mengikuti pendidikan program sarjana di fakultas farmasi ini.
5. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah mendidik dan memberikan ilmu serta wawasan selama saya menyelesaikan pendidikan program sarjana di fakultas farmasi ini.
6. Kedua orang tua tercinta : Abdul Soleh dan Rukanah yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh cinta dan kasih sayang.
7. Kakak dan Adik tercinta : Mas Didik beserta keluarga dan Deny, serta keluarga saya lainnya yang selalu menyayangi saya.
8. Yang telah menemani dan memberikan warna dalam setiap langkah saya dengan semua rasa yang ada : Yusuf (Gin).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

9. Teman-teman yang ada di Grup Riset Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga : Mbak Pipit, Mbak Ayu, Mas Buntaran, Mbak Dewi, Mbak Lidya, Mbak Zuririn, Mas Abid, Mas Andri, Mas Eko, atas semua bantuan, kerja sama, dorongan dan semangat yang telah diberikan.
10. Semua pihak yang telah membantu dan mempermudah pengerjaan skripsi ini : Bu Retno, Mbak Zumaroh, Mbak Yuyun, Mbak Evi, Mbak Yanti, Mas Gunarso, Mas Faris, Mas Mahardian, Pak Bakir, Pak Sudji, Pak Sunar, Pak Haryono, Pak Khusairi, Mas Iwan, Pak Djarwo, Pak Parto, Bu Indah, Pak Kusen, Bu Helen.
11. Bu Kusmawati atas semua bantuan secara moril dan materiil yang telah diberikan selama saya di fakultas farmasi ini.
12. Semua teman angkatan 2001 yang telah bersama-sama menuntut ilmu kefarmasian selama ini dalam senang maupun susah, terutama Nina dan Fenny; dan juga untuk teman saya, Lia.
13. Semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu per satu yang telah membantu saya baik moril maupun materiil sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program sarjana di fakultas farmasi ini.

Akhir kata, dengan menyadari segala kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, semoga dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu kefarmasian.

Surabaya, Mei 2005

Penyusun

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

RINGKASAN

OPTIMASI KONSENTRASI AMONIUM SULFAT PADA FRAKSINASI UNTUK ISOLASI PARSIAL PABA-GLUKOSILTRANSFERASE DARI KULTUR SUSPENSI SEL *Solanum laciniatum* Ait.

Noviyati

Metabolit sekunder yang merupakan produk tanaman dapat diproduksi dengan kultur sel tanaman secara in vivo (Kurz & Constable, 1982). Selain dapat memproduksi metabolit sekunder, kultur jaringan tanaman juga dapat digunakan untuk sistem biotransformasi (Best, 1985).

Reaksi biotransformasi dengan kultur jaringan tanaman yang telah diteliti antara lain reaksi biotransformasi glukosilasi asam para amino benzoat (PABA) oleh kultur suspensi sel *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* menjadi β-D-glucose-1-*p-aminobenzoate* (juga disebut *p-aminobenzoic acid 7-O-β-D-glucopyranosyl ester*) (Syahrani *et al.*, 1999; Panjaitan *et al.*, 2000), dikatalisis oleh enzim PABA-glukosiltransferase.

Biotransformasi in vivo memiliki kendala diantaranya produk biotransformasi ini diakumulasi di dalam sel, sedikit sekali yang didapatkan pada media (Panjaitan *et al.*, 2000). Sedangkan untuk isolasi produk harus dilakukan dengan mengekstraksi massa sel yang diperlukan untuk melakukan biotransformasi (Syahrani, 1996), dan keterbatasan kultur suspensi sel tanaman ataupun kultur fermentor tanaman yang tidak stabil selama dilakukan subkultur (Indrayanto & Rahman, 1990).

Untuk mengatasi keterbatasan biotransformasi tersebut dilakukan isolasi enzim dengan salah satu tahapannya yang paling sering dilakukan adalah fraksinasi dengan amonium sulfat agar enzim yang terdapat dalam ekstrak kasar terpekatkan (Englard & Seifter, 1990).

Penelitian-penelitian isolasi glukosiltransferase dengan fraksinasi amonium sulfat antara lain penelitian Li *et al.* (1997) yang mengisolasi *4–hydroxybenzoate glucosyltransferase* menggunakan fraksi enzim 33–55%. Hasegawa *et al.* (1997) juga mengisolasi limonoid glukosiltransferase menggunakan fraksi enzim 40–80%, juga Mizukami *et al.* (1985) mengisolasi *Salicyl alcohol glucosyltransferase* diambil dari fraksi 0–80%. Rahmawati (2001) pada penelitian isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum mammosum* L. dengan fraksinasi amonium sulfat mendapatkan enzim pembentuk produk yang menyerupai PABA-glukosida aktivitasnya terbesar pada fraksi enzim 40-50%.

Untuk mengetahui pada konsentrasi amonium sulfat ke berapa enzim PABA– glukosiltransferase diproduksi dari ekstrak kasar *Solanum laciniatum* dan memiliki aktivitas yang optimum maka perlu dilakukan optimasi.

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* ditanam dalam media Murashige-Skoog yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan kinetin (2 ppm) dan 2,4D (0,5 ppm). Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* (SL_4) dibuat dengan melakukan pemindahan ± 5 g sel dari media padat ke dalam media cair.

Isolasi enzim PABA-glukosiltransferase pada kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* yang dipanen pada usia kultur hari ke-5. Sel-sel kultur ± 50 g dibekukan dan digerus lalu ditambahkan PVPP 10% dari berat basah sel, digerus sampai homogen kemudian ditambah dapar Tris HCl 0,5 M pH 6 sebanyak 1,5 kali berat basah sel (± 75 mL), disentrifugasi dingin (4°C) 10.000 *g*, 30 menit. Supernatan sebagai ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) diambil.

Fraksinasi *Crude enzyme* dengan penambahan sejumlah tertentu amonium sulfat menurut fraksi penjenuhan yang diinginkan. Hasil fraksinasi disentrifugasi dingin (4°C) 10.000 *g*, 30 menit. Endapan yang diperoleh dilarutkan dalam 1,5 mL dapar Tris HCl 0,5 M pH 5, untuk supernatannya dilakukan fraksinasi lebih lanjut. Fraksi enzim yang didapat dilakukan uji aktivitas relatif enzim dengan penambahan substrat PABA 7,3 mM 60 µL, substrat UDP-glukosa 7,3 mM 60 µL, dan dapar Tris HCl 0,5 M pH 5 sebanyak 200 µL kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar (29°C) di dalam *incubation shaker* dengan kecepatan 75 rpm sehingga terjadi reaksi enzimatik dan terbentuk produk. Reaksi ini ini dihentikan dengan aseton 360 µL. Kemudian disentrifugasi 3500 rpm 5 menit, diambil larutannya dan dilakukan uji aktivitas enzim dengan KLT.

Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam silika gel 60 F_{254}, fasa gerak menggunakan campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10 (v/v). Penampak noda menggunakan sinar UV. Analisis densitometer dilakukan pada panjang gelombang 254 nm. Aktivitas enzim dihitung relatif terhadap PABA dengan membandingkan luas area produk dengan luas area PABA.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan : konsentrasi amonium sulfat yang optimal pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* adalah 20%.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan produk baru yang mempunyai Rf yang berbeda dengan PABA glikosida. Profil dan λ maks dari produk juga berbeda dengan PABA-glikosida dilihat dari absorban-reflektan dari noda keduanya; disarankan produk perlu diidentifikasi untuk menentukan struktur kimianya. Fraksi enzim yang telah diperoleh perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut misalnya dengan filtrasi gel atau dengan cara-cara kromatografi lainnya, dan pada kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* perlu ditentukan indeks pertumbuhannya sehingga dapat dicari korelasi yang lebih tepat antara pertumbuhan sel dengan produksi enzim.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

ABSTRACT

OPTIMATION OF AMMONIUM SULFATE CONCENTRATION IN FRACTIONATION TO PARSIAL ISOLATION PABA-GLUCOSYLTRANSFERASE FROM CELL SUSPENSION CULTURES OF *Solanum laciniatum* Ait.

Cell suspension culture of *Solanum laciniatum* has been known could perform biotransformation of PABA to PABA-glucoside (β-D-glucose-1-*p-aminobenzoate*), catalized by PABA-glucosyltransferase. The aim of this research is to isolate this enzyme and doing optimation of ammonium sulfate concentration in fractionation of PABA-glucosyltransferase. The sample acquired from cell suspension culture of Solanum laciniatum which is cultivated in day 5th, filtered using Buchner and that cell finely pounded, mixed with PVPP, then extracted with buffer Tris HCl Separated the enzyme in the mixture of cell by fractionation with ammonium sulfate. Enzyme fraction had incubated with substrate PABA and UDP-glucose. An enzyme assay is measured by the appearance of the product with time. This showed that in the cell suspension culture of *Solanum laciniatum* contain of PABA-glucosyltransferase because it can perform product that maybe one of the product from PABA glucoside.

In catalyzing production of the product, enzyme fraction activity was highest at 20% ammonium sulfate concentration.

Keywords : *Solanum laciniatum,* p-aminobenzoic acid (PABA), enzyme isolation, enzyme fractionation, ammonium sulfate concentration.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL

LEMBAR PENGESAHAN

KATA PENGANTAR iii

RINGKASAN v

ABSTRACT vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL xi

DAFTAR GAMBAR xii

DAFTAR LAMPIRAN xiii

DAFTAR SINGKATAN xiv

BAB I PENDAHULUAN 1

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 3

1.3 Tujuan Penelitian 3

1.4 Manfaat Penelitian 3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 4

2.1 Tinjauan tentang Kultur Jaringan Tanaman 4

2.1.1 Tinjauan umum Kultur Jaringan Tanaman 4

2.1.2 Tinjauan Media Kultur Jaringan Tanaman 4

2.2 Tinjauan Tentang Biotransformasi 6

2.3 Tinjauan Tentang Enzim 7

2.3.1 Tinjauan Enzim secara Umum 7

2.3.2 Tinjauan Umum Tentang Isolasi dan Pemurnian Enzim 8

2.3.3 Tinjauan Tentang Teknik Pengendapan Enzim 10

2.3.4 Tinjauan Terhadap Beberapa Penelitian Isolasi Glukosiltransferase 11

2.4 Tinjauan Tentang Glikosida 13

2.5 Tinjauan Tentang Asam *para*–Aminobenzoat (*para*-Aminobenzoic acid = PABA) 14
2.6 Tinjauan Tentang *Solanum laciniatum* 16
2.7 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 16
2.7.1 Tinjauan Umum KLT 16
2.7.2 KLT-Densitometer 17
2.8 Tinjauan Tentang Metode Analisis PABA dan PABA-Glukosida dengan Densitometer 18
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL 19
BAB IV METODE PENELITIAN 21
4.1 Alat 21
4.2 Bahan 21
4.2.1 Kultur *Solanum laciniatum* 21
4.2.2 Bahan-Bahan untuk Pembuatan Media Kultur 21
4.2.3 Bahan untuk Kultivasi Kultur Suspensi *Solanum Laciniatum* 21
4.2.4 Bahan untuk Ekstraksi, Fraksinasi, dan Uji Aktivitas Enzim 22
4.3 Metode Penelitian 22
4.3.1 Pembuatan Media Kultur Sel *Solanum laciniatum* ... 22
4.3.2 Kultivasi Kultur *Solanum laciniatum* 23
4.3.3 Metode Isolasi Enzim dengan Fraksinasi Amonium Sulfat 23
4.3.3.1 Ekstraksi Enzim 23
4.3.3.2 Fraksinasi Ekstrak Enzim Gubal (*Crude Enzyme*) 24
4.3.4 Pengujian Aktivitas Enzim Hasil Fraksinasi 24
4.3.5 Variasi Perlakuan 25

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB V HASIL PENELITIAN 26

5.1 Pengujian Awal 26

5.2 Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat pada Fraksinasi untuk Isolasi Enzim PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum* 29

5.2.1. Percobaan I 29

5.2.2. Percobaan II 33

BAB VI PEMBAHASAN 36

6.1 Pengujian Awal 36

6.2 Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat pada Fraksinasi untuk Isolasi Enzim PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum* 38

6.2.1. Percobaan I 39

6.2.2. Percobaan II 40

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN 42

7.1 Kesimpulan 42

7.2 Saran 42

DAFTAR PUSTAKA 43

LAMPIRAN

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

V.1. Hasil optimasi antara konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim PABA-glukosiltransferase terhadap luas area produk dan aktivitas relatif enzim percobaan I.....31

V.2. Hasil optimasi antara konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim PABA-glukosiltransferase terhadap luas area produk dan aktivitas relatif enzim percobaan II.....34

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

2.1. Struktur Asam *para*-Aminobenzoat 15

3.1 Bagan Kerangka Konseptual..... 20

5.1. Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum* (SL_4) 26

5.2. Hasil Analisis KLT dari Uji Aktivitas Fraksi Enzim pada Pengujian Awal.....27

5.3. Spektra absorban-reflektan noda diukur dengan densitometer pada panjang gelombang 200-370 nm.....28

5.4. Hasil Analisis KLT dari Uji Aktivitas masing-masing Fraksi Enzim pada Percobaan I 30

5.5. Grafik Optimasi Konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* pada Percobaan I.....32

5.6. Hasil Analisis KLT dari uji Aktivitas masing-masing Fraksi Enzim pada Percobaan II.....33

5.7. Grafik Optimasi Konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* pada Percobaan II.....35

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran Halaman

1. Komponen Kimiawi Media Murashige dan Skoog 46
2. Komponen Media untuk Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum* ... 47
3. Skema Pembuatan Media *Solanum laciniatum* 48
4. Skema Kerja Kultivasi Kultur *Solanum laciniatum* 49
5. Skema Kerja Isolasi Enzim PABA-Glukosiltransferase 50
6. Skema Fraksinasi Ekstrak Enzim Gubal (*Crude Enzyme*) 51
7. Skema Uji Aktivitas Relatif Enzim 52
8. Perhitungan aktivitas relatif enzim terhadap PABA 53

DAFTAR SINGKATAN

BAP	= Benzil amino purin
BSA	= Bovine serum albumin
2,4-D	= 2,4 dichlorophenoxy acetic acid
DEAE	= Diethyl amino ethyl
DMSO	= Dimethyl sulfoxide
DTT	= Dithiothreitol
EDTA	= Etilen diamin tetra acetat acid
GA3	= Giberelin acid
HPLC	= High Pressure/Performance Liquid Chromatography
IAA	= Indole acetic acid
IBA	= Indole butyric acid
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
LAFC	= Laminar Air Flow Cabinet
LD	= Lethal Dose
mg	= milli gram
mL	= milli liter
mM	= milli molar
MS	= Murashige-Skoog
NAA	= Naphthalene acetic acid
PABA	= Para-amino benzoic acid
PMSF	= Phenyl methyl sulfonyl fluoride
PVP	= Polyvinyl pyrrolidone
PVPP	= Polyvinyl polypyrrolidone
Rf	= Retardation factor
SDS-PAGE	= Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SL	= *Solanum laciniatum*
TCA	= Trichloro acetic acid
TLC	= Thin Layer Chromatography
Tris	= Tris (hydroxymethyl) aminomethane
UDP	= Uridin diphosphate
UV	= Ultraviolet
μg	= Mikro gram
λ	= panjang gelombang

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Suatu tanaman mengandung bahan aktif yang pada umumnya diekstraksi kemudian diisolasi untuk dimanfaatkan dalam bidang farmasi. Selain diekstraksi dan diisolasi, para ahli kimia juga mencari cara sintesis yang optimal untuk mendapatkan suatu senyawa aktif dari tanaman. Teknik ini mempunyai keterbatasan pada masalah kompleksnya struktur dan banyaknya tahapan reaksi (Kutney, 1993). Untuk mengatasi keterbatasan teknik tersebut di atas, penggunaan metode kultur jaringan/sel tanaman merupakan salah satu alternatif yang sangat prospektif.

