

ILMU MIPA

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING

lcl  
lclcc  
LP. 77/10  
Man  
i



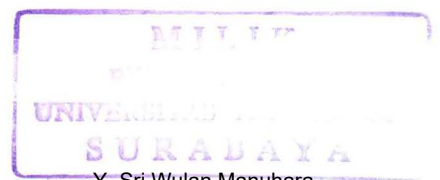
ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM  $\beta$ -1,3-ENDOGLUKANASE DARI TANAMAN KUBIS LOKAL : UPAYA Mencari SUMBER GEN KETAHANAN TANAMAN TERHADAP PENYAKIT AKIBAT JAMUR

Peneliti:

Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si  
Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si  
Dra. Sri Pudji Astuti W., M.Si

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Nomor : 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tanggal 29 maret 2007

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
DESEMBER 2008



## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN TAHUNAN

### 1. Judul usulan :

Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari Tanaman Kubis Lokal : Upaya Mencari Sumber Gen Ketahanan Tanaman Terhadap Penyakit Akibat Jamur

### 2. Ketua Peneliti :

- a. Nama Lengkap : Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 131801396
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Bidang Keahlian : Bioteknologi Tanaman
- g. Fakultas/Departemen : Sains dan Teknologi/Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti

No.	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si	Biologi Molekuler	MIPA/Kimia	Universitas Airlangga
2.	Dra. Sri Pudji Astuti, M.Si	Bioteknologi	MIPA/Biologi	Universitas Airlangga

### 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 150.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp. 35.000.000,-

Surabaya, 9 Desember 2008

Mengetahui:

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga

Drs. Salamun, M.Kes.  
NIP. 131696506

Ketua Peneliti

Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si  
NIP. 131801396

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian

Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA. Drh  
NIP. 131837004

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM $\beta$ -1,3-ENDOGLUKANASE DARI TANAMAN KUBIS LOKAL : UPAYA Mencari SUMBER GEN KETAHANAN TANAMAN TERHADAP PENYAKIT AKIBAT JAMUR

Y. Sri Wulan Manuhara<sup>1</sup>, Ni Nyoman Tri Puspaningsih<sup>2</sup>, Sri Pudji Astuti W.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Airlangga, Kampus C Jl. Mulyorejo, Surabaya

<sup>2</sup>Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Airlangga, Kampus C Jl. Mulyorejo, Surabaya

### RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dan tingkat kemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis (*Brassica oleracea* cv. *Capitata* L.) lokal tersebut menggunakan metode kromatografi hidrofobik dan kromatografi penukar ion.

Untuk mengetahui karakteristik enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dilakukan uji aktivitas enzim pada pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 dan suhu (30, 40, 60, dan 80)<sup>o</sup>C. Proses pemurnian enzim didahului dengan isolasi protein total dari daun tanaman kubis lokal hibrida Gloria osena, kemudian diendapkan menggunakan amonium sulfat dengan kadar kejenuhan 40%. Pelet enzim yang diperoleh dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat untuk dimurnikan lebih lanjut dari protein-protein kecil dan amonium sulfat dengan dialisis. Selanjutnya dilakukan kromatografi interaksi hidrofobik menggunakan eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7 bergradien konsentrasi tinggi ke rendah dengan matriks *Butyl-toyopearl 650 M* dalam etanol guna memisahkan enzim berdasarkan interaksi residu hidrofobik protein dengan gugus-gugus hidrofobik adsorben. Kemudian enzim dimurnikan dengan kromatografi penukar ion untuk memisahkan protein berdasarkan muatannya. Enzim dialiru eluen NaCl (0-0,5) M dalam buffer Tris HCl bergradien konsentrasi rendah ke tinggi dengan matriks *DEAE-toyopearl 650 M* dalam etanol.

Hasil karakterisasi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase diperoleh bahwa enzim bekerja optimal pada pH 7 dan suhu 40<sup>o</sup>C. Hasil pengendapan enzim dengan ammonium sulfat diperoleh aktivitas enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase yang diukur adalah sebesar 0,68 U/mL, sedangkan besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini adalah 1,98 mg/mL. Sedangkan hasil dialisis enzim diperoleh volume enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase sebesar 3 mL dengan aktivitas enzim sebesar 0,234 U/mL. Hasil pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan kromatografi hidrofobik diperoleh 6 fraksi yang mempunyai aktivitas tinggi dari total 30 fraksi dengan aktivitas 13.735,3 kali dari ekstrak kasarnya. Hasil pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan kromaografi penukar ion diperoleh hasil terbaik pada fraksi ke-1 dengan tingkat kemurnian 3.534,1 kali ekstrak kasarnya.

**Kata kunci:** isolasi dan karakterisasi, enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase, *Brassica oleracea* cv. *capitata* L.

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan ke hadapan Tuhan Yang Maha Kuasa, berkat kemurahanNya, semua kesulitan dan hambatan dalam pelaksanaan penelitian Hibah Bersaing Tahap kedua tahun 2008, dapat diatasi dan penulisan laporan penelitian dengan judul "Isolasi dan Karakterisasi Enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari Tanaman Kubis Lokal: Upaya Mencari Sumber Gen Ketahanan Tanaman Terhadap Penyakit Akibat Jamur" ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Bapak Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, Dekan dan Ketua Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, serta semua pihak yang tidak dapat kami sebut namanya satu persatu, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran sangat kami harapkan untuk perbaikan di masa mendatang.

Surabaya, Desember 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Enzim	5
2.2. Peranan $\beta$ -1,3-endoglukanase Terhadap Ketahanan Tanaman	8
2.3. Pemurnian Protein	11
2.3.1. Teknik pemisahan awal protein	13
2.3.2. Pemisahan protein dengan teknik kromatografi	14
2.3.2.1. Kromatografi interaksi hidrofobik	15
2.3.2.2. Kromatografi penukar ion	15
<b>BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b>	
3.1. Tujuan Penelitian	18
3.2. Manfaat Penelitian	18
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	19
4.2. Bahan	19
4.3. Alat	19
4.4. Cara Kerja	
4.4.1. Diagram alir penelitian	20
4.4.2. Isolasi protein total	21
4.4.3. Pengukuran kadar protein total	21
4.4.4. Uji aktivitas enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase	21
4.4.5. Karakterisasi enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase	22
4.4.6. Pengendapan enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan amonium Sulfat	23
4.4.7. Pemurnian enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan seperangkat alat kromatografi interaksi hidrofobik	23

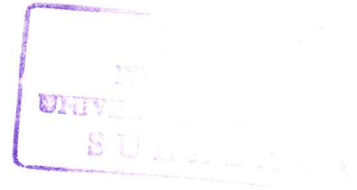
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
1	Hasil optimasi suhu dari enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase	28
2	Hasil optimasi pH dari enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase	28
3	Hasil pemurnian enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase	36

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran</b>		<b>Halaman</b>
1	Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi 1-10 (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)	42
2	Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi I-X (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)	43
3	Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi A-J (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)	44
4	Hasil Elusi Kromatografi Penukar Ion (pH 7, eluen NaCl [0-0,5] M dalam buffer Tris HCl)	45

## BAB I PENDAHULUAN



### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Indonesia sebagai negara tropis telah dikenal sebagai negara yang kaya akan biodiversitas, baik dari aspek tanaman, hewan maupun mikroba. Kekayaan biodiversitas tersebut selain mempunyai banyak manfaat, di lain pihak juga merugikan, terutama berlimpahnya mikroba. Di bidang pertanian banyak dijumpai mikroba patogen (bakteri dan jamur) yang merusak tanaman budidaya. Sebagai contoh, berbagai jenis mikroba yang menyerang tanaman kubis antara lain dari golongan bakteri adalah *Xanthomonas campestris* yang menyebabkan penyakit busuk hitam, *Erwinia carotovora* yang menyebabkan penyakit busuk lunak, sedangkan dari golongan jamur adalah *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. yang menyebabkan penyakit bercak hitam, *Fusarium oxysporum* yang menyebabkan penyakit daun kuning, *Plasmodiophora brassica* Wor. yang menyebabkan penyakit akar bengkok (Permadi, 1993; Djatnika, 1993). Berbagai mikroba juga banyak merusak tanaman-tanaman budidaya lainnya seperti jamur *Fusarium* sp. yang menyerang pohon pisang, virus CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) yang menyerang pohon jeruk dan masih banyak lainnya.

Saat ini berbagai macam hibrida kubis yang ditanam oleh petani berasal dari hasil silangan kubis lokal dan kubis impor atau diperoleh langsung melalui impor biji. Tetapi hibrida hasil silangan tersebut pada umumnya masih rentan terhadap penyakit akibat jamur maupun bakteri, oleh karena itu masih diperlukan fungisida dan bakterisida untuk menjaga agar tanaman kubis tidak rusak. Ada beberapa jenis hibrida kubis lokal yang resisten terhadap infeksi jamur maupun bakteri yaitu kubis hibrida "krop" dan hibrida "Saigon" yang tidak dibudidayakan petani karena bentuk



pemurnian enzim dalam perkembangan ilmu pengetahuan (*science*) adalah untuk mengetahui karakteristik suatu enzim yang meliputi massa molekul relatif, kondisi optimum (pH, suhu), stabilitas pH dan suhu, struktur enzim, serta analisis spesifitas enzim terhadap substrat. Studi tersebut selanjutnya dapat diarahkan untuk aplikasi industri, pertanian, maupun kesehatan.

Pemurnian dan karakterisasi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis lokal merupakan studi awal untuk memperoleh protein enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase murni yang selanjutnya dapat digunakan untuk penelitian seperti kloning gen penyandi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dan transformasi gen tersebut ke dalam tanaman yang rentan terhadap penyakit akibat jamur.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka beberapa aspek penting penelitian ini adalah sebagai berikut: (1) diperoleh sumber gen ketahanan dari tanaman kubis lokal, (2) dapat diketahui kemampuan *antifungal* (antijamur) dari enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase yang diisolasi dari tanaman kubis lokal, (3) membuka peluang untuk dilakukan kloning gen penyandi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase, dan (4) membuka peluang dilakukan transformasi gen  $\beta$ -1,3-endoglukanase ke dalam tanaman lain yang rentan terhadap serangan jamur.