Metabolit sekunder yang merupakan produk tanaman antara lain terpenoid, glikosida (steroid, fenol) dan alkaloid, dapat diproduksi dengan kultur sel tanaman secara in vitro (Kurz & Constabel, 1982). Selain dapat memproduksi metabolit sekunder, kultur jaringan tanaman juga dapat digunakan untuk sistem biotransformasi (Best, 1985). Biotransformasi adalah sebuah teknik yang menggunakan enzim-enzim yang ada dalam sel tanaman untuk mengubah gugus fungsional kimia dari senyawa eksogen. Biotransformasi banyak digunakan untuk meningkatkan aktivitas biologis suatu senyawa kimia (Morris *et al.*, 1985). Reaksi biotransformasi yang mampu dilakukan sistem kultur jaringan tanaman di antaranya hidroksilasi, oksidoreduksi, esterifikasi, ataupun glikosilasi (Dombrowski & Alferman, 1992).

Reaksi biotransformasi dengan kultur jaringan tanaman yang telah diteliti antara lain reaksi biotransformasi glukosilasi asam para amino benzoat (PABA) oleh kultur suspensi sel *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* menjadi β-D-glucose-1-*p-aminobenzoate* (juga disebut *p-aminobenzoic acid 7-O-β-D-glucopyranosyl ester*) (Syahrani *et al.*, 1999; Panjaitan *et al.*, 1000), dikatalisis oleh enzim PABA-glukosiltransferase.

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Produk biotransformasi ini diakumulasi di dalam sel (kemungkinan di dalam vakuola), sedikit sekali yang didapatkan pada media (Panjaitan *et al.*, 2000). Hal ini merupakan kendala untuk aplikasi skala yang lebih besar, karena isolasi produk harus dilakukan dengan mengekstraksi massa sel yang diperlukan untuk melakukan biotransformasi (Syahrani, 1996). Kendala yang lain adalah keterbatasan kultur suspensi sel tanaman ataupun kultur fermentor tanaman untuk memproduksi bahan alam, yaitu ketidakstabilannya selama dilakukan subkultur. Dari penelitian yang pernah dilakukan, kapasitas biotransformasi pada beberapa galur sel *Digitalis lanata* ternyata semakin berkurang setelah beberapa kali subkultur, bahkan kadang-kadang kapasitas kultur hilang sama sekali (Indrayanto & Rahman, 1990).

Untuk mengatasi keterbatasan biotransformasi tersebut di atas, ada perkembangan lebih jauh lagi yaitu teknik amobil yang menurut beberapa peneliti lebih efektif kerjanya, untuk itu terlebih dahulu harus diisolasi dan dikarakterisasi enzim yang berperan dalam reaksi biotransformasi tersebut dari kultur suspensi sel *Solanum mammosum* L. (Syahrani, 1996).

Salah satu tahapan isolasi enzim yang sering dilakukan adalah fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat agar enzim yang terdapat dalam ekstrak kasar terpekatkan (Englard & Seifter, 1990).

Penelitian-penelitian isolasi glukosiltransferase dengan fraksinasi amonium sulfat antara lain penelitian Li *et al.* (1997) yang mengisolasi *4–hydroxybenzoate glucosyltransferase* menggunakan fraksi enzim 33–55%. Hasegawa *et al.* (1997) juga mengisolasi limonoid glukosiltransferase menggunakan fraksi enzim 40–80%, juga Mizukami *et al.* (1985) mengisolasi *Salicyl alcohol glucosyltransferase* diambil dari fraksi 0–80%. Rahmawati (2001) pada penelitian isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum mammosum* L. dengan fraksinasi amonium sulfat mendapatkan enzim pembentuk produk yang menyerupai PABA-glukosida aktivitasnya terbesar pada fraksi enzim 40-50%.

Untuk mengetahui pada konsentrasi amonium sulfat ke berapa enzim PABA– glukosiltransferase diproduksi dari ekstrak kasar *Solanum laciniatum* dan memiliki aktivitas yang optimum maka perlu dilakukan optimasi.

Dalam penelitian ini, percobaan isolasi ekstrak kasar enzim PABA–glukosiltransferase dilanjutkan dengan memekatkan ekstrak kasar PABA–glukosiltransferase dengan fraksinasi amonium sulfat agar aktivitas enzim menjadi maksimal.

1. 2. Rumusan Masalah

Pada konsentrasi amonium sulfat berapakah enzim PABA–glukosiltransferase yang diisolasi dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* mempunyai aktivitas paling besar?

1. 3. Tujuan Penelitian

Mengetahui konsentrasi amonium sulfat yang paling optimal untuk mengendapkan PABA–glukosiltransferase, sehingga enzim ini mempunyai aktivitas terbesar.

1. 4. Manfaat Penelitian

Berdasarkan hasil penelitian ini, diharapkan diketahui konsentrasi amonium sulfat yang optimal dalam fraksinasi enzim PABA–glukosiltransferase yang diisolasi dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* sehingga didapatkan aktivitas enzim yang maksimal. Diperolehnya konsentrasi amonium sulfat yang optimal akan didapatkan fraksi enzim yang aktivitas enzimnya maksimum. Pada fraksi enzim ini dapat dilakukan pemurnian lebih lanjut, yang nantinya enzim PABA – glukosiltransferase murni dapat digunakan untuk reaksi enzimatik PABA secara in vitro tanpa menggunakan sel kultur *Solanum laciniatum*.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. TinjauanTentang Kultur Jaringan Tanaman

2.1.1. Tinjauan Umum Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik untuk menanam tumbuhan, organ, jaringan dan sel. Jaringan tanaman dapat dikultur pada media padat agar atau media nutrisi cair. Sel dari berbagai spesies tanaman dapat dikultur dalam keadaan aseptis dalam medium nutrisi (Gamborg,1982).

Kultur jaringan tanaman dapat dilakukan karena didasari teori bahwa tanaman mempunyai sifat totipotensi yang berarti setiap sel tanaman membawa seluruh informasi genetik dari tanaman tersebut dan memiliki kemampuan untuk tumbuh dan berkembang membentuk tanaman yang utuh (Hussey, 1986).

Kultur suspensi sel dapat didefinisikan sebagai kultur yang terdiri dari campuran agregat-agregat sel, kelompok-kelompok sel, atau sel-sel tunggal yang berasal dari pemindahan kalus ke dalam media cair. Keuntungan kultur suspensi sel (media cair) dibandingkan dengan kultur kalus (media padat) adalah sel lebih cepat tumbuh dan berkembang biak dalam media cair dan lebih mudah dikontrol (Gamborg,1982). Kultur suspensi sel diketahui relatif tidak stabil dibanding dengan kultur kalus misalnya dalam produksi metabolit sekunder, sehingga disarankan untuk membuat kultur suspensi sel yang baru dari stok kultur kalus yang ada (Petersen & Alfermann, 1993).

2.1.2. Tinjauan Media Kultur Jaringan Tanaman

Komponen media kultur sel atau jaringan tanaman merupakan faktor yang sangat penting untuk pertumbuhan optimal. Kebutuhan nutrisi ini bervariasi tergantung pada jenis dan bagian tanaman yang digunakan (Indrayanto,1988).

Komposisi media yang biasa digunakan pada suatu kultur jaringan tanaman (Gamborg, 1982; Indrayanto, 1988) adalah garam organik, zat pengatur tumbuh, vitamin, asam amino dan suplemen kompleks anorganik, sumber karbon, air, dan bahan pendukung media.

Garam anorganik, meliputi makroelemen, antara lain dalam bentuk garam NO_3^-, NH_4^+, Mg^{2+}, SO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}, K^+, Ca^{2+}, Cl^-, Na^+; dan mikroelemen, antara lain Cu^{2-}, Zn^{2+}, Mo^{6+}, Fe^{3+}, I^-, BO_3^{3+}, Mn^{2+}, Co^{2+}.

Zat pengatur tumbuh yang paling banyak digunakan oleh sel tanaman adalah auksin, sitokinin dan giberelin. Auksin berfungsi memberikan efek stimulasi terhadap perpanjangan sel pucuk, untuk inisiasi pembentukan kalus, dan untuk menginduksi pembelahan sel. Contoh dari auksin adalah NAA, IAA, IBA, NOA, P-CPA; 2,4,5-T; 2,4-D. Sitokinin berfungsi meningkatkan pembelahan sel di dalam jaringan tanaman, mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel, dan mempengaruhi diferensiasi pucuk. Contoh dari sitokinin adalah kinetin, benzilaminopurin (BAP), zeatin. Giberelin berfungsi untuk merangsang pertumbuhan normal tanaman, contohnya GA3 (Giberelin Acid).

Tiamin (vitamin B_1) merupakan vitamin yang paling esensial untuk hampir semua kultur jaringan tanaman, sedang asam nikotinat (niasin/vitamin B_3), kalsium pantotenat (vitamin B_5), dan piridoksin (vitamin B_6) untuk merangsang pertumbuhan.

Asam amino yang biasa ditambahkan ke dalam media kultur jaringan tanaman adalah glisina (asam aminoasetat). Apabila diperlukan campuran nitrogen organik, maka media dapat diperkaya dengan penambahan hidrosilat kasein maupun asam kasamin.

Sukrosa atau glukosa paling sesuai sebagai sumber karbon. Selain sukrosa, dapat digunakan sorbitol, maltosa, galaktosa, manosa atau laktosa. Air yang biasa digunakan dalam seluruh media kultur jaringan adalah aqua bidestilata atau air suling bebas mineral. Pada sistem kultur jaringan tanaman setengah padat (kultur statis), bahan pendukung yang banyak digunakan adalah agar-agar *Bacto Difco* dengan konsentrasi 0,6-1%.

Kondisi steril juga merupakan faktor penting yang harus dipenuhi dalam teknik kultur jaringan tanaman karena media kultur jaringan tanaman mengandung karbohidrat dalam kadar tinggi, yang merupakan penunjang bagi pertumbuhan mikroba (bakteri dan fungi). Umumnya mikroba dapat tumbuh lebih cepat dalam media kultur jaringan tanaman dibandingkan dengan sel tanaman dan dapat menghasilkan metabolit yang toksik terhadap tanaman (Indrayanto, 1988).

2.2. Tinjauan Tentang Biotransformasi

Kultur jaringan tanaman dapat digunakan untuk sistem biotransformasi (Best, 1985). Biotransformasi pada kultur jaringan tanaman adalah sebuah teknik yang menggunakan enzim-enzim yang ada dalam sel tanaman untuk mengubah gugus fungsional kimia dari senyawa kimia yang ditambahkan dari luar. Biotransformasi banyak digunakan untuk meningkatkan aktivitas biologis suatu senyawa kimia (Morris *et al.*, 1985).

Reaksi biotransformasi bersifat stereospesifik dan meliputi proses oksidasi, reduksi, hidroksilasi, metilasi, demetilasi, glikosilasi, esterifikasi, epoksidasi, isomerisasi, dan saponifikasi (Morris *et al.*, 1985; Indrayanto,1988).

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kapasitas dan kecepatan biotransformasi diantaranya adalah tanaman asal dan jajaran sel, komposisi dan kadar konsistuen media yang digunakan, presentase oksigen yang terlarut dalam media, cahaya, dan differensiasi sel (Indrayanto, 1988).

Reaksi biotransformasi yang terjadi pada kultur jaringan tanaman bisa bervariasi. Glikosilasi senyawa organik oleh kultur sel tanaman adalah reaksi yang paling menarik karena biotransformasi ini jarang didapat pada mikroorganisme, tetapi sangat sering terjadi pada kultur sel tanaman (Dombrowski & Alfermann, 1992). Tujuan dari reaksi glikosilasi dapat dikatakan sebagai proses detoksifikasi terhadap peningkatan konsentrasi senyawa organik asing baik dari hasil metabolisme normal tumbuhan atau dari lingkungan (Tabata *et al.*, 1976; Mizukami *et al.*, 1986) dan dapat mencegah penguapan dari senyawa yang mudah menguap dan meningkatkan kelarutan senyawa dalam air (Dombrowski & Alfermann, 1992)

Beberapa penelitian tentang biotransformasi telah dilakukan diantaranya adalah Syahrani *et al.* (1999) melakukan penelitian biotransformasi dengan reaksi glikosilasi dan glikosidasi dari PABA dengan kultur suspensi *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* yang menghasilkan β-D-glucose-1-p-aminobenzoat dan asam N-formil p-aminobenzoat.

2.3. Tinjauan Tentang Enzim

2.3.1. Tinjauan Enzim secara Umum

Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel, bekerja secara berurutan dan teratur serta mengkatalisis reaksi bertahap yang menyimpan dan mengubah energi kimiawi dan mengubah makro molekul sel dari prekusor sederhana (Lehninger & Albert , 1990).

Banyak enzim yang mengkatalisis proses pemindahan gugus dan reaksi lainnya memerlukan di samping substratnya juga molekul organik sekunder yang dikenal sebagai koenzim. Koenzim merupakan senyawa organik berbobot molekul rendah, stabil terhadap panas, dibutuhkan bagi aktivitas enzim dan berikatan dengan enzim lewat kekuatan kovalen dan non kovalen. Jenis enzim yang membutuhkan koenzim mencakup enzim yang mengkatalisis reaksi oksidoreduksi, reaksi pemindahan gugus serta isomerisasi dan reaksi yang membentuk ikatan kovalen (Murray *et al.*, 1999).

Sebagian besar substrat membentuk sedikitnya tiga ikatan dengan enzim. "Pelekatan pada tiga titik " ini membuat enzim bekerja sebagai katalisator secara stereospesifik. Kesanggupan enzim untuk mengkatalisis satu reaksi spesifik dan pada hakekatnya tidak mengkatalisis reaksi lain, mungkin menjadi sifat enzim yang paling bermakna. Namun demikian, kebanyakan enzim mengkatalisis jenis reaksi yang sama (pemindahan fosfat, reduksi-oksidasi, dll) dengan sejumlah kecil substrat yang secara struktural berhubungan. Reaksi dengan substrat alternatif ini cenderung terjadi jika substrat tersebut terdapat dengan konsentrasi yang tinggi. Reaksi mana di antara berbagai reaksi tersebut yang mungkin terjadi dalam organisme hidup tergantung pada konsentrasi relatif substrat alternatif di dalam sel dan afinitas relatif enzim terhadap substrat tersebut (Murray *et al.*, 1999).

Jumlah enzim yang kecil dalam sel akan mempersulit pengukuran kadar suatu enzim dalam cairan atau ekstrak jaringan. Tetapi aktivitas katalisis yang dimiliki enzim menghasilkan sarana pemeriksaan yang sensitif dan spesifik untuk pengukuran kadar enzim itu sendiri, yaitu dengan mengukur kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim dalam sampel. Hasil pengukuran kecepatan reaksi harus sebanding dengan jumlah enzim yang ada, karena jumlah molekul atau massa enzim yang ada sukar ditentukan. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan

dalam bentuk unit enzim dalam mikromol (μmol), nanomol (nmol) atau pikomol (pmol) dari substrat yang bereaksi atau produk yang dihasilkan per menit.