Dari beberapa aspek penting tersebut di atas, maka akan dilakukan isolasi dan karakterisasi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis lokal sebagai upaya untuk mencari sumber gen ketahanan tanaman terhadap penyakit akibat jamur.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas, maka dapat dibuat beberapa rumusan masalah sebagai berikut:

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Enzim

Enzim adalah katalis sistem biologis, yang merupakan molekul penting untuk menentukan mekanisme perubahan bahan kimia. Enzim juga berperan pada perubahan satu bentuk energi menjadi bentuk lain. Karakteristik yang paling menarik dari enzim adalah kekuatan katalitik dan spesifitasnya. Katalisis terjadi pada suatu sisi khusus enzim yang disebut sisi aktif. Hampir semua enzim dikenal sebagai protein, tetapi protein tidak berpengaruh mutlak pada katalisis.

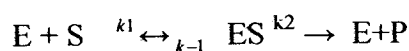
Enzim merupakan katalis yang kuat dan sangat spesifik. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi dengan faktor  $10^6$  atau lebih. Spesifitas enzim terjadi karena adanya interaksi yang tepat antara substrat dengan enzim. Banyak enzim yang membutuhkan kofaktor untuk aktivitas katalitiknya. Kofaktor tersebut dibagi menjadi dua kelompok yaitu ion logam dan molekul organik (koenzim).

Energi bebas ( $G$ ) adalah fungsi termodinamika yang penting untuk menentukan terjadi atau tidaknya reaksi enzim dan untuk mengetahui besarnya energi proses katalisis. Reaksi hanya dapat berlangsung secara spontan jika perubahan dalam energi bebas ( $\Delta G$ ) bernilai negatif. Energi bebas mengubah reaksi yang berlangsung ketika reaktan dan produk pada unit aktivitas yang disebut perubahan energi bebas standar ( $\Delta G^\circ$ ). Para ilmuwan biokimia biasanya menggunakan  $\Delta G^\circ$  sebagai perubahan energi bebas standar pada pH 7. Enzim tidak mengubah persamaan reaksi tetapi meningkatkan kecepatan reaksi.

Enzim meningkatkan reaksi dengan memfasilitasi bentuk keadaan transisi. Sebagai katalis, enzim menurunkan energi bebas aktivasi dari reaksi kimia. Enzim meningkatkan reaksi dengan suatu langkah-langkah reaksi di mana keadaan transisi

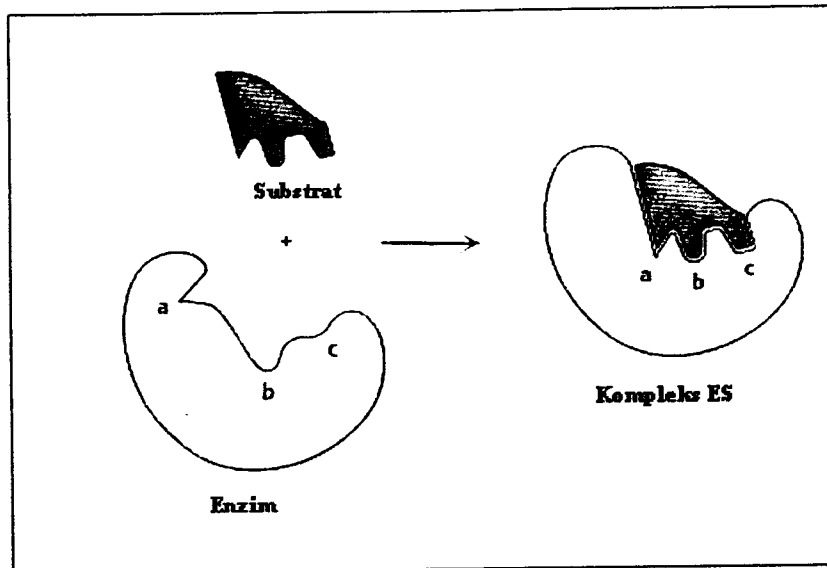
(jenis energi tertinggi) mempunyai energi bebas yang lebih rendah, oleh karena itu terjadi bentuk yang lebih cepat daripada reaksi yang tidak dikatalisis. Langkah pertama katalisis adalah pembentukan kompleks enzim-substrat. Substrat terikat pada celah sisi aktif dimana air tidak terikat ketika substrat terikat. Interaksi spesifitas enzim-substrat terutama terbentuk dari ikatan hidrogen yang terarahkan, dan bentuk sisi aktif menolak molekul yang tidak memenuhi bentuk komplemennya. Pengenalan substrat oleh enzim yang diiringi dengan perubahan konformasi sisi aktif tersebut memfasilitasi bentuk keadaan transisi. Model interaksi enzim-substrat dijelaskan pada Gambar 1 yaitu model *Lock and Key* dan Gambar 2 yaitu model *Induced Fit*. Pada model *Lock and Key* sisi aktif enzim yang tidak terikat enzim komplemen dengan bentuk substratnya sedangkan model *Induced Fit* memperlihatkan bahwa enzim mengubah bentuk pada ikatan substratnya, sisi aktif membentuk komplemen terhadap substrat yang terikat.