Satuan internasional untuk aktivitas enzim adalah katal (disingkat kat), didefinisikan sebagai jumlah aktivitas enzim yang mengubah substrat 1 mol per detik. Satuan aktivitas enzim yang banyak dipakai adalah jumlah yang menyebabkan biotransformasi 1,0 μmol substrat per menit pada 25°C pada kondisi optimal pengukuran; setara dengan 1/60 μkat atau 16,67 nkat. Aktivitas spesifik adalah nilai satuan enzim tiap satuan berat protein (dinyatakan sebagai katal/kg protein), yang merupakan suatu ukuran kemurnian enzim. Nilainya akan meningkat selama pemurnian enzim dan menjadi konstan bila enzim sudah murni (Lehninger, 1975).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya adalah konsentrasi enzim dan substrat, suhu, pH, adanya inhibitor, dan adanya kofaktor atau koenzim. Aktivitas enzim umumnya meningkat bersamaan dengan meningkatnya suhu; kebanyakan kecepatan reaksi enzimatik meningkat dua kali tiap kenaikan 10°C. Sampai pada rentang suhu tertentu enzim menjadi stabil dan aktivitasnya maksimum, tetapi di atas suhu optimum ini aktivitas enzim menjadi menurun tajam karena terjadi denaturasi (kebanyakan enzim terinaktivasi pada suhu ± 55-60°C). Selain itu juga, perubahan pH yang relatif kecil saja dapat mempengaruhi aktivitas enzim (Murray *et al.*, 1999).

2.3.2. Tinjauan Umum Tentang Isolasi dan Pemurnian Enzim

Metode-metode isolasi dan pemurnian enzim yang dapat dilakukan ekstraksi enzim, pemekatan massa enzim dengan cara pengendapan, prosedur pemurnian dengan metode kromatografi, dan prosedur pemurnian dengan elektroforetik (Englard & Seifter, 1990).

Ekstraksi enzim adalah pembebasan enzim dari sel atau organel sel. Hal pertama yang dilakukan dalam ekstraksi adalah melakukan pengrusakan dinding sel atau membran sel secara mekanik, fisik atau kimia. Destruksi mekanik dapat dilakukan dengan ultrasonik, pemotongan mekanik, tekanan, penggilingan. Sedangkan cara destruksi non mekanik dilakukan dengan desikator atau cara lisis.

Enzim dari sel yang telah didestruksi kemudian dilarutkan dalam suatu pelarut. Pada umumnya pelarut yang digunakan adalah suatu dapar, misalnya fosfat, sitrat, asetat, karbonat, bis-tris, dan sebagainya, tergantung kestabilan enzim terhadap dapar dan pH yang dibutuhkan. Pelarut ini mengandung bahan-bahan lain untuk meningkatkan kestabilan enzim, antara lain garam-garam, surfaktan, pengikat logam, *sulfhdryl agent*, ligan, dan inhibitor protease. Campuran disentrifugasi kurang lebih pada 100.000 *g* menit pada 0 - 4°C.

Pemekatan massa enzim dengan cara pengendapan, pada enzim untuk tujuan preparatif dapat diendapkan dengan membuat suatu gangguan terhadap pelarut berkaitan dengan pH, kekuatan ion, dan suhu. Teknik pengendapan ini menggunakan prinsip mengganggu atau menetralisir energi yang menstabilkan protein dalam larutannya. Teknik pengendapan dipakai sebagai langkah awal untuk pemekatan protein untuk menuju langkah berikutnya, yaitu kromatografi.

Cara-cara pengendapan enzim dapat dilakukan dengan fraksinasi dengan garam, penggunaan pelarut organik, dan denaturasi dengan panas dan pH ekstrim jika enzim tersebut stabil. Setelah enzim diendapkan, campuran disentrifugasi kurang lebih pada 100.000 *g*. menit pada 0 - 4°C. Endapan dilarutkan kembali ke sejumlah kecil larutan dapar yang sesuai (Teknik pengendapan ini dapat dilihat secara rinci pada subbab 2.3.3).

Metode yang dapat digunakan untuk prosedur pemurnian dengan metode kromatografi diantaranya adalah kromatografi pertukaran ion, filtrasi gel, kromatografi protein pada kolom hidroksiapatit, kromatografi hidrofobik, kromatografi pada pewarna reaktif terimmobilisasi, dan kromatografi afinitas.

Metode yang dapat dipilih untuk prosedur pemurnian dengan elektroforetik antara lain : elektroforesis gel satu dimensi dan elektroforesis gel poliakrilamid dua dimensional resolusi tinggi untuk analisis protein.

Walaupun demikian, semua metode ini relatif tidak selektif karena tidak dapat memisahkan satu protein dengan protein lain, kecuali bila metode tersebut dikombinasikan. Pemisahan protein lebih mudah dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi afinitas yang memakai ligan terimmobilisasi (biasanya substrat atau derivat koenzim yang secara kovalen melekat pada penyangga

seperti sephadex) yang mengadakan interaksi secara spesifik dengan enzim yang ingin dimurnikan (Murray *et al.*, 1999)

2.3.3. Tinjauan Tentang Teknik Pengendapan Enzim

Cara-cara pengendapan enzim dapat dilakukan dengan penggunaan pelarut organik, denaturasi dengan panas dan pH ekstrim jika enzim tersebut stabil, dan fraksinasi dengan garam (Englard & Seifter, 1990).

Penggunaan pelarut organik menyebabkan pengendapan protein dengan mengubah kelarutan protein dalam air. Pada umumnya pelarut organik seperti alkohol (etanol, metanol, butanol), aseton, dioksan dan sebagainya dapat dipakai untuk fraksinasi protein atau enzim. Pelarut organik yang digunakan semuanya dapat bercampur dengan air, tetapi menghasilkan panas yang bermakna pada larutan, juga mempunyai kecenderungan mendenaturasi protein, khususnya pada suhu di atas 0°C.

Denaturasi dengan panas dan pH ekstrim dapat digunakan untuk mengendapkan enzim jika enzim tersebut stabil. Suhu dan pH dapat juga digunakan untuk mengendapkan protein yang tidak diinginkan jika kondisi tersebut tidak merusak enzim yang diinginkan.

Cara pengendapan fraksional suatu larutan campuran protein dengan menggunakan garam hingga kini masih sering digunakan. Pengendapan terjadi dengan menetralkan muatan permukaan menggunakan garam, dengan menurunkan aktivitas kimia dari protein dan dengan mengurangi konsentrasi efektif dari air. Peristiwa ini disebut "*salting out*" dari protein.

Garam yang dapat digunakan untuk mengendapkan protein adalah NaCl, Na_2SO_4 dan $(NH_4)_2SO_4$. Yang banyak digunakan adalah $(NH_4)_2SO_4$ (amonium sulfat). Hal ini disebabkan karena kelarutannya dalam air tinggi dan kebanyakan protein atau enzim tahan terhadap pengaruh garam ini.

Teknik pengendapan dengan fraksinasi amonium sulfat memiliki beberapa keuntungan. Pada saat penjenuhan, amonium sulfat memiliki molaritas yang cukup tinggi yang dapat mengendapkan sebagian besar protein. Fraksinasi menggunakan amonium sulfat tidak mengeluarkan banyak panas pada larutan, jadi panas yang timbul segera hilang. Sekalipun larutan jenuhnya (4,04 M pada

20°C) mempunyai berat jenis 1,235 $g.cm^{-3}$, tidak mengganggu sedimentasi protein-protein yang terendapkan dengan sentrifugasi. Larutan jenuhnya mencegah atau membatasi pertumbuhan sebagian besar bakteri. Dalam larutan amonium sulfat, kebanyakan protein terlindungi terhadap denaturasi.

Penggunaan amonium sulfat ini mempunyai keterbatasan diantaranya untuk fraksinasi yang bagus ketika konsentrasi ditingkatkan untuk mendapatkan fraksi berikutnya, pemurnian yang dicapai biasanya hanya 2 sampai 5 kali daripada fraksi sebelumnya. Juga perlu diperhatikan, jika amonium sulfat digunakan untuk ekstrak jaringan, sampai 25% seringkali mendapatkan endapan yang mengandung partikel tertentu seperti ribosom, fragmen membran, protein besar, dan bahkan protein yang terdenaturasi.

Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak kasar yang mengandung 5-30 mg/ mL protein. Kadar protein yang tinggi akan mendukung stabilitas protein dengan meminimalkan denaturasi. Fraksinasi dilakukan dengan cara menambahkan amonium sulfat dengan pengadukan yang konstan pada suhu 0°C, dan jika perlu dilakukan penyesuaian pH dengan menggunakan NH_4OH 1N. Setelah seluruh garam ditambahkan, pengadukan dilanjutkan 15–30 menit untuk memberikan kesempatan kesetimbangan antara pelarut dan protein. Kemudian campuran disentrifugasi kurang lebih pada 100.000 *g*. menit pada 0-4°C. Endapan dilarutkan kembali dalam sejumlah kecil dapar yang sesuai (Englard & Seifter, 1990).

2.3.4. Tinjauan Terhadap Beberapa Penelitian Isolasi Glukosiltransferase

Li *et al.* ((1997) melakukan penelitian enzim 4-*hydroxybenzoate glucosyltransferase* yang dapat mengubah 4-hiroksibenzoat menjadi glikosidanya yaitu shikonin. Enzim tersebut diisolasi dari kultur sel *Lithospermum erythrorhizon* pada suhu 4-8°C. Kultur suspensi *Lithospermum erythrorhizon* yang telah dipindahkan ke media baru (25-35 jam) disaring, dicampur 0,1 M dapar K-Pi pH 6,5 yang mengandung 20 mM DTT, 40 μM PMSF, dan PVPP 10%, kemudian dihaluskan pada mortir, dilanjutkan dengan *Branson sonifier*, kemudian disentrifugasi 17.000 *g*, 20 menit. Ekstrak enzim diambil dan ditambahkan larutan protamin sulfat 2% dalam 0,5 M dapar K-Pi pH 6,5 (1 mL larutan/200 mg protein), diaduk 10 menit kemudian disentrifugasi 17.000 *g*, 20 menit. Supernatan

diambil dan ditambahkan padatan amonium sulfat sambil terus diaduk, pH larutan ekstrak dipertahankan 6,5 dengan menambahkan 5 M NH_3 selama proses pengendapan. Endapan pada fraksi 33-55% dikumpulkan dengan sentrifugasi 17.000 *g*, 20 menit. Pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom dengan *DEAE Sephacel*, *Superdex* 200, hidroksiapatit, *HiTrap blue*, Mono P dan Mono Q. Diperoleh enzim berupa monomer 51 kDa dengan SDS-PAGE dan aktivitas spesifik meningkat 27.300 kali daripada ekstrak kasar. Uji aktivitas enzim dengan mencampurkan 4-hidroksibenzoat, UDP-glukosa, BSA, dan fraksi enzim; pH 7,6; diinkubasi 37°C 60 menit; reaksi dihentikan dengan larutan TCA. Produk diukur secara kuantitatif dengan HPLC, sebagai standar ditambahkan asam hidroksibenzoat. Untuk menguji enzim secara cepat digunakan UDP-glukosa radioaktif.

Hasegawa *et al.* (1997) melakukan isolasi dan pemurnian enzim Limonoid glukosiltransferase dari jaringan albedo jeruk navel. Jaringan albedo dihomogenkan dengan buffer Tris HCl pH 8, DTT, 2-merkaptoetanol, larutan PMSF dalam DMSO, KCl dan PVP, dengan kecepatan rendah-sedang 4 menit. Lalu disentrifugasi 8.000 *g*, 20 menit. Supernatan diambil dan ditambahkan amonium sulfat sampai 40%, diaduk 1 jam pada suhu 0°C, endapan yang diperoleh dipisahkan dengan sentrifugasi pada 20.000 *g*, 30 menit. Sedang supernatannya dijenuhkan lagi sampai 80% dengan amonium sulfat, diaduk 1 jam suhu 0°C dan endapan diambil dengan cara yang sama. Endapan yang diperoleh dilarutkan kembali dan dihilangkan garamnya dengan kolom filtrasi gel PD-10. Pemurnian selanjutnya menggunakan kromatografi afinitas UDP-asam glukoronat dan HPLC pertukaran ion DEAE pada pH 7,0 dan 8,0. Didapatkan hasil peningkatan pemurnian enzim 452 kali lipat. Dengan SDS-PAGE diketahui berat molekul enzim 56-58 kDa. Enzim menunjukkan aktivitas optimum pada pH 8,0; dan ion Mg^{2+} dapat menstimulasi aktivitas enzim 66% lebih besar daripada aktivitas yang diteliti EDTA. Pengujian aktivitas enzim dilakukan dengan mencampurkan fraksi enzim dengan UDP-glukosa, Mn^{2+} dan ^{14}C-nomilin (substrat) pada pH 7,0 –8,0. Diinkubasi pada 34°C selama 15 atau 30 menit, reaksi dihentikan dengan HCl 1 M. Glukosida nomilin diidentifikasi dengan KLT dan diukur radioaktivitasnya.

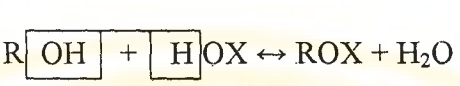
MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Mizukami *et al.* (1985) telah berhasil meneliti pemurnian enzim *Salicyl alcohol glucosyltransferase* dari kultur sel *Gardenia jasminoides* yang dapat membentuk salisin dari salisil alkohol dan UDP-glukosa. Tahap pemurnian dilakukan pada 4°C dan dapar yang digunakan mengandung 10 mM 2-merkaptoetanol. Sel basah dihomogenkan dengan PVPP dalam 50 mM Tris HCl pH 7,5 dengan kecepatan 18.000 rpm selama 3 menit. Campuran disaring dengan kain katun tipis lalu disentrifugasi 10.000 *g*, 20 menit; diperoleh supernatan sebagai ekstrak kasar. Kemudian dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak kasar dengan amonium sulfat dengan penambahan padatan amonium sulfat sampai 80%. Endapan dikumpulkan dengan sentrifugasi 10.000 *g*, 15 menit, lalu dilarutkan dalam 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dan didialisis selama 3 jam dengan penggantian 2 L dapar yang sama tiga kali. Tahap pemurnian selanjutnya dilakukan dengan kromatografi DEAE-selulosa dan dua kali filtrasi gel pada Sephadex G-100. Pengujian aktivitas glukosiltransferase dilakukan dalam sistem berisi 3,3 mM UDP-[U-^{14}C]glukosa (0,05 μCi), 3,3 mM salisil alkohol, 10 mM 2-merkaptoetanol, 50 mM dapar Tris-HCl pH 7,5; dan enzim dengan volume akhir 0,3 mL. Reaksi dilakukan selama 60 menit pada suhu 37°C dan dihentikan dengan penambahan 0,2 mL etanol berisi 10 μmol salisin. Campuran disentrifugasi 3500 *g*, 5 menit dan aliquot dari supernatan dianalisis dengan KLT. Noda salisin dideteksi dengan menggunakan sinar UV, lalu dikerok dan diukur radioaktivitasnya. Aktivitas enzim setelah pemurnian meningkat 110 kali dibanding ekstrak kasar.

2.4. Tinjauan Tentang Glikosida

Glikosida merupakan hasil interaksi antara gugus nukleotida dan glikosida, misalnya Uridin difosfat glukosa (UDP-glukosa) dengan gugus alkoholik atau gugus fenolik dari senyawa lain. Jenis glikosida ini paling banyak di alam dan biasa disebut O-glikosida. Glikosida selain berikatan dengan gugus O, juga dapat berikatan dengan karbon (C-glikosida) dan sulfur (S-glikosida) dan N (N-glikosida).

Reaksi secara umum pembentukan dan hidrolisis O-glikosida :



$$R\boxed{OH} + \boxed{H}OX \leftrightarrow ROX + H_2O$$

Gula-gula yang ditemukan dalam glikosida dapat berupa monosakarida seperti glikosa, ramnosa, dan fruktosa, atau yang lebih jarang yaitu gula-deoksi. Lebih dari satu molekul gula dapat diikat aglikon dalam ikatan yang berbeda (jarang), atau lebih umum sebagai di-, tri-, atau tetrasakarida. Gula dapat berada dalam bentuk isomer α- dan β-, keduanya mungkin secara teoritis. Ikatan tipe β sekaligus α dapat ditemukan dalam karbohidrat atau glikosida yang sama (Trease & Evans, 1978).

Reaksi glikosidasi merupakan reaksi yang paling sering dijumpai pada pemberian senyawa eksogen pada reaksi biotransformasi oleh kultur sel tanaman. Glikosilasi pada kultur sel tanaman merupakan suatu hal yang menarik karena reaksi ini lebih sering terjadi pada kultur sel tanaman dibandingkan pada mikroorganisme, sehingga dapat digunakan sebagai suatu alternatif pelaksanaan modifikasi kimia. Glikosilasi dengan pemberian senyawa eksogen pada kultur sel tanaman dapat sebagai proses detoksifikasi terhadap peningkatan konsentrasi senyawa organik asing baik dari hasil metabolisme normal tumbuhan atau dari lingkungan (Tabata *et al.*, 1976; Mizukami *et al*, 1986). Pada tumbuhan, tujuan dari reaksi ini adalah untuk mencegah penguapan komponen minyak atsiri dan memperbesar kelarutan senyawa (Dombrowski & alfermann, 1992).

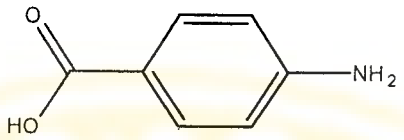
Faktor-faktor yang mempengaruhi glikosilasi pada kultur sel tanaman adalah tingkat pertumbuhan kultur sel, macam dan jumlah hormon pertumbuhan yang diberikan (Mizukami *et al.*, 1986).

2.5. Tinjauan Tentang Asam *para*-Aminobenzoat (*para*-Aminobenzoic Acid = PABA)

Nama kimia : 4-aminobenzoic acid

Nama lain : Vitamin B_x, vitamin H^{1-} bakteri, PABA

Rumus struktur :



para-aminobenzoic Acid

Gambar 2.1. Struktur Asam *para*-Aminobenzoat

Rumus molekul : $C_7H_7NO_2$

Berat molekul : 137,14

Pemerian : Putih atau sedikit kuning, tidak berbau atau hampir tidak berbau, kristal atau serbuk kristal. Dapat berubah menjadi agak gelap pada pemaparan terhadap udara dan cahaya

Sifat fisika kimia : Titik lebur = 187,0-187,5°C; pKa = 4,65; 4,80; pH (larutan 0,5%) = 3,5; serapan UV maksimum dalam air = 266 nm ($E^{1\%}_{1\ cm}$ = 1070), serapan maksimum dalam isopropanol = 288 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 137)

Kelarutan : 1 gram larut dalam 170 mL air pada 25°C, dalam 90 mL air mendidih, dalam 8 mL alkohol, dalam 50 mL eter. Larut dalam etil asetat, asam asetat glasial; sedikit larut dalam benzena; praktis tidak larut dalam petroleum eter. Larut dalam larutan alkali hidroksida dan karbonat.

Inkompatibilitas : dengan garam ferri dan karbonat

Farmakologi : LD_{50} pada mencit dan tikus (g/kg) = 2,85; per oral = >6. LD_{50} pada kelinci (g/kg) : intravena = 2,0; per oral = 1,83. Fungsi terapi : secara topikal sebagai pelindung kulit terhadap cahaya matahari (konsentrasi 5%) karena menyerap cahaya UV B; tetapi juga bisa mengabsorpsi sedikit atau tidak sama sekali cahaya UV A; dahulu sebagai antiriketsia. PABA kadang-kadang digolongkan dalam vitamin B, tetapi tidak dinyatakan adanya defisiensi PABA baik pada manusia maupun hewan. Efek samping : alergi dermatitis pada pemakaian topikal, pada pemakaian per oral pernah terjadi reaksi kulit (vitiligo). Farmakokinetik : pada pemberian secara oral diabsorpsi melalui saluran cerna, dimetabolisme di hati dan diekskresi melalui urin dalam bentuk utuh dan metabolitnya.

Bentuk lain : sebagai garam kalium dan sebagai esternya.

Peringatan dan perhatian : amino benzoat sebagai *sunscreen* tidak boleh diberikan pada penderita yang sensitif terhadap cahaya atau hipersensitif terhadap obat-obat seperti sulfonamide, thiazide, diuretik, termasuk lokal anesthesia, particularly benzocaine.

(Budavari & O'Neil, 1996; Reynold, 1996)

2.6. Tinjauan Tentang *Solanum laciniatum*

Klasifikasi tanaman (Tjitrosoepomo, 1988)

- Divisi : Spermatophyta
- Anak divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledoneae
- Anak kelas : Sympetalae
- Bangsa : Tubiflorae (Solanales, Personatae)
- Suku : Solanaceae
- Marga : Solanum
- Jenis : *Solanum laciniatum* Ait.

Deskripsi tanaman :

Tinggi tanaman adalah 1-3 m, dengan batang berwarna merah, daun berwarna merah hijau, dan bunga berwarna biru gelap atau ungu dengan diameter berukuran 5 cm. Pollen berdiameter ± 32 – 42 mm, sedangkan buahnya berukuran 25 x 30 mm dan berwarna kuning pucat (Donaldson, 1983; Macek, 1989).

2.7. Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

2.7.1. Tinjauan Umum KLT

KLT merupakan metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam di bawah gerakan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campuran.

Sebagai fase diam adalah bahan padat yang diletakkan pada pelat kaca, atau juga bisa plastik atau logam, secara uniform dengan ketebalan kurang lebih 0,250 mm. Pada umumnya sebagai fase diam banyak dipakai adalah silika gel yang dicampur dengan $CaSO_4$ untuk menambah daya lekat partikel silika gel pada

pendukung (pelat). Adsorben lain yang banyak digunakan adalah alumina, kieselguhr, celite, serbuk sellulosa, serbuk poliamida, kanji dan sephadex.

Sebagai fase gerak dipakai cairan atau campuran cairan yang dikenal sebagai pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur. Pemilihan fase gerak ini sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan. Elusi pada KLT pada umumnya dilakukan dengan cara menaik (*ascending*) satu atau dua dimensi.

Mekanisme pemisahan pada KLT juga dikenal bermacam-macam diantaranya adsorpsi, partrisi, pertukaran ion atau fase terbalik (adsorpsi-partisi). Untuk pemisahan komponen sampel non polar atau hidrofobik (tidak larut dalam air) pada proses pemisahan adsorpsi diusahakan pelarut pengembangan atau pelarut pengembang campur Yang bersifat non polar. Sebaliknya pada proses pemisahan partisi sampel yang polar atau hidrofilik (larut dalam air) dipakai pelarut pengembangan campur yang bersifat polar.

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah visualisasi dengan cara fisika atau kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan melihat noda kromatogram yang mengabsorbsi radiasi ultraviolet atau berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet pada λ = 254 nm atau λ = 365 nm. Visualisasi dengan cara kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik, dilakukan dengan cara penyemprotan dengan atomizer atau memberikan uap zat kimia pada kromatogram atau dengan cara pencelupan ke dalam pereaksi penampak warna (Mulya & Suharman, 1995).

2.7.2. KLT-Densitometer

Densitometer adalah metode analisis instrumental yang berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan noda pada KLT. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada KLT yang ditentukan adalah absorpsi, transmisi, pantulan (refleksi) pendar fluor atau pemadaman pendar fluor dari radiasi semula. Densitometer lebih dititik beratkan untuk analisis kuantitatif analit-analit dengan kadar yang sangat kecil yang perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT (Mulya & Suharman, 1995).

2.8. Tinjauan Tentang Metode Analisis PABA dan PABA-glukosida dengan Densitometri

Panjaitan *et al.* (2000) telah berhasil mengembangkan cara yang cepat dan mudah dalam pengujian asam *p*-aminobenzoat dan β-D-glukosa-1-*p*-aminobenzoat dalam kultur suspensi sel tanaman dengan densitometri. Metode yang diteliti terbukti selektif, presis, dan akurat sehingga dapat digunakan untuk analisis secara rutin.

Pada analisis sampel, medium dianalisis dengan mengencerkan 0,5 mL medium dengan metanol 0,5 mL, kemudian ditotolkan sebanyak 2 μL pada pelat KLT. Untuk sel kultur dianalisis dengan cara : 150 mg sel kultur yang telah dikeringkan ditambah 5 mL metanol, diultrasonik selama 15 menit, dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit, disaring. Ekstraksi diulang empat kali, lalu ekstrak dikumpulkan, ditambah metanol sampai 25,0 mL. Ekstrak sebanyak 2 μL ditotolkan pada pelat KLT. Stok larutan standar disiapkan dengan melarutkan PABA dan PABA-glukosida (5 mg) dalam metanol sampai 10 mL. Standar yang berbeda disiapkan dari larutan stok dengan mencampur dan mengencerkan dengan metanol. Larutan mengandung 62,50; 125,00; 250,00; 500; 750 dan 1000 μg/mL PABA dan PABA-glukosida. Masing-masing larutan ditotolkan 2 μL pada pelat KLT.

Sampel medium dan ekstrak sel dalam metanol serta larutan standar yang telah ditotolkan pada pelat KLT silika gel 60 F_{254} dielusi dengan campuran eluen etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10 (v/v). Dengan metode ini PABA (R_F = 0.67) dan PABA-glukosida (R_F = 0,35) dapat terpisah.

Kemurnian dan identifikasi noda analit ditentukan dengan menggunakan densitometri dengan mengukur absorban-reflektan noda pada 200 – 370 nm, dibandingkan terhadap standar. Pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbansi-reflektan noda pada panjang gelombang 272 nm. Kondisi pengukuran dengan densitometer Shimadzu CS-930 panjang gelombang adalah : lebar celah 2, tinggi celah 4, *linear scanning*, sensitivitas deteksi sedang/medium. Demikian ini, batas deteksi PABA adalah 0,05 μg $noda^{-1}$ dan PABA-glukosida adalah 0,04 μg $noda^{-1}$.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB III

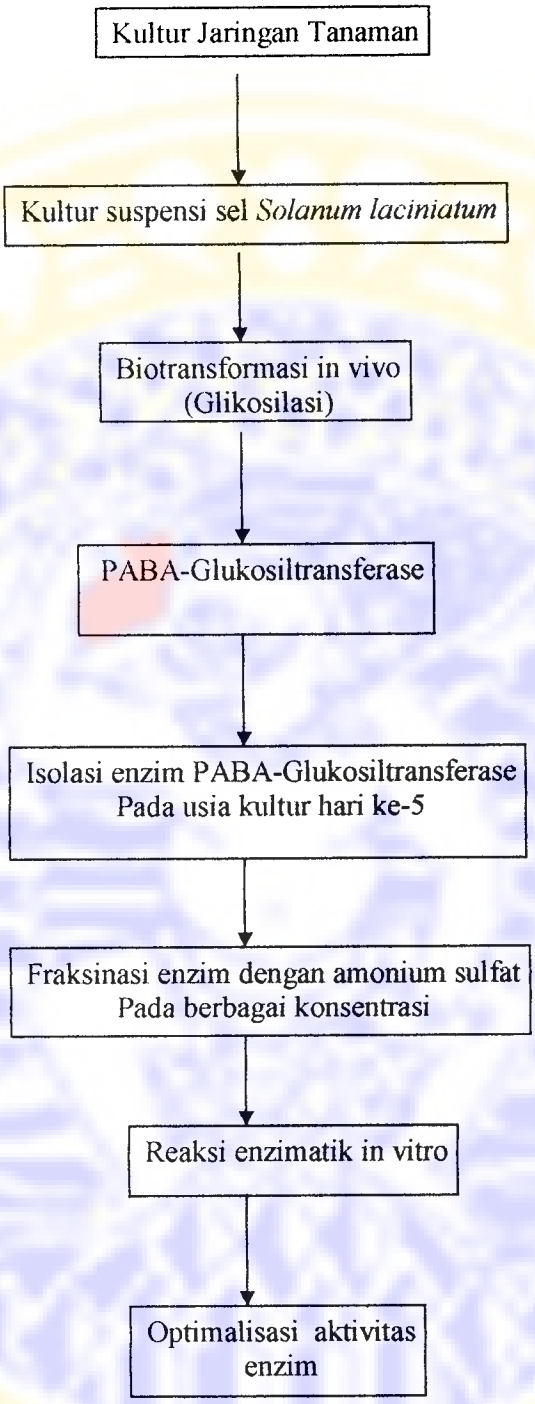
KERANGKA KONSEPTUAL

Kultur jaringan/sel tanaman dapat dipakai untuk studi reaksi-reaksi biosintesis (Best, 1985; Indrayanto, 1990), diantaranya biotransformasi yang menggunakan enzim-enzim yang ada dalam sel tanaman untuk mengubah gugus fungsional kimia dari senyawa yang ditambahkan dari luar (Morris *et al.*, 1985).

Reaksi biotransformasi dengan kultur jaringan tanaman yang telah diteliti antara lain reaksi biotransformasi glukosilasi asam para amino benzoat (PABA) oleh kultur suspensi sel *Solanum mammosum* dan *Solanum laciniatum* menjadi β-D-glucose-1-*p-aminobenzoate* (juga disebut *p-aminobenzoic acid 7-O-β-D-glucopyranosyl ester*) (Syahrani *et al.*, 1999; Panjaitan *et al.*, 2000), dikatalisis oleh enzim PABA-glukosiltransferase.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi enzim yang berperan dalam reaksi biotransformasi tersebut dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum*. Enzim PABA-glukosiltransferase hasil isolasi kemudian ditentukan aktivitasnya dalam pembentukan produk dengan melakukan reaksi enzimatik secara in vitro dengan menggunakan substrat PABA dan UDP-glukosa.

Salah satu tahapan isolasi enzim yang sering dilakukan adalah fraksinasi ekstrak kasar enzim dengan amonium sulfat agar enzim yang terdapat dalam ekstrak kasar terpekatkan (Englard & Seifter, 1990). Pada penelitian ini dilakukan optimasi konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim untuk mengetahui pada konsentrasi amonium sulfat ke berapa enzim PABA– glukosiltransferase yang diproduksi dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* memiliki aktivitas enzim yang optimum.



Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB IV

METODE PENELITIAN

BAB IV

METODE PENELITIAN

4. 1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain :

Alat-alat gelas dan logam, neraca analitik *Sartorius* L 4205, *pH meter Fisher Accument* model 230 A, *25 L American Portable Autoclave* WAV Co. Inc., *Laminar Air Flow Cabinet Bassaire* (LAFC), *model S-4* nomor serial S 4645, *Rotary Shaker* (±70 rpm) dengan disinari 2 buah lampu TL 40 Watt (±1000 lux), Centrifuge Hettich Universal 2S , *Incubation Shaker Gerhardt*, *Humac* SCR 20 HITACHI *Refrigetrated Centrifuge*, Magnetic stirrer & hot plate Thermolyne Cimarec 2, Mikropipet Socorex dan kapiler 2 µL, *Vortex Thermolyne*, Type 16700 mixer, *TLC Scanner Shimadzu* model CS 930, Lampu UV 254 nm, dan *Hair dryer*.

4. 2. Bahan

4. 2. 1. Kultur *Solanum laciniatum*

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* (SL_4) berasal dari Grup Riset Bioteknologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4. 2. 2. Bahan-bahan untuk Pembuatan Media Kultur

Media dasar Murashige Skoog (MS) yang dimodifikasi dengan penambahan hormon kinetin (2 ppm) dan 2,4-D (0,5 ppm) dimana bahan-bahannya berasal dari E. Merck dan Sigma dengan derajat kemurnian pro analisis, air suling sebagai pelarut media adalah air suling teknis, HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N untuk penyesuaian pH berasal dari HCl pekat buatan Riedel de Haën dan NaOH padat buatan E. Merck dengan derajat pro analisis, pH indikator universal, dan alumunium foil.