Untuk menghitung sifat kinetika enzim digunakan acuan Michaelis-Menten. Enzim (E) bereaksi dengan substrat (S) menjadi kompleks enzim-substrat (ES), yang dapat berlangsung membentuk produk (P).



$$V_0 = V_{\max} [S] / ([S] + K_M)$$

di mana  $V_{\max}$  adalah kecepatan reaksi enzim yang dihasilkan penuh dengan substrat, dan  $K_M$  adalah konstanta Michaelis yang merupakan konsentrasi substrat pada kecepatan reaksi yang besarnya setengah kali kecepatan maksimum. Kecepatan maksimum ( $V_{\max}$ ) sama dengan produk dari  $k_2$  atau konstanta kinetik ( $k_{kat}$ ) dan konsentrasi total enzim.  $k_{kat}$  disebut nilai pembalikan, adalah sejumlah molekul substrat yang menjadi produk/ unit waktu pada sisi katalitik tunggal ketika enzim



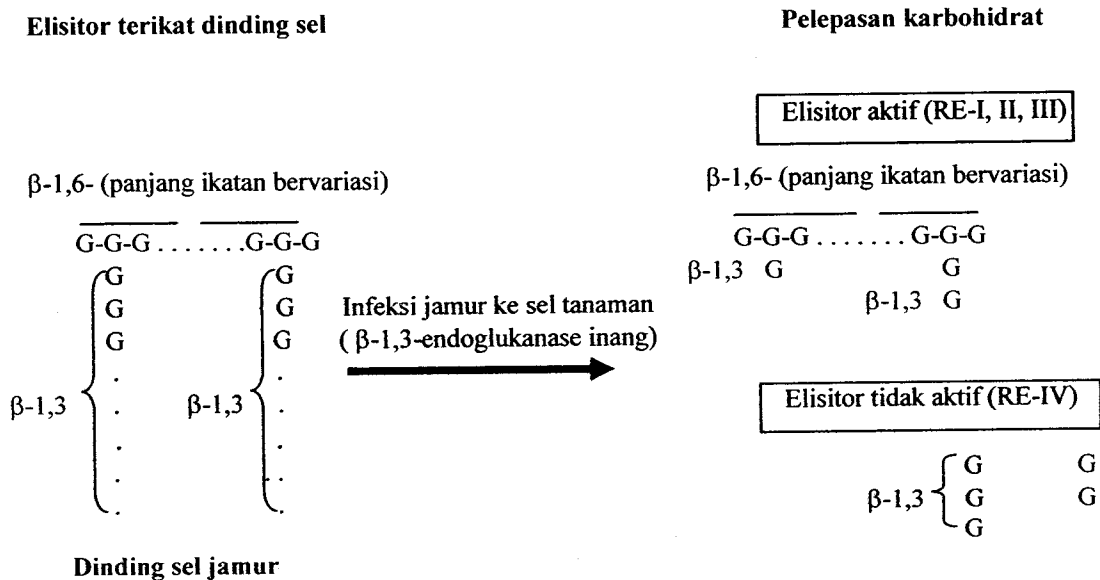
Gambar 2. Model *Induced-fit* ikatan enzim-substrat (Berg *et al.*, 2003).

## 2.2. Peranan $\beta$ -1,3-endoglukanase Terhadap Ketahanan Tanaman

Mekanisme ketahanan tanaman terhadap patogen diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu ketahanan statis/pasif dan ketahanan dinamis/aktif/terimbas. Tipe ketahanan tersebut tergantung pada karakteristik konstitutif tanaman pada saat terinfeksi atau pada kondisi normal. Tipe ketahanan statis dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu pertama adanya penghalang fisik untuk melawan penetrasi mikroba, misalnya dinding sel yang tebal; kedua adanya komponen-komponen tanaman sebagai sumber makanan patogen dan yang ketiga adanya senyawa antimikrobal pada tanaman (Ingham, 1973).

Semua ketahanan yang diekspresikan setelah terjadi serangan mikroba dinamakan ketahanan dinamis/terimbas. Mekanisme ini memainkan peranan kunci dalam ketahanan terhadap patogen. Ketahanan terimbas pada umumnya dibedakan menjadi dua tipe, yaitu ketahanan terimbas setempat (lokal) dan ketahanan terimbas sistemik. Beberapa contoh ketahanan terimbas setempat antara lain adalah pembentukan papilla, lignifikasi dinding sel tanaman inang, reaksi hipersensitif dan

sehingga dilepaskan elisitor aktif yang tersusun atas  $\beta$ -1,6-glukan yang mempunyai satu atau dua cabang  $\beta$ -1,3-glukan dan terikat pada glukosa moiety (RE I, II, III) dan elisitor tidak aktif yaitu dimer glukosa atau trimer glukosa dengan ikatan  $\beta$ -1,3 (RE-IV).



Gambar 3. Model struktur dinding sel jamur *P. megasperma* f.sp. *glycinea* dan bentuk-bentuk elisitor yang dilepaskan akibat serangan  $\beta$ -1,3-endoglukanase kedelai. Tanda panah kecil menunjukkan kemungkinan arah serangan endoglukanase, G : glukosa moiety, RE : *glucanase-released elicitor* (Okinaka *et al.*, 1995)

Berbagai macam  $\beta$ -1,3-glukanase telah diisolasi dari tumbuhan. Sharma *et al.* (1993) mengisolasi  $\beta$ -1,3-glukanase dari akar *Picea abies* (L.) Karst yang diinfeksi dengan *Pythium* sp.. Hwang *et al.* (1997) mendapatkan  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 20 kD yang diisolasi dari tanaman *Capsicum annum* L. Yang disemprot dengan DL-amino-n-butyric acid (BABA). Salzer *et al.* (1997) mendapatkan  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 35 kD pada kultur sel *Picea abies* (L.) Karst. Untuk mempelajari pengaruhnya pada jamur pembentuk ektomikoriza. Peumans *et al.* (2000) memurnikan  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 30 kD dari buah pisang.