4. 2. 3. Bahan untuk Kultivasi Kultur Suspensi *Solanum laciniatum*

Untuk sterilisasi alat digunakan alkohol 70%.

4. 2. 4. Bahan untuk Ekstraksi, Fraksinasi, dan Uji Aktivitas Enzim

Berikut ini adalah bahan untuk ekstraksi, fraksinasi, dan uji aktivitas enzim, bila tidak disebut lain berarti bahan tersebut mempunyai derajat kemurnian pro analisis :

Polyvinyl polypirolidone (PVPP) buatan Sigma, UDP-glukosa buatan Sigma, *Para*-amino benzoic acid (PABA) buatan Sigma, bahan untuk larutan dapar : Tris Base buatan Sigma dan HCl buatan Riedel de Haën, standar β–D–glukosa–1–p–amino benzoat (PABA-glukosida) hasil biotransformasi, diisolasi dari sel *Solanum laciniatum* dan telah dielusidasi strukturnya, metanol buatan Riedel de Haën, etil asetat buatan Riedel de Haën, amonium sulfat buatan Wako Pure Chemical Industries Ltd., dan pelat alumunium kromatografi lapis tipis Silika Gel 60 F_{254} *Precoated*, 0,2 mm (Merck).

4. 3. Metode Penelitian

4. 3. 1. Pembuatan Media Kultur Sel *Solanum laciniatum*

Media kultur yang digunakan adalah Media Murashige – Skoog (Wetter & Constable, 1982) yang dimodifikasi dengan penambahan hormon pertumbuhan kinetin (2 ppm) dan 2,4-D (0,5 ppm).

Cara pembuatan 1 L media kultur *Solanum laciniatum* :

Diambil 10 mL dari tiap-tiap larutan stok media MS sesuai dengan komposisi media MS dan dimasukkan ke dalam Beaker glass 1 liter. Ditambahkan 20 mL larutan hormon kinetin (kadar larutan stok 1 mg/10 mL) dan 10 mL larutan 2,4-D (kadar larutan stok 0,5 mg/10 mL) sehingga diperoleh kadar kinetin pada media sebesar 2 ppm dan 2,4-D sebesar 0,5 ppm. Ditambahkan mio-inositol sebanyak 100 mg dan sukrosa 30 g dalam bentuk padat dan diaduk ad larut. Ditambahkan air suling sampai volumenya mendekati 1 liter (± 950 mL). Dilakukan kontrol terhadap pH media, mula-mula dengan pH indikator universal, dan kemudian dengan pH meter. Media diatur pada pH 5,6-5,7 dengan penambahan HCl 0,1 N atau NaOH 0,1 N sampai tercapai pH yang diinginkan. Media ditambahkan dengan air suling sampai volume mencapai 1 liter, diaduk

homogen, kemudian disaring. Media lalu dibagi ke dalam 20 buah erlenmeyer dengan volume masing-masing 50 mL. Media disterilisasi dengan cara pemanasan basah menggunakan autoklaf dengan suhu sterilisasi 121°C selama 20 menit.

4. 3. 2. Kultivasi Kultur *Solanum laciniatum*

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* (SL_4) dibuat dengan melakukan pemindahan ± 5 g sel dari media padat ke dalam media cair. Kultur ditempatkan pada ruang kultur dan diagitasi pada shaker ± 70 rpm. Subkultur dilakukan setiap 7 hari sekali.

Kultivasi kultur suspensi dilakukan di dalam LAFC dengan cara :

LAFC dibersihkan dengan alkohol 70%. Peralatan dan media steril yang akan digunakan disemprot dengan alkohol 70% lalu dimasukkan dalam LAFC, kemudian aliran udara dan lampu UV dinyalakan selama ± 20 menit. Lampu UV dimatikan, dinyalakan lampu TL. Bagian luar wadah kultur yang akan dikultivasi (erlenmeyer) disemprot dengan alkohol 70%, kemudian dimasukkan ke dalam LAFC. Tutup wadah disterilkan dengan dipanasi pada pembakar spiritus lalu dibuka dengan pinset, kemudian ± 5 g kultur dipindah ke media baru dengan sendok atau skapel yang telah dipanasi dengan pembakar spiritus. Wadah disterilkan kembali dengan dipanasi dan ditutup dengan alumunium foil yang telah disterilkan dengan pembakar spiritus. Kultur yang telah dikultivasi diagitasi kembali pada shaker.

4. 3. 3. Metode Isolasi Enzim dengan Fraksinasi Amonium Sulfat

Pada metode isolasi enzim ini, pengerjaan ekstraksi, dan fraksinasi dijaga suhunya tetap pada 0 – 4°C dengan bantuan *dry ice*.

4. 3. 3. 1. Ekstraksi enzim

Ekstraksi dilakukan dengan tahapan sebagai berikut (Mizukami *et al.* (1985) yang dimodifikasi) :

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* yang dipanen pada hari ke-5 disaring dengan corong Buchner, lalu timbang beratnya sebagai berat

basah sel sebanyak 50 g. Sel-sel kultur kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan stamper yang telah dibekukan terlebih dahulu dengan *dry ice* dan ditunggu sampai sel-sel kultur ikut membeku lalu digerus sampai dihasilkan serbuk kultur yang halus. Segera dicampurkan PVPP sebanyak 10% dari berat basah sel. Ditambahkan dapar Tris HCl 0,5 M pH 6 (optimasi Putra, 2000) sebanyak 1,5 kali berat basah sel, diaduk sampai homogen. Campuran disentrifugasi dingin (4°C) 10.000 *g* selama 30 menit. Supernatan, yang merupakan ekstrak kasar enzim, diambil.

4. 3. 3. 2. Fraksinasi Ekstrak Enzim Gubal (*Crude Enzyme*)

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat dan cara yang digunakan sebagai berikut (Englard & Seifter, 1990) :

Pada ekstrak kasar enzim ditambahkan sejumlah tertentu amonium sulfat ($(NH_4)_2 SO_4$) menurut fraksi penjenuhan yang ingin dicapai dengan variasi perlakuan pada fraksi 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70% dan 70-80%. Penambahan amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Setelah semua amonium sulfat ditambahkan, pengadukan tetap dilanjutkan selama 10 menit. Disentrifugasi ± 10.000 *g* selama 30 menit. Supernatan diambil sedangkan endapan dilarutkan kembali dengan 1,5 mL dapar Tris HCl 0,5 M pH 5 (Putra, 2000). Fraksi enzim ini disimpan di dalam tabung eppendorf lalu disimpan dalam lemari es sebelum diuji aktivitasnya. Supernatan yang diambil pada tahap 2 dilakukan fraksinasi lebih lanjut dengan tahapan yang sama dengan tahap 1 dan 2 untuk mendapatkan fraksi penjenuhan yang lebih tinggi. Setelah semua fraksi enzim yang diinginkan diperoleh, supernatan dibuang.

4. 3. 4. Pengujian Aktivitas Enzim Hasil Fraksinasi

Enzim hasil fraksinasi dengan amonium sulfat diuji aktivitasnya dengan langkah-langkah sebagai berikut (Mizukami *et al.* (1985) yang dimodifikasi) :

PABA 7,3 mM 60 µL, UDP-glukosa 7,3 mM 60 µL, dan 200 µL Buffer tris HCl 0,5 M pH 5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan ke dalamnya fraksi enzim sebanyak 180 µL, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang (± 29°C) selama 2 jam (Purnawati, 2000). Reaksi dihentikan dengan pemberian aseton 360 µL, dihomogenkan dengan vortex, lalu disentrifugasi 3500 rpm 5 menit. Diambil larutannya. Ditotolkan 6 µL pada lempeng KLT. Sebagai standar ditotolkan larutan PABA-glukosida dalam dapar Tris HCl 0,5 M pH 5 sebanyak 6 µL pada lempeng yang sama. Sebagai blangko : PABA 7,3 mM 60 µL dan UDP-glukosa 7,3 mM 60 µL yang ditambahkan 180 µL dapar Tris HCl 0,5 M pH 5 dengan perlakuan sama seperti langkah 1 dan 2. Dielusi dengan eluen Etil Asetat : Metanol : Air = 77 : 13 : 10. Hasil elusi dilihat di bawah lampu UV 254 nm.

Nilai R_f dan spektra noda produk hasil uji aktivitas dibandingkan dengan standar PABA-glukosida. Untuk uji optimasi dengan analisis semikuantitatif, dihitung aktivitas enzim berdasarkan luas area noda dan berat basah sel.

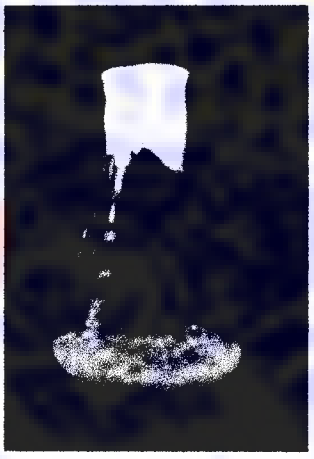
4. 3. 5. Variasi Perlakuan

Optimasi konsentrasi amonium sulfat, yaitu untuk mengetahui pada konsentrasi amonium sulfat berapa enzim PABA-glukosiltransferase yang diisolasi dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* memiliki aktivitas yang optimum. Pada percobaan ini ekstrak enzim kasar difraksinasi dengan amonium sulfat pada fraksi enzim 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70% dan 70-80%. Terhadap masing-masing fraksi enzim dilakukan uji aktivitas enzim dengan mengukur luas area noda hasil KLT. Fraksi enzim yang menghasilkan aktivitas enzim terbesar dalam pembentukan produk dilihat dari luas area produk merupakan fraksi enzim yang memiliki konsentrasi amonium sulfat yang optimum. Percobaan ini direplikasi dua kali.

BAB V

HASIL PENELITIAN

Pada percobaan ini isolasi enzim dilakukan pada kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* usia kultur hari ke-5. *Crude enzyme* yang didapatkan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat.



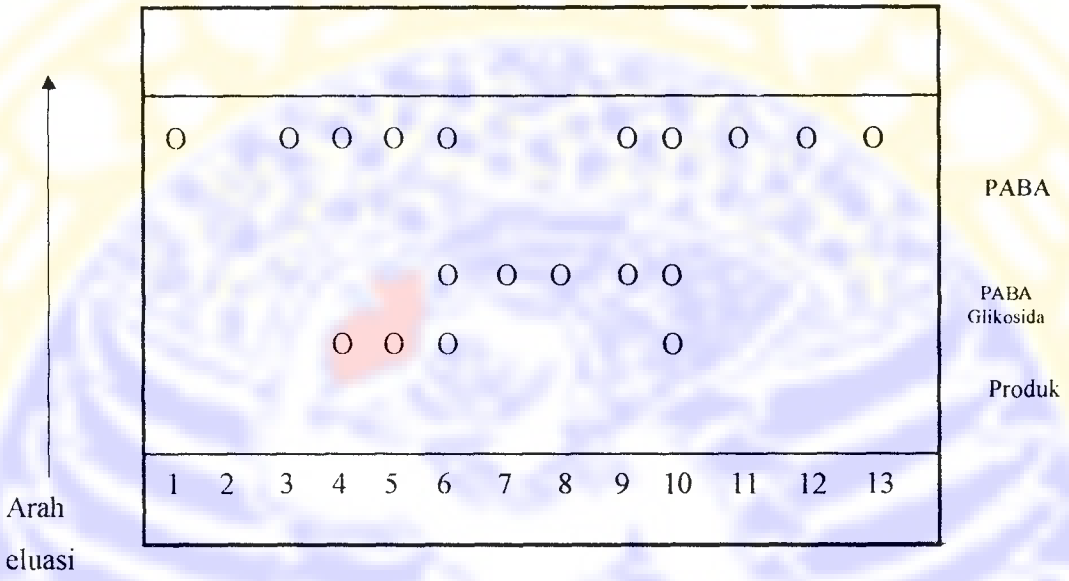
Gambar 5.1. Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum* (SL_4)

5.1. Pengujian Awal

Fraksi enzim 20% diinkubasi bersama substrat PABA dan UDP-glukosa selama 2 jam pada suhu kamar (29°C) kemudian dihentikan dengan menambahkan aseton, kemudian hasil inkubasi dianalisis dengan KLT. Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam silika gel 60 F_{254}, fasa gerak campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10 (v/v). Penampak noda menggunakan sinar UV. Analisis densitometer dilakukan pada panjang gelombang 254 nm. Sebagai kontrol dilakukan berbagai perlakuan pada saat inkubasi, yaitu dengan menggantikan fraksi enzim dengan ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*), menambahkan PABA glikosida, menambahkan amonium sulfat, meniadakan UDP-glukosa dan meng-inaktifkan enzim terlebih dahulu. Sebagai standar digunakan PABA glikosida hasil biotransformasi.

Dalam penelitian ini jumlah ekstrak kasar enzim (*crude enzyme*) dan fraksi enzim yang ditambahkan sebanyak 180 μL, jumlah substrat PABA dengan

konsentrasi 7,3 mM sebanyak 60 µL, jumlah substrat UDP-glukosa dengan konsentrasi 7,3 mM sebanyak 60 µL, jumlah larutan buffer tris HCl pH 5 dengan konsentrasi 0,5 M sebanyak 200 µL, dan jumlah aseton sebanyak 360 µL. Apabila ada salah satu komponen tersebut yang dihilangkan, diganti dengan larutan dapar tris HCl pH 5 dengan volume yang sama.