Enzim  $\beta$ -1,3-glukanase dapat mendegradasi dinding sel jamur patogen (Yun *et al.*, 1997) sehingga enzim ini dimasukkan sebagai salah satu jenis protein yang berkaitan dengan patogenitas (*pathogenesis-related protein/PR-protein*). Menurut Selitrennikoff, (2001)  $\beta$ -1,3-glukanase digolongkan ke dalam kelas protein PR-2 yang merupakan kelas protein yang memiliki aktivitas (1,3)  $\beta$ -endoglukanase secara *in vitro*.

Aktivitas antifungal  $\beta$ -1,3-glukanase pada tumbuhan terjadi dengan adanya kemampuan untuk menghidrolisis struktur  $\beta$ -1,3-glukan yang ada pada dinding sel jamur, terutama pada bagian ujung hifa di mana glukukan paling banyak dijumpai sehingga dinding sel menjadi lemah kemudian sel lisis dan mati (Selitrennikoff, 2001). Selain itu aktivitas antifungal  $\beta$ -1,3-glukanase pada dinding sel jamur akan menyebabkan dilepaskannya elisitor yang berupa oligosakarida yang akan menginduksi terbentuknya fitoaleksin antijamur (Yoshikawa *et al.*, 1983).

Takeuchi *et al.* (1990) telah berhasil mengklon  $\beta$ -1,3-endoglukanase cDNA kedelai dan Yoshikawa *et al.* (1993) mentransformasikan  $\beta$ -1,3-endoglukanase cDNA kedelai ke dalam tanaman tembakau. Hasil transformasi tersebut menunjukkan bahwa daun tanaman tembakau kontrol (tidak ditransformasi) yang diinokulasi dengan jamur patogen *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* memperlihatkan gejala penyakit yaitu terjadinya nekrosis sehingga daun berwarna coklat, tetapi daun-daun pada tanaman tembakau transgenik tidak ditemukan gejala nekrosis.

### 2.3. Pemurnian Protein

Pemurnian protein merupakan proses berseri untuk mengisolasi tipe tunggal protein dari sebuah campuran kompleks. Proses ini bertujuan memperoleh protein murni yang akan digunakan untuk studi penelitian berikutnya. Studi tersebut meliputi

karakterisasi aktivitas, struktur, dan fungsi protein. Protein murni pada umumnya dibutuhkan dalam keadaan 'native' dan aktif. Langkah-langkah untuk meminimumkan denaturasi dan proteolisis harus dilakukan dengan cara menghindari kondisi ekstrim.

Persiapan awal untuk pemurnian protein terdiri dari penyediaan peralatan, buffer, dan pemilihan uji aktivitas protein. Peralatan yang biasa digunakan adalah pHmeter, pengaduk magnetik stirrer, dan peralatan pemurnian protein lainnya. Peralatan tersebut diantaranya: untuk meminimumkan denaturasi dan proteolisis protein, langkah-langkah pemurnian harus dilakukan pada suhu sekitar 4°C, oleh karena itu digunakan wadah yang tahan suhu dingin ketika dialisis, presipitasi, dan kromatografi kolom, metode Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 205-850 nm digunakan untuk pengukuran protein total, Sentrifugasi untuk mengekstrak protein, serta metode elektrolisis untuk memisahkan berdasarkan berat molekul protein. Pada semua langkah-langkah pemurnian, buffer sangat penting untuk mengontrol pH larutan agar tidak terjadi denaturasi dan inaktivasi protein. Pemilihan uji aktivitas protein perlu dilakukan untuk menguji kemurnian protein yang diinginkan secara efisien.

Langkah awal pemurnian protein adalah preparasi ekstrak yang mengandung protein menjadi bentuk yang dapat dilarutkan. Keadaan ekstrak disiapkan tergantung dari lokasi protein tersebut, yaitu protein ekstraselular, protein intraselular, atau protein yang berada di dalam organel selular. Jika protein tidak bisa dilarutkan, contohnya protein membran, protein matriks ekstraselular, dan protein yang ada di dalam tubuh, maka metode yang digunakan adalah solubilisasi.