Gambar 5.2. Hasil Analisis KLT dari Uji Aktivitas Fraksi enzim Pada Pengujian Awal

Keterangan tiap lajur eluasi :

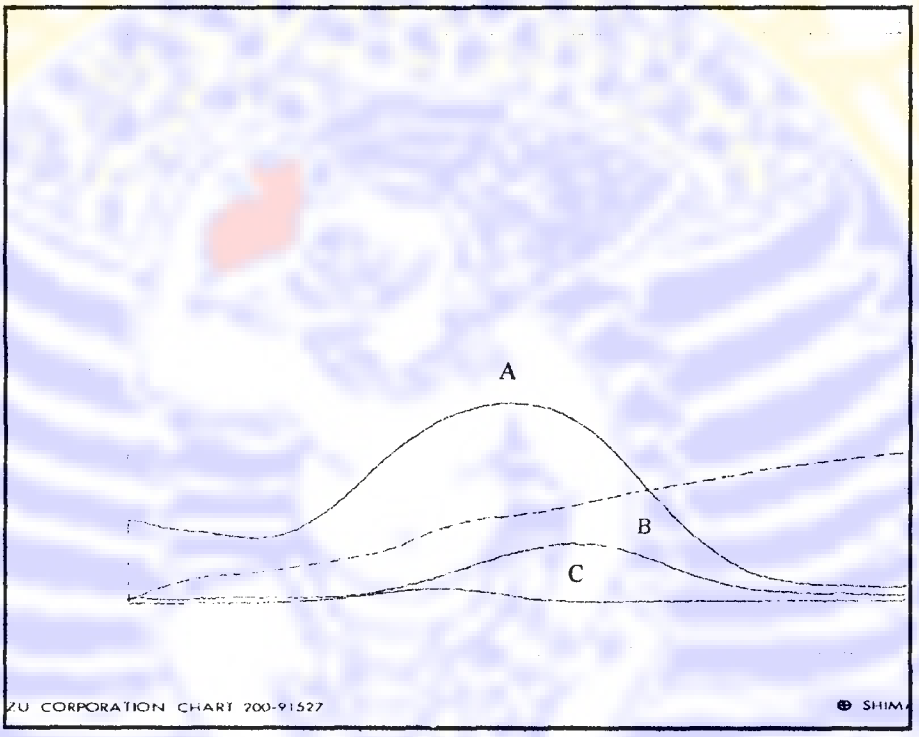
1. PABA 7,3 mM
2. UDP 7,3 mM
3. Blanko
4. Hasil inkubasi PABA + UDP-glukosa + Buffer Tris HCl pH 5 + ekstrak kasar enzim
5. Hasil inkubasi PABA + UDP-glukosa + Buffer Tris HCl pH 5 + fraksi enzim 20%
6. Hasil inkubasi PABA+UDP-glukosa + PABA glikosida + Buffer Tris HCl pH 5 + fraksi enzim 20%
7. Hasil inkubasi PABA glikosida + Buffer Tris HCl pH 5 + fraksi enzim 20%
8. Standart PABA glikosida hasil biotransformasi
9. Hasil inkubasi PABA + UDP-glukosa + Buffer Tris HCl pH 5 + PABA glikosida + amonium sulfat
10. Hasil inkubasi PABA + UDP-glukosa + Buffer Tris HCl pH 5 + PABA glikosida + amonium sulfat + fraksi enzim 20%

11. Fraksi enzim 20% yang telah diinaktifkan dengan ditambahkan aseton + PABA + UDP-glukosa + Buffer Tris HCl pH 5
12. Hasil inkubasi PABA + Buffer Tris HCl pH 5 + fraksi enzim 20%
13. PABA + UDP-glukosa

Faktor retensi noda : R_f Produk = 0,47

R_f PABA glikosida = 0,52

R_f PABA = 0,87



Gambar 5.3. Spektra absorban-reflektan noda diukur dengan densitometer pada panjang gelombang 200-370 nm

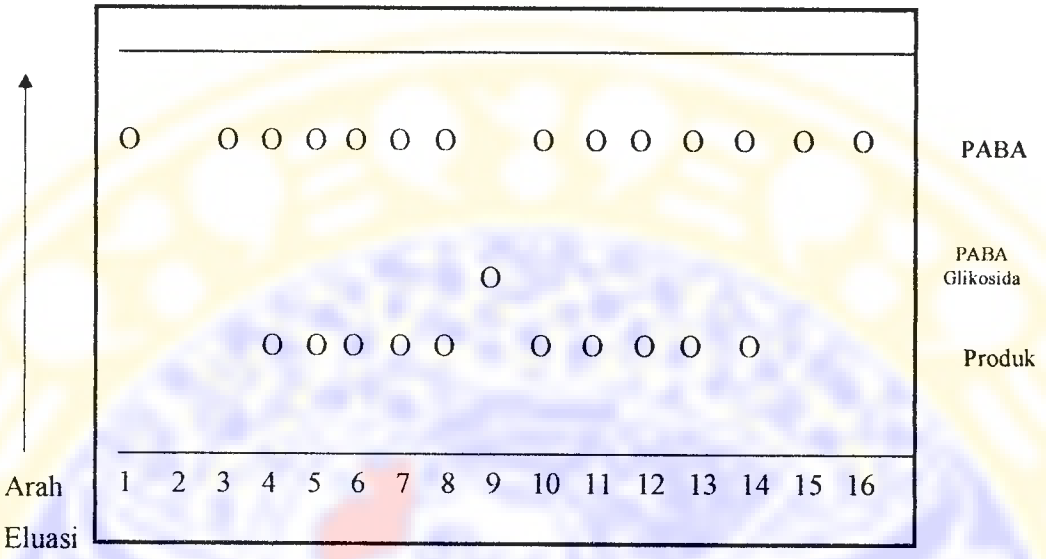
Keterangan :
A. spektra noda PABA
B. spektra noda PABA glikosida
C. spektra noda produk

5.2. Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat pada Fraksinasi untuk Isolasi Enzim PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum*

5.2.1. Percobaan I

Pada percobaan optimasi konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim PABA-glukosiltransferase didapatkan fraksi enzim 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, dan 50-60% dengan dua kali replikasi. Masing-masing fraksi enzim sebanyak 180 µL diinkubasi bersama substrat PABA 7,3 mM 60 µL, UDP-glukosa 7,3 mM 60 µL, dan buffer tris HCl 0,5 M pH 5 sebanyak 200 µL selama 2 jam pada suhu kamar (29°C) di dalam *incubator shaker* dengan kecepatan 75 rpm, kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan aseton 360 µL. Sebagai standar digunakan PABA glikosida hasil biotransformasi.

Hasil inkubasi dianalisis dengan KLT. Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam silika gel 60 F_{254}, fasa gerak menggunakan campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10 (v/v). Penampak noda menggunakan sinar UV. Analisis densitometer dilakukan pada panjang gelombang 254 nm. Dari hasil masing-masing fraksi enzim didapatkan dua noda yaitu noda produk dan noda PABA yang tidak tertransformasi, kecuali pada fraksi enzim 50-60%. Pada fraksi enzim 50-60% hanya didapatkan satu noda saja, yaitu noda PABA yang tidak tertransformasi. Dan spektra masing-masing noda sama seperti pada pengujian awal.



Gambar 5.4. Hasil Analisis KLT dari Uji Aktivitas Masing-masing Fraksi enzim

Keterangan tiap lajur eluasi :

PABA 7,3 mM (1); UDP-glukosa 7,3 mM (2); blanko (3); hasil inkubasi PABA,UDP-glukosa dan buffer tris HCl pH 5 dengan *crude enzyme* Rep. I (4), *crude enzyme* Rep. II (5), fraksi enzim 0-20% Rep. I (6), fraksi enzim 0-20% Rep. II (7), fraksi enzim 20-30% Rep. I (8); standar PABA glikosida (9); hasil inkubasi PABA,UDP-glukosa dan buffer tris HCl pH 5 dengan fraksi enzim 20-30% Rep. II (10), fraksi enzim 30-40% Rep. I (11), fraksi enzim 30-40% Rep. II (12), fraksi enzim 40-50% Rep. I (13), fraksi enzim 40-50% Rep. II (14), fraksi enzim 50-60% Rep. I (15), fraksi enzim 50-60% Rep. II (16).

Faktor retensi noda : R_f Produk = 0,46

R_f PABA glikosida = 0,49

R_f PABA = 0,84

Tabel V.1. Hasil optimasi antara konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim PABA-glukosiltransferase terhadap luas area produk dan aktivitas relatif enzim percobaan I

Fraksi Enzim	Replikasi I Berat basah sel = 50,0428 g		Replikasi II Berat basah sel = 50,0511 g	
	Luas area noda produk	Aktivitas relatif enzim	Luas area noda produk	Aktivitas relatif enzim
0-20 %	562,4	$4,2255.10^{-3}$	668,6	$5,0226.10^{-3}$
20-30%	381,4	$2,8656.10^{-3}$	423,2	$3,1791.10^{-3}$
30-40%	269,0	$2,0211.10^{-3}$	294,3	$2,2108.10^{-3}$
40-50%	178,3	$1,3396.10^{-3}$	214,2	$1,6091.10^{-3}$
50-60%	-	-	-	-

Perhitungan aktivitas relatif enzim terhadap PABA :

$$C_{produk} : A_{produk} = C_{PABA} : A_{PABA}$$

$$C_{produk} = \frac{A_{produk}}{A_{PABA}} \times C_{PABA}$$

Aktivitas relatif Enzim = C_{produk} : Berat Basah Sel

Keterangan :

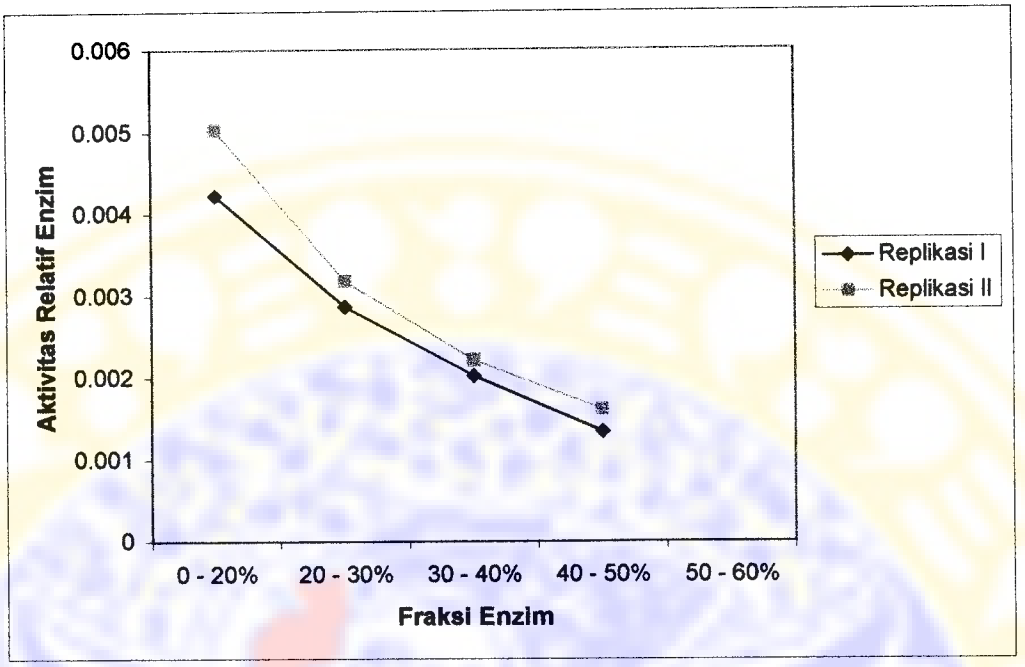
C_{PABA} = 7,3 mM

A_{PABA} = 19415,4

C = konsentrasi

A = Luas Area

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga



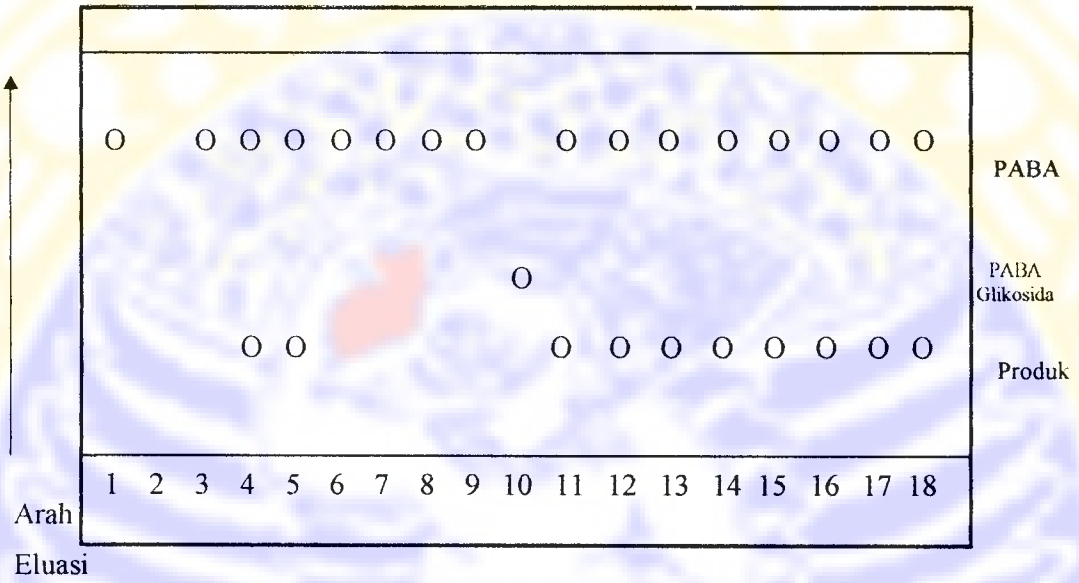
Gambar 5.5. Grafik Optimasi Konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* pada percobaan I

Perhitungan aktivitas relatif enzim pada masing-masing fraksi enzim dengan menggunakan konsentrasi amonium sulfat tertentu terhadap luas area noda produk hasil inkubasi dianalisis dengan KLT-Densitometri pada λ = 254 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F_{254} dan fasa gerak campuran Etil Asetat : Metanol : Air = 77 : 13 : 10.

Dari gambar 5.5 dapat diketahui bahwa fraksi enzim 0-20% yang di dalamnya mengandung amonium sulfat dengan konsentrasi 20% menunjukkan aktivitas tertinggi. Perhitungan aktivitas relatif dapat dilihat pada lampiran.

5.2.2. Percobaan II

Pada percobaan II ini rentang konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan dipersempit. Pada fraksinasi enzim dengan amonium sulfat untuk percobaan II didapatkan fraksi enzim 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, dan 25-30%.. Masing-masing fraksi enzim diperlakukan sama seperti pada percobaan I.



Gambar 5.6. Hasil Analisis KLT dari Uji Aktivitas masing-masing Fraksi enzim pada percobaan II

Keterangan tiap lajur eluasi :

PABA 7,3 mM (1); UDP-glukosa 7,3 mM (2); blanko (3); hasil inkubasi PABA,UDP-glukosa dan buffer tris HCl pH 5 dengan *crude enzyme* Rep. I (4), *crude enzyme* Rep. II (5), fraksi enzim 0-5% Rep. I (6), fraksi enzim 0-5% Rep. II (7), fraksi enzim 5-10% Rep. I (8), fraksi enzim 5-10% Rep. II (9); standar PABA glikosida (10); hasil inkubasi PABA,UDP-glukosa dan buffer tris HCl pH 5 dengan fraksi enzim 10-15% Rep. I (11), fraksi enzim 10-15% Rep. II (12), fraksi enzim 15-20% Rep. I (13), fraksi enzim 15-20% Rep. II (14), fraksi enzim 20-25% Rep. I (15), fraksi enzim 20-25% Rep. II (16), fraksi enzim 25-30% Rep. I (17), fraksi enzim 25-30% Rep. II (18)

Faktor retensi noda : R_f Produk = 0,49

R_f PABA glikosida = 0,52

R_f PABA = 0,86

Perhitungan aktivitas relatif enzim pada masing-masing fraksi enzim dengan menggunakan konsentrasi amonium sulfat tertentu terhadap luas area noda produk hasil inkubasi dianalisis dengan KLT-Densitometri pada λ = 254 nm. Lempeng KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F_{254} dan fasa gerak campuran Etil Asetat : Metanol : Air = 77 : 13 : 10.

Data untuk replikasi II tidak dipakai karena ada kesalahan teknis, yaitu terjadi perbedaan waktu perlakuan yang seharusnya dilakukan bersama-sama karena saat melakukan percobaan II ada keterbatasan alat.