Untuk protein ekstraselular, seperti protein yang ada di dalam media fermentasi atau di dalam serum atau urin, sel-sel atau partikel-partikel lain, harus dipisahkan

untuk mencegah terjadi campuran dalam langkah pemurnian selanjutnya. Untuk pemisahan ini, dibutuhkan metode sentrifugasi atau mikrofiltrasi. Jika ekstrak akan diendapkan ke dalam kolom maka presipitasi dilakukan untuk memurnikannya dari partikel-partikel lain. Untuk pemurnian protein intraselular, metode pemisahannya dilakukan dengan disrupti. Proses disrupti ini dapat mengakibatkan beberapa masalah karena destruksi protein intraselular yang terpisah satu sama lain. Kasus tersebut misalnya protease yang ada dalam organel maka ditangani oleh buffer dan pendingin, kemudian jika terbentuk partikel-partikel besar dilakukan filtrasi, jika terjadi oksidasi lingkungan yang menyebabkan denaturasi, inaktivasi, dan agregasi ditambahkan 2-merkaptotanol atau EDTA. Jika protein yang diinginkan ada di dalam sel organel maka pemurnian dilakukan dengan isolasi organel dan ditangani dengan detergen atau didisrupsi (Harris *et al.*, 1993).

### 2.3.1 Teknik pemisahan awal protein

Proses awal pemurnian protein yang biasa dilakukan meliputi bermacam-macam teknik ekstraksi, yaitu klarifikasi, disrupti, serta isolasi organel, kemudian dilakukan pengkonsentrasian ekstrak yang tergantung dari jenis protein tersebut.

Klarifikasi digunakan pada beberapa langkah selama pemurnian untuk memindahkan campuran partikulat (seperti sel-sel, organel-organel, debris atau makromolekul-makromolekul yang mengendap) dari sekeliling cairan (seperti media fermentasi atau buffer), karena protein yang diinginkan dapat berada diantara campuran tersebut. Tiga jenis teknik klarifikasi yang biasa dilakukan adalah sentrifugasi, mikrofiltrasi, dan flokulasi. Flokulasi adalah proses yang karenanya terjadi destabilisasi partikel, yang diinduksi untuk terbentuk bersama, terjadi kontak dan kemudian membentuk partikel yang lebih besar. Disrupti dilakukan dengan langkah-langkah kimia, fisik, atau mekanik untuk memperoleh protein intraselular



gerak dan matriks (seperti selulosa, agarosa, dekstran, poliakrilamid, silika) sebagai fasa diam untuk pemisahannya dalam kolom pemisah.

### 2.3.2.1 Kromatografi interaksi hidrofobik

Teknik pemurnian dengan cara kromatografi interaksi hidrofobik didasarkan pada interaksi antara solut hidrofobik dengan air. Hofstee (1973) dan Shatiel (1973) mengasumsikan bahwa kromatografi hidrofobik adalah model interaksi antara protein dengan ligan hidrofobik tak bergerak yang mirip dengan asosiasi molekul organik alifatik dalam air. Teori yang lain berdasarkan pada paralelisme antara efek garam netral pada *salting out* dan kromatografi interaksi hidrofobik (Von der Haar, 1976 dan Melander and Horvarth, 1977). Menurut Melander dan Horvarth (1977), interaksi hidrofobik dihitung dari kenaikan tegangan permukaan air seiring dengan kenaikan konsentrasi garam yang terlarut di dalamnya. Kromatografi interaksi hidrofobik didasarkan pada gaya Van Der Waals antara protein dan ligan yang terikat fasa diam yang dipengaruhi struktur air pada penambahan garam (Builder, 1993).