Tabel V.2. Hasil optimasi antara konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi enzim PABA-glukosiltransferase terhadap luas area produk dan aktivitas relatif enzim pada percobaan II

Fraksi Enzim	Replikasi I Berat basah sel = 50,0843 g	
	Luas area noda produk	Aktivitas relatif enzim
0-5 %	-	-
5-10%	-	-
10-15%	674,9	$3,9331.10^{-3}$
15-20%	1063,6	$6,1984.10^{-3}$
20-25%	966,1	$5,6302.10^{-3}$
25-30%	904,0	$5,2683.10^{-3}$

Perhitungan aktivitas relatif enzim terhadap PABA :

$$C_{produk} : A_{produk} = C_{PABA} : A_{PABA}$$

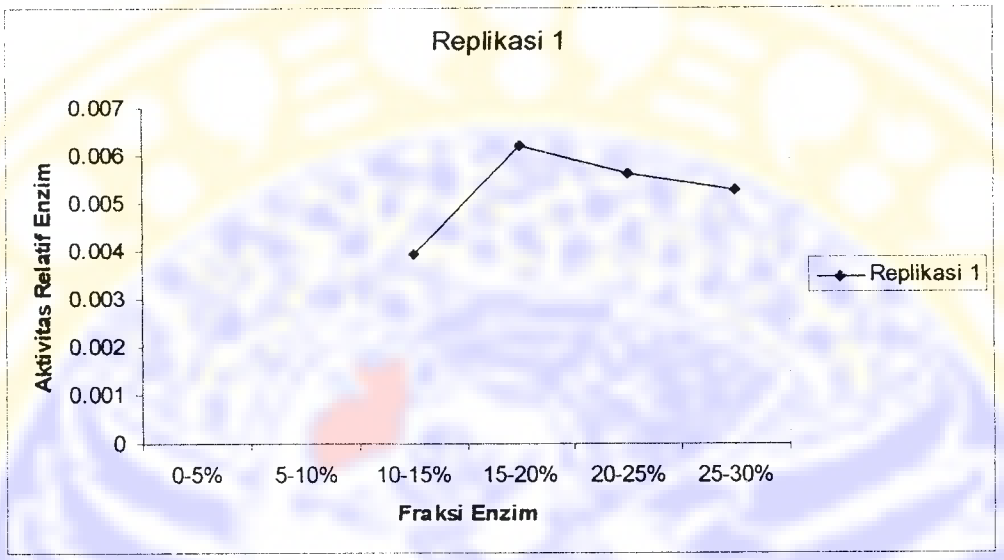
$$C_{produk} = \frac{A_{produk}}{A_{PABA}} \times C_{PABA}$$

Aktivitas relatif Enzim = C_{produk} : Berat Basah Sel

Keterangan :

C_{PABA} = 7,3 mM C = konsentrasi

A_{PABA} = 25010,4 A = Luas Area



Gambar 5.7. Grafik Optimasi Konsentrasi amonium sulfat pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* pada percobaan II

Berdasarkan gambar 5.7. dapat diketahui bahwa fraksi enzim 15-20% Replikasi I yang di dalamnya mengandung amonium sulfat dengan konsentrasi 20% menunjukkan aktivitas tertinggi. Perhitungan aktivitas relatif dapat dilihat pada lampiran.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB VI

PEMBAHASAN

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada percobaan isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* dilakukan pada usia kultur hari ke-5. Pertumbuhan sel pada kultur suspensi lebih cepat dibandingkan kultur kalus (kultur padat), tetapi diketahui relatif tidak stabil karena itu kultivasi kultur suspensi sel dilakukan seminggu sekali, yaitu pada hari ke-tujuh. Hal ini menunjukkan, dilihat dari fase-fase pertumbuhan sel tanaman, pada hari ke-7 sel pada kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* mulai memasuki fase menuju kematian sehingga kultur harus segera dipindah ke media baru. Hal ini juga dapat dilihat dari warna sel kultur yang semula hijau segar mulai agak kecoklat-coklatan dan media pada kultur juga mulai habis. Pada percobaan ini kultur yang diambil adalah pada usia hari ke-5 diharapkan selnya masih mengalami fase pertumbuhan sehingga didapatkan massa sel yang banyak, dengan asumsi produksi enzim dari sel juga akan banyak.

6.1. Pengujian Awal

Uji aktivitas fraksi enzim dengan KLT menggunakan fasa diam Silika Gel 60 F_{254} dan fasa gerak campuran Etil Asetat : Metanol : Air = 77 : 13 : 10 (v/v). Analisis densitometer dilakukan pada panjang gelombang 254 nm. Cara ini tampak senyawa-senyawa hasil reaksi terpisahkan dengan baik, tidak saling tumpang tindih.

Hasil inkubasi fraksi enzim 20% dengan PABA dan UDP-glukosa, setelah dilakukan analisis dengan KLT didapatkan dua noda pada lempeng KLT, yaitu noda produk dan noda PABA yang tidak tertransformasi. Begitu juga pada hasil inkubasi *crude enzyme* menghasilkan dua noda yang sama pada lempeng KLT. Noda produk yang terbentuk menunjukkan pada *crude enzyme* dan fraksi enzim 20% yang telah diinkubasi bersama substrat PABA dan UDP-glukosa terjadi reaksi enzimatik. Hal ini diperkuat dengan adanya blanko, yaitu menginkubasi PABA, UDP-glukosa dan buffer tris HCl pH 5 tanpa enzim ternyata tidak menghasilkan produk, hanya menghasilkan satu noda yaitu noda PABA karena

tidak terjadi reaksi antara PABA dan UDP-glukosa disebabkan tidak ada enzim yang mengkatalisis reaksi.

Aktivitas enzim pada *crude enzyme* lebih besar dari daripada fraksi enzim 20% dilihat dari luas area produk yang terbentuk hasil inkubasi pada *crude enzyme* lebih besar daripada fraksi enzim 20%. Aktivitas enzim pada *crude enzyme* lebih besar dari daripada fraksi enzim 20% disebabkan karena pengaruh kestabilan enzim. Pada *crude enzyme* lebih stabil dibandingkan pada fraksi enzim karena setelah mendapatkan *crude enzyme* langsung disimpan sehingga enzim di dalamnya tetap terjaga kestabilannya. Sedangkan pada fraksi enzim larutan enzim mengalami berbagai perlakuan pada fraksinasi yang dapat mempengaruhi kestabilan enzim.

Hasil inkubasi fraksi enzim 20% dengan PABA, UDP-glukosa, dan ditambahkan juga PABA glikosida ternyata menghasilkan tiga noda, yaitu noda produk, noda PABA glikosida dan noda PABA yang tidak tertransformasi. Pada hasil inkubasi fraksi enzim 20% yang ditambahkan PABA glikosida tanpa PABA dan UDP-glukosa, ternyata hanya dihasilkan satu noda, yaitu noda PABA glikosida. Hal ini menunjukkan enzim tidak mempengaruhi PABA glikosida dan produk yang terbentuk berbeda dengan PABA glikosida, produk hanya berasal dari transformasi PABA dan UDP-glukosa, bukan dari transformasi PABA glikosida.

Apabila fraksi enzim diinaktifkan terlebih dahulu dengan menambahkan aseton, baru kemudian ditambahkan PABA dan UDP-glukosa, ternyata pada hasil analisis KLT hanya didapatkan satu noda saja, yaitu noda PABA. Tidak terbentuknya noda produk menunjukkan tidak terjadi reaksi enzimatik karena enzim telah dimatikan dan tidak dapat mengkatalisis reaksi antara PABA dan UDP-glukosa.

PABA diinkubasi bersama fraksi enzim 20% tanpa ditambahkan UDP-glukosa, dari hasil analisis KLT tidak didapatkan noda produk, hanya terdapat noda PABA saja, sehingga memperkuat bahwa reaksi pembentukan produk hanya terjadi apabila ada substrat PABA dan UDP-glukosa dan reaksi yang terjadi dikatalisis oleh enzim yang terdapat pada fraksi enzim.

Hasil analisis KLT menunjukkan Rf produk lebih kecil daripada PABA glikosida hasil biotransformasi. Harga Rf ini menunjukkan produk lebih polar daripada PABA glikosida sehingga dapat diketahui reaksi biotransformasi PABA menjadi produk merupakan suatu reaksi penempelan gugus yang bersifat polar.

Pada spektra absorban-reflektan dengan densitometer pada panjang gelombang 200-370 nm antara produk, PABA glikosida dan PABA memperlihatkan profil dan λ maks yang berbeda. Jadi produk tidak identik dengan PABA glikosida hasil biotransformasi, tetapi mungkin produk suatu senyawa glikosida dari PABA, karena produk hanya terbentuk bila fraksi enzim diinkubasi bersama-sama dengan substrat PABA dan UDP-glukosa.

Produk yang terbentuk dari hasil penelitian berbeda dengan PABA-glikosida hasil biotransformasi disebabkan adanya perbedaan lingkungan dan kondisi dalam reaksi enzimatik. Pada biotransformasi terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi reaksi enzimatik in vivo yang berasal dari tanaman itu sendiri, sedangkan reaksi enzimatik pada penelitian ini dilakukan secara in vitro hanya melibatkan substrat PABA dan UDP-glukosa dan enzim yang mengkatalisis reaksi tanpa ada faktor lain.

Produk hanya terbentuk bila fraksi enzim diinkubasi bersama dengan substrat PABA dan UDP-glukosa berdasarkan sifat enzim yang bekerja secara spesifik yang hanya mengkatalisis satu reaksi yang spesifik dan tidak mengkatalisis reaksi yang lain. Sifat spesifik enzim ini karena struktur enzim yang khas dengan keunikan sisi aktifnya dan konfigurasi dari struktur substrat.

6.2. Optimasi Konsentrasi Amonium Sulfat pada Fraksinasi untuk Isolasi Enzim PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum*

Cara pengendapan enzim dari *crude enzyme* dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi sehingga didapatkan fraksi enzim pada berbagai konsentrasi amonium sulfat. Pengendapan enzim dengan amonium sulfat ini terjadi dengan menetralkan muatan permukaan dengan menurunkan aktivitas kimia dari protein dan dengan mengurangi konsentrasi efektif dari air, di mana peristiwa ini disebut "*salting out*" dari protein.

Metode pengujian aktivitas enzim dapat ditentukan berdasarkan dua hal yaitu dengan menghitung laju reaksi katalisis enzim dan dengan menghitung aktivitas spesifik yaitu unit enzim tiap mg protein. Metode pertama yaitu menghitung laju reaksi katalisis enzim dengan menghitung kadar produk yang terbentuk atau menghitung kadar substrat yang hilang selama reaksi berlangsung setiap waktu. Metode kedua yaitu menghitung aktivitas spesifik bertujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian enzim. Pada penelitian ini digunakan metode pertama dengan menghitung kadar produk yang terbentuk saat reaksi enzimatik berlangsung.

Hasil inkubasi fraksi enzim bersama PABA dan UDP-glukosa dianalisis dengan KLT. Pemisahan dengan KLT menggunakan fasa diam silika gel 60 F_{254}, fasa gerak campuran etil asetat : metanol : air = 77 : 13 : 10 (v/v). Penampak noda menggunakan sinar UV. Analisis densitometer dilakukan pada panjang gelombang 254 nm. Terbentuknya produk dapat dilihat dari luas area noda produk pada lempeng kromatografi.

6.2.1. Percobaan I

Pada uji optimasi konsentrasi amonium sulfat ini, fraksi enzim yang didapatkan yaitu fraksi enzim 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50% dan 50-60%. Pada penambahan amonium sulfat untuk mencapai fraksi enzim 60-70% ternyata amonium sulfat yang ditambahkan sudah tidak dapat larut lagi karena pada larutan enzim sudah mengalami kejenuhan sehingga pada penambahan amonium sulfat selanjutnya, larutan enzim sudah tidak dapat melarutkan amonium sulfat lagi. Fraksi enzim yang diuji hanya sampai fraksi 50-60%, baik pada replikasi I dan replikasi II.

Hasil analisis KLT dari uji aktivitas enzim pada masing-masing fraksi enzim menghasilkan dua noda, yaitu noda produk dan noda PABA yang tidak tertransformasi, kecuali pada fraksi enzim 50-60%, baik pada replikasi I dan replikasi II. Pada fraksi enzim 50-60% enzim yang terendapkan sedikit sehingga produk yang dihasilkan juga sedikit dan tidak dapat terdeteksi pada densitometer. Spektra masing-masing noda sama seperti pengujian awal.

Hasil pengukuran luas area noda produk dengan densitometer dapat ditentukan aktivitas enzim pada masing-masing fraksi enzim. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan uji aktivitas relatif karena produk yang terbentuk belum diidentifikasi, sehingga tidak ada zat standar yang bisa dibuat kurva bakunya. Secara kualitatif noda produk dibandingkan dengan standar PABA-glikosida karena dari reaksi enzimatik yaitu transformasi PABA dan UDP-glukosa dikatalisis oleh enzim PABA-glukosiltransferase akan terbentuk produk PABA-glikosida.

Hasil penentuan aktivitas relatif enzim ternyata pada fraksi enzim 0-20% langsung menunjukkan aktivitas tertinggi dan pada fraksi enzim selanjutnya aktivitas enzimnya menurun, baik pada replikasi I dan replikasi II. Pada fraksi enzim 0-20% jumlah enzim yang terendapkan banyak sehingga jumlah produk yang terbentuk juga banyak. Enzim di dalam larutan enzim sudah banyak terendapkan oleh amonium sulfat di fraksi enzim 0-20%, akibatnya jumlah enzim yang tersisa di dalam larutan enzim tinggal sedikit, sehingga pada penambahan amoniun sulfat untuk fraksi enzim selanjutnya hanya mampu mengendapkan enzim dalam jumlah yang sedikit dan menghasilkan produk sedikit pula.

Pada gambar 5.5 dapat dilihat aktivitas enzim tertinggi yaitu pada fraksi enzim 0-20%, dan terus menurun pada fraksi selanjutnya sampai pada fraksi 50-60% aktivitas enzim sudah tidak terlihat lagi dikarenakan jumlah produk yang terbentuk sedikit sehingga tidak terdeteksi pada densitometer. Hasil percobaan I didapatkan fraksi enzim 0-20% dengan konsentrasi amonium sulfat 20% mempunyai aktivitas enzim paling optimal.

Hasil penelitian didapatkan aktivitas enzim yang optimal langsung pada fraksi enzim yang pertama, yaitu fraksi enzim 0-20 sehingga dilakukan penelitian selanjutnya dengan rentang konsentrasi amonium sulfat dipersempit.

6.2.2. Percobaan II

Penelitian selanjutnya dengan fraksi enzim yang diujikan adalah fraksi enzim 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25% dan 25-30%. Pada fraksi enzim di atas 30% tidak diujikan karena pada penelitian sebelumnya diketahui aktivitas enzim sudah terbukti menurun.

Hasil analisis KLT ternyata pada fraksi enzim 0-5% dan 5-10% tidak muncul noda produk, hanya terdapat noda PABA saja karena kadar enzim yang terendapkan sedikit sehingga produk yang dihasilkan juga sedikit dan tidak dapat terdeteksi pada densitometer. Pada saat fraksinasi untuk memperoleh fraksi enzim 0-5% dan 5-10%, endapan yang terbentuk banyak, tetapi tidak menunjukkan bahwa enzim yang terendapkan juga banyak karena pada penambahan amonium sulfat dengan konsentrasi kecil seringkali mendapatkan endapan yang mengandung partikel tertentu seperti ribosom, fragmen membran, protein besar dan bahkan protein yang terdenaturasi. Pada fraksi 10-15% mulai muncul noda produk dan begitu juga untuk fraksi enzim selanjutnya.

Hasil pengukuran luas area noda produk masing-masing fraksi enzim tersebut ditentukan aktivitas enzimnya. Pada replikasi I aktivitas enzim yang paling optimal adalah pada fraksi enzim 15-20% dengan konsentrasi amonium sulfat 20%. Pada replikasi II data tidak dapat dipakai karena ada kesalahan teknis, yaitu terjadi perbedaan waktu perlakuan yang seharusnya dilakukan bersama-sama karena saat melakukan percobaan II ada keterbatasan alat. Perbedaan waktu ini mempengaruhi aktivitas enzim karena terjadi perbedaan suhu antara replikasi I dan II, bisa juga sedikit perubahan pH saja dapat menyebabkan menurunnya aktivitas enzim.

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim diantaranya adalah faktor yang berpengaruh terhadap struktur dari enzim di mana bila terjadi perubahan struktur dapat mengakibatkan perubahan sisi aktif dari enzim sehingga mengubah aktivitas enzim, dan faktor yang mempengaruhi kestabilan enzim sebagai protein, diantaranya kadar enzim dan substrat, suhu, pH, adanya inhibitor dan adanya kofaktor atau koenzim.