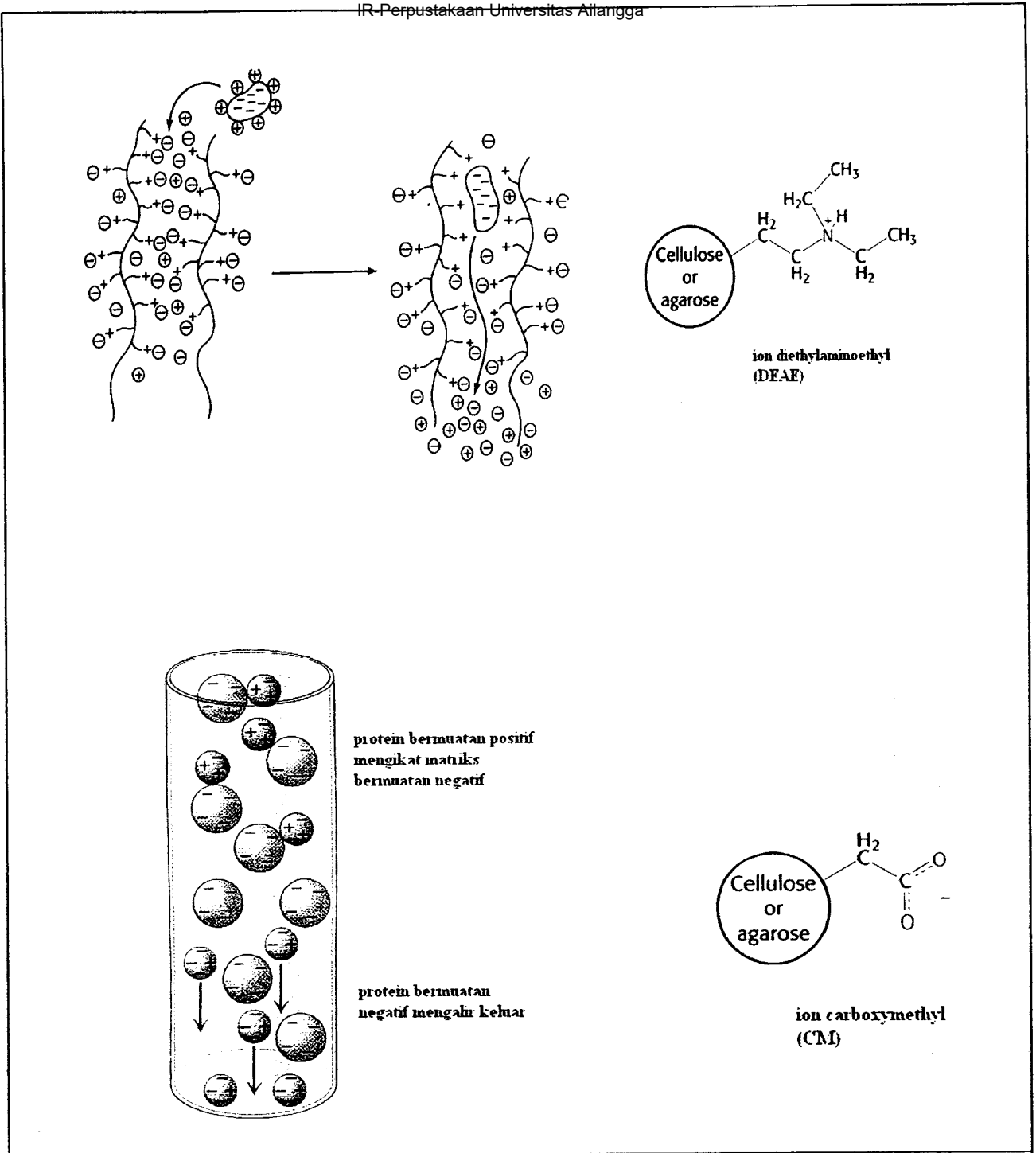
### 2.3.2.2 Kromatografi penukar ion

Kromatografi penukar ion adalah proses pemisahan molekul-molekul ion polar berdasarkan sifat-sifat muatannya. Proses ini dapat digunakan untuk hampir semua jenis muatan molekul meliputi protein-protein berukuran besar, serta nukleotida-nukleotida dan asam-asam amino yang berukuran kecil. Larutan yang diinjeksikan disebut sampel, sedangkan komponen tunggal yang dipisahkan disebut analit. Kromatografi penukar ion sering digunakan dalam pemurnian protein, analisis air, dan kontrol kualitas.

Prinsip kromatografi penukar ion adalah menahan molekul-molekul analit berdasarkan interaksi ionik di dalam kolom. Untuk kromatografi penukar kation bekerja menahan muatan positif (kation) karena fasa diamnya bermuatan negatif.

Berbeda dengan kromatografi penukar anion yang menahan muatan negatif (anion) menggunakan fasa diam bermuatan positif.

Protein memiliki muatan positif maupun negatif pada permukaannya karena pada sisi rantai samping asam-asam amino protein dapat bersifat asam maupun basa, hal ini digunakan sebagai dasar pemisahan protein dengan cara penukar ion. Proses tersebut menggunakan fasa gerak buffer dan fasa diam yang mengandung matriks . Agar pemurnian protein dengan penukar ion berjalan efektif maka fasa gerak buffer harus mampu mengikat baik protein yang bermuatan positif maupun negatif. Matriks yang biasa digunakan sebagai fasa diam yaitu DEAE (*diethylaminoethyl*) dan CM (*carboxymethyl*). DEAE digunakan untuk penukar anion pada pemurnian protein yang bermuatan negatif, sedangkan CM digunakan untuk penukar kation pada pemurnian protein yang bermuatan positif (Gambar 4) (Harris, *et al.*, 1993).



Gambar 4. Ilustrasi penukar ion yang terjadi ketika protein bermuatan negatif diadsorpsi penukar anion (Scopes, 1993) dan protein bermuatan positif diadsorpsi penukar kation (Berg, J.M., *et al*, 2003).

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui:

1. Sifat-sifat enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase yang meliputi penentuan pH optimal dan suhu optimal
2. Memurnikan enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan teknik kromatografi hidrofobik
3. Memurnikan enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan teknik kromatografi penukar ion

#### 3.2. Manfaat Penelitian

Mencari sumber gen ketahanan tanaman terhadap penyakit dari tanaman kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) yaitu gen  $\beta$ -1,3-endoglukanase. Gen tersebut kemudian dapat dikloning di dalam vektor dan dapat disisipkan ke dalam genom tanaman lain agar tanaman yang telah disisipi gen  $\beta$ -1,3-endoglukanase mampu bertahan terhadap serangan jamur patogen.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya selama 10 bulan dimulai pada bulan Maret sampai dengan bulan Desember 2008.