Hasil percobaan II ini didapatkan aktivitas enzim yang paling optimal adalah pada fraksi enzim 15-20% dengan konsentrasi amonium sulfat 20%. Hal ini memperkuat bahwa konsentrasi amonium sulfat yang optimal untuk mengendapkan enzim dengan aktivitas yang optimal adalah 20%.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan : konsentrasi amonium sulfat yang optimal pada fraksinasi untuk isolasi PABA-glukosiltransferase dari kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* adalah 20%.

7.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan :

1. Produk yang terbentuk perlu diidentifikasi untuk menentukan struktur kimianya.
2. Fraksi enzim yang telah diperoleh perlu dimurnikan lebih lanjut misalnya dengan flitrasi gel atau dengan cara-cara kromatografi lainnya.
3. Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum* perlu ditentukan indeks pertumbuhannya sehingga dapat dicari korelasi yang lebih tepat antara pertumbuhan sel dengan produksi enzim.

DAFTAR PUSTAKA

Best, D. J., 1985. Chemistry and Biotechnology. In : Higgins, I. J.;Best, D. J., and Jones, J. (eds.). **Biotechnology, Principles and Applications**. Blackwell Scientific Publications, p. 147-148.

Budavari, S., and O'neil, M.J., 1996. **The Merck Index : An Encyclopedia of Chemical, Drug and Biological**. 33th ed. New York : Merck and Co., Inc., p. 74-75.

Dombrowski, K., and Alfermann, A.W., 1992. Biotransformation of Salicylic Acid Derivatives by Plant Cell Suspension Cultures. **Planta Medica** : 58 (suppl. I) : A 576-577.

Donaldson, S., 1983. *Solanum laciniatum* **http://www.anbg.gov.au/gnp/gnp12/solanum-laciniatum.html**. 16 Maret 2004.

Englard, S., and Seifter, S., 1990. Precipitation Techniques. In : Deutscher, M. P. (ed.) **Guide to Protein Purification**. San Diego : Academic Press, Inc., p. 291-295.

Gamborg, O. L., 1982. Callus and Cell Culture. In : Wetter, L. R., and Constable, F. (eds.) **Plant Tissue Culture Methodes**, 2nd Ed, National Research Council of Canada, Saskatoon, Saskatchewan, p. 1-9.

Hasegawa, S.; Suhadya, C.G.; Hsu, W.J.; Robertson, G.H. Purification of Limonoid Glucosyltransferase from Navel Orange Albedo Tissue. **Phytochemistry**, 1997; 46 (1) : 33-37.

Hussey, G., 1986. Tissue Culture Media, in : Yeomann, M.M., **Plant Cell Cultures Technology Botanical Monographs**, volume 23, London : Blackwell Scientific Publication, p. 1-41.

Indrayanto, G., 1986. **Kultur Jaringan Tanaman** : Suatu Petunjuk Praktis untuk Farmasi. PAU Bioteknologi UGM, hal. 9, 21-38, 64..

Indrayanto, G., dan Rahman, A., 1990. Biotransformation by Plant Cell Cultures. **Buletin ISFI Jatim**, Vol. 20 (1-2), p. 18-27.

Indrayanto, G., dan Syahrani, A., 1998 **Biotransformasi Asam Orto, Meta dan Para Amino Benzoat dengan Kultur Suspensi Sel Solanum mammosum dan Solanum laciniatum**. Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi Dewan Riset Nasional, hal. 27.

Kurz, W.G.W., and Constabel, F., 1982. Production and Isolation of Secondary Metabolites. In : Wetter, L. R., and Constable, F. (eds.) **Plant Tissue Culture Methodes**, 2nd Ed, National Research Council of Canada, Saskatoon, Saskatchewan, p. 128.

Kutney, J.P., Plant Cell Cultures and Synthetic Chemistry Routes to Clinically Important Compounds, in : Downum, *et al.* (Eds.). **Phytochemical Potentional of Tropical Plant**. New York : Plenum Press.

Lehninger, A.L., 1975. **Biochemistry**. 2 nd ed. New York : Worth Publishers, Inc., p. 196-197, 208-209.

Li, S.M., Wang, Z.X., and Heide, L., 1997. Purification of UDP-Glucose : 4-Hydroxybenzoate Glucosyltransferase from Cell Cultures of *Lithospermum erytrorhizon*. **Phytochemistry** : 46 (1), p. 27-32.

Macek, T. E., 1989. Solanum Aviculare Forst, Solanum laciniatum Ait (Poro-poro) : in vitro culture and production of solasodinae in Biotechnology, in : Bajaj, Y. P. S., **Agriculture and Forestry**, Volume 7, springer Verlag, berlin Hesdelberg, p. 448.

Mizukami, H,, Terao, T., and Ohashi, H., 1985. Partial Purification and Characterization of UDP-Glucose : Salicyl Alcohol Glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides* Cell Cultures. **Planta Medica**, vol. 46, p. 104-107.

Mizukami, H., Terao, T., Ariano, A., and Ohashi, H., 1986. Glucosylation of Salicyl Alcohol by *Gardenia jasminoides* Cell Cultures. **Plant Cell Physiology**, vol. 27 (4), p. 645-650.

Morris, P., Seragg, A. H., Smart, N. J., and Stafford, A., 1985. Secondary Product Formation. In : Dixon, R. A. (ed) **Plant Cell Culture – A Practical Approach**. Oxford : IRL Press, p. 160-161

Mulya, M., Suharman. 1995, **Analisis Instrumental**, Universitas Airlangga Surabaya, hal. 223-228, 231.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A.,and Rodwell, V. W., 1999. **Biokimia Harper**. 24nd Ed. Alih bahasa : Hartono, A. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hal. 67-77.

Panjaitan, T.S., Syahrani, A., dan Indrayanto, G., 2000. Densitometric Determination of *p*-Aminobenzoic acid and β-D-Glucose-1-*p*-aminobenzoate in Cell-Suspension Cultures of *Solanum laciniatum*. **Journal of Planar Chromatography**, vol. 13, p. 114-118.

Petersen, M., and Alferman, A. W., 1993. Plant Cell Cultures, in Rehm *et al.* (Eds.) : **Biotechnology**, Volume 2, 2nd ed, New York : VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Purnawati, L. 2000. **Isolasi Enzim Kasar ("*Crude Enzyme*") PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi *Solanum Mammosum* L.** Surabaya: Universitas Airlangga, hal. 22-64. Skripsi.

Putra, G.S.,2000. **Isolasi Enzim Kasar OABA Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Solanum mammosum L,** Surabaya : Universitas Airlangga, hal. 81. Skripsi.

Rahmawati, 2001. **Percobaan Isolasi PABA-Glukosiltransferase dari Kultur Suspensi Sel Solanum mammosum L Dengan Fraksinasi Amonium Sulfat : Studi Optimasi Fraksi, Optimasi usia Kultur, Induksi Sel Kultur dengan PABA, dan Uji Glukosidase**, Surabaya : Universitas Airlangga, hal. 52. Skripsi.

Reynold, J.E.F. (Ed.). 1996. **Martindale, The Extra Pharmacopoeia**. 31th ed. London: Royal Pharmaceutical Society, p. 1559-1560.

Syahrani, A. 1996. **Biotransformasi Salisilamida, Salisil Alkohol, dan Asam *p*-aminobenzoat dengan Kultur Suspensi Sel Solanum mammosum L.** Surabaya: Universitas Airlangga, hal 85-88, 101-102. Desertasi.

Syahrani, A., Indrayanto, G., Sutarjadi, dan Fatimah, S. 1998. **Produksi Glikosida secara Biotransformasi dengan Kultur Sel Amobil**. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, hal 8.

Syahrani, A., Ratnasari, E., Indrayanto, G., and Wilkins, A.L. 1999. Biotransformation of *o*- and *p*-aminobenzoic acids and *N*-acetyl *p*-aminobenzoic acid by cell suspension cultures of *Solanum mammosum*. **Phytochemistry**, vol. 51, p. 615-620.

Tabata, M., Ikeda, F., Hiroaka, N., and Konoshima, M., 1976. Glucosylation of Phenolic Compounds by *Datura Innoxia* suspension cultures. **Phytochemistry**, vol. 15, p. 1225-1229.

Tjitrosoepomo, G., 1988. **Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)**, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hal. 354-355.

Trease, G.E., and Evans, W.C. 1978. **Pharmacognosy**. 11th ed. London: Bailliere Tindall, p. 263-265.

Wetter, L.R., and Constabel, F. (Eds.). 1982. **Plant Tissue Culture**. 2nd ed. Saskatchewan: Prairie Regional Laboratory; p. 132-133.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lampiran 1

Komponen Kimiawi Media Murashige dan Skoog

Komponen	Jumlah (mg/L)
$(NH_4)_2NO_3$	1650
KNO_3	1900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$MnSO_4.H_2O$	22,3
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
EDTA-Ferric acid	43,0
Sucrose	30000
Inositol	100
Asam nikotinat	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Thiamin HCl	0,1
IAA	1-30
Kinetin	0,04-10

pH = 5,6-5,7

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lampiran 2

Komposisi Media untuk Kultur Suspensi Sel *Solanum laciniatum*

Komponen	Jumlah (mg/L)
$(NH_4)_2NO_3$	1.650
KNO_3	1.900
$CaCl_2.2H_2O$	440
$MgSO_4.7H_2O$	370
KH_2PO_4	170
KI	0,83
H_3BO_3	6,20
$MnSO_4.H_2O$	22,30
$ZnSO_4.7H_2O$	8,60
$Na_2EDTA.2H_2O$	37,30
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25
$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$CoCl_2.6H_2O$	0,025
Asam nikotinat	0,50
Piridoksin HCl	0,50
Thiamin HCl	0,1
Kinetin	2,0
2,4D½	0,5
Sucrose	30.000
Myo-inositol	100

pH = 5,6-5,7

Lampiran 3

Skema Pembuatan Media *Solanum laciniatum*

Tiap-tiap larutan stok media SL_4 diambil 10 mL
dimasukkan dalam *beaker glass* 1 L

↓

+ 20 mL larutan hormon kinetin + 10 mL larutan 2,4D

↓

+ 100 mg mio-inositol + 30 g sukrosa
diaduk ad larut

↓

+ air suling sampai volume mendekati 1 L (± 950 mL)
di cek pH dengan pH meter

↓

Media diatur pada pH 5,6-5,7
dengan + HCL 0,1 N atau NaOH 0,1 N

↓

Dipindahkan ke gelas ukur, + air suling sampai 1 L
Diaduk homogen, lalu disaring

↓

Media dibagi-bagi dalam erlenmeyer masing-masing 50 mL
erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil

↓

Media disterilisasi dengan cara pemanasan basah
Dengan autoklaf 121°C selama 20 menit

↓

Larutan media steril disimpan dalam ruang bersuhu 25 °C
sampai media siap digunakan kembali

Lampiran 4

Skema Kerja Kultivasi Kultur *Solanum laciniatum*

LAFC dibersihkan dengan alkohol 70%

↓

Peralatan + media steril disemprot alkohol 70%
Lalu dimasukkan dalam LAFC

↓

Aliran udara dan lampu UV dinyalakan selama ± 20 menit

↓

Lampu UV dimatikan, lampu TL dinyalakan

↓

Bagian luar wadah kultur yang akan dikultivasi disemprot
Alkohol 70%, kemudian dimasukkan LAFC

↓

Tutup wadah kultur disterilkan dengan dipanasi pada pembakar
spiritus, lalu dibuka memakai pinset yang sudah dipanasi juga

↓

± 5 g sel dari kultur dipindah ke media baru dengan sendok atau skapel
yang telah dipanasi dengan pembakar spiritus

↓

Mulut wadah dipanasi dengan pembakar spiritus
dan ditutup dengan alumunium foil yang telah dipanasi juga

↓

Kultur yang telah dikultivasi diagitasi kembali
pada shaker ±70 rpm pada suhu 25°C

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lampiran 5

Skema Kerja Isolasi Enzim PABA-glukosiltransferase

Kultur suspensi sel *Solanum laciniatum*

Yang dipanen pada hari ke-5

↓

Disaring dengan corong Buchner

↓

Ditimbang berat basah sel sebanyak 50 g

↓

Sel-sel kultur dibekukan

lalu digerus dengan mortir dan stamper sampai halus

↓

+ PVPP 10% dari berat basah sel gerus sampai homogen

↓

+ dapar Tris HCl 0,5 M pH 6

sebanyak 1,5 kali berat basah sel (± 75 mL)

↓

Disentrifugasi dingin (4°C) 10.000 *g*, 30 menit

↓

Supernatan sebagai ekstrak kasar enzim diambil

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lampiran 6

Skema Fraksinasi Ekstrak Kasar enzim

Ekstrak kasar enzim

↓

+ sejumlah tertentu amonium sulfat
menurut fraksi penjenuhan yang ingin dicapai
(0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%,60-70%, 70-80%)

↓

Disentrifugasi dingin (4°C) 10.000 *g*, 30 menit

Supernatan → Fraksinasi lebih lanjut

Endapan → Dilarutkan dalam 1,5 mL dapar Tris HCL 0,5 M pH 5 → Disimpan dalam tabung eppendorf

Lampiran 7

Skema Uji Aktivitas Relatif Enzim

PABA 7,3 mM 60 μL + UDP glukosa 7,3 mM 60 μL
+ 200 μL dapar Tris HCl 0,5 M pH 5

↓

+ Fraksi enzim 180 μL
dihomogenkan dengan vortex

↓

inkubasi 2 jam pada suhu kamar (29°C)
di dalam *incubation shaker* dengan kecepatan 75 rpm

↓

Reaksi dihentikan dengan 360 μL aseton
Dihomogenkan dengan vortex

↓

Sentrifugasi 3500 rpm 5 menit

↓

Diambil larutannya

↓

Uji aktivitas relatif enzim
Perhitungan Luas area dengan
metode KLT-Densitometri

Lampiran 8

Perhitungan aktivitas relatif enzim terhadap PABA :

$$C_{produk} : A_{produk} = C_{PABA} : A_{PABA}$$

$$C_{produk} = \frac{A_{produk}}{A_{PABA}} \times C_{PABA}$$

Aktivitas relatif Enzim = C_{produk} : Berat Basah Sel

Keterangan :

C = konsentrasi

A = Luas Area

Berikut ini adalah cara perhitungan aktivitas relatif enzim terhadap PABA, diambil satu contoh, untuk fraksi enzim lainnya cara perhitungannya sama.

PERCOBAAN I :

Fraksi enzim 0-20% Replikasi I :

$$C_{produk} = \frac{A_{produk}}{A_{PABA}} \times C_{PABA}$$

$$C_{produk} = \frac{562,4}{19415,4} \times 7,3 \text{ mM}$$

$$= 0,2115 \text{ mM}$$

$$\text{Aktivitas relatif Enzim} = \frac{C_{produk}}{\text{Berat Basah Sel}}$$

$$= \frac{0,2115 \text{ mM}}{50,0428 \text{ g}}$$

$$= 4,2255.10^{-3} \text{ mM/g}$$

Aktivitas relatif enzim $4,2255.10^{-3}$ mM/g dalam 2 jam inkubasi

PERCOBAAN II

Fraksi enzim 10-15% Replikasi I :

$$C_{produk} = \frac{A_{produk}}{A_{PABA}} \times C_{PABA}$$

$$C_{produk} = \frac{674,9}{25010,4} \times 7,3 \text{ mM}$$

$$= 0,1970 \text{ mM}$$

$$\text{Aktivitas relatif Enzim} = \frac{C_{produk}}{\text{Berat Basah Sel}}$$

$$= \frac{0,1970 \text{ mM}}{50,0843 \text{ g}}$$

$$= 3,9331.10^{-3} \text{ mM/g}$$

Aktivitas relatif enzim $3,9331.10^{-3}$ mM/g dalam 2 jam inkubasi