#### 4.2. Bahan Penelitian

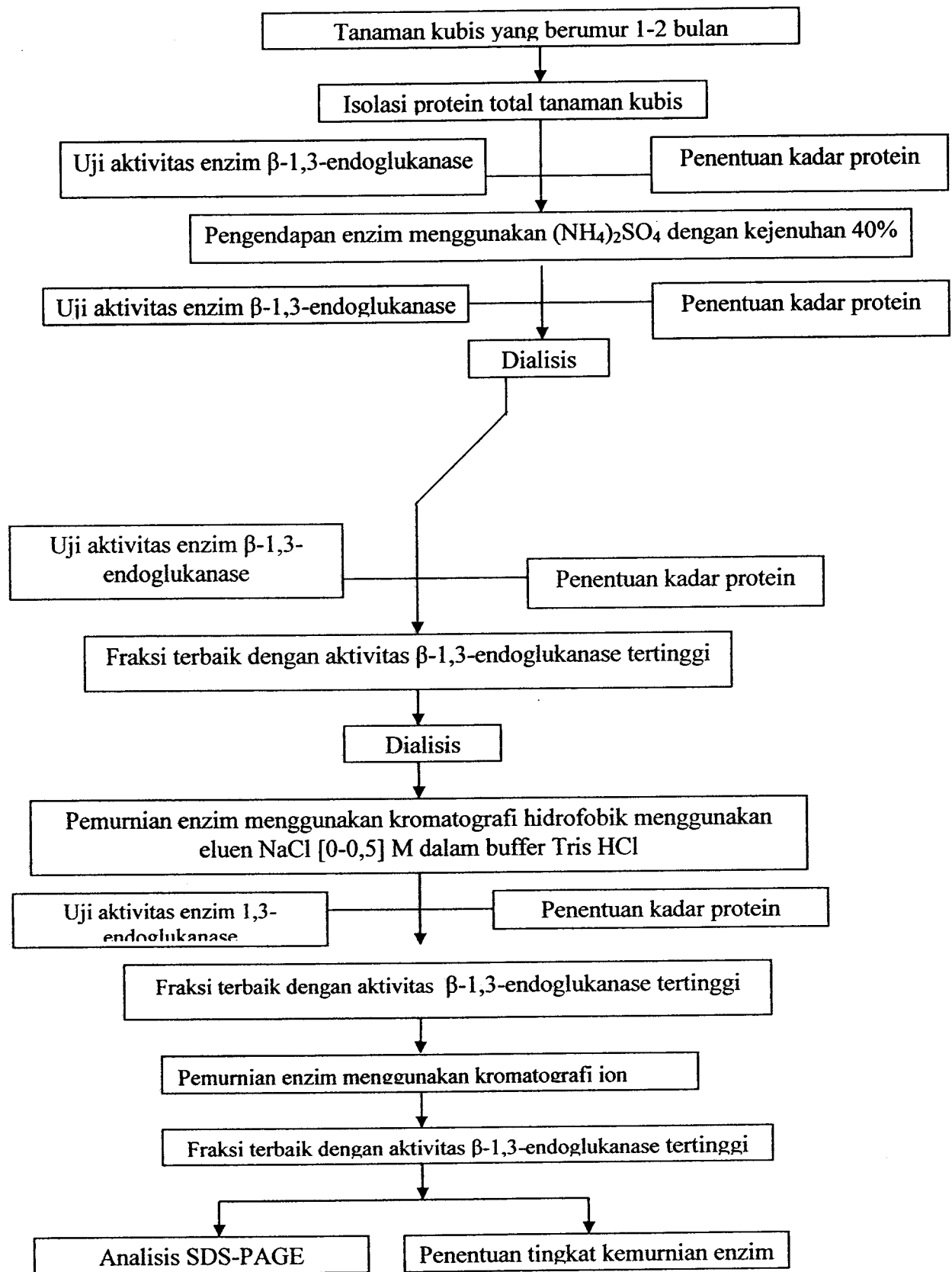
Protein total hasil isolasi daun tanaman kubis hibrida Gloria osena (Tahap I), bahan untuk pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase adalah asam sitrat, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS), *Butyl-toyopearl* 650M, *DEAE-toyopearl* 650M, etanol 96%, asam fosfat 85%, amonium sulfat, natrium klorida, laminarin (SIGMA), dan Marke protein dengan usuran 200 kDa – 15 kDa.

#### 4.3. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: autoclave, lemari pendingin, mikropipet, tabung Eppendorf, tabung konikel 15 ml, paperdisc, pH meter, waterbath, refrigerator centrifuge, petridish, eletroforesis vertikal, timbangan analitik, seperangkat alat Kromatografi interaksi hidrofobik, seperangkat alat Kromatografi penukar ion, dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

#### 4.4. Cara Kerja

##### 4.4.1. Diagram alir penelitian



#### 4.4.2. Isolasi protein total (Modifikasi Vanini *et al.*, 1999)

Tiga sampai enam gram daun tanaman kubis dibekukan (-20°C) selama satu malam, kemudian dihancurkan menggunakan mortar sampai mejadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan diekstrak menggunakan 5 ml 50 mM Tris HCl pH 8,2 dan dimasukkan ke dalam tabung konikel/eppendorf, kemudian di vortex lalu dimasukkan ke dalam freezer (-20°C) selama 1 jam. Ekstrak disentrifuge selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan diambil, kemudian protein yang ada dalam supernatan diendapkan menggunakan ammonium sulfat dengan kejenuhan 40% dengan cara menggoyang larutan selama 30 menit pada suhu 4°C. Protein terjenuhkan dipisahkan dari supernatan menggunakan sntrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet yang mengendap dilarutkan menggunakan akuades steril.

#### 4.4.3. Pengukuran kadar protein total

Pengukuran kadar protein total dilaksanakan mengikuti prosedur *BioRad Protein Assay*. Sebanyak 2 µl sampel protein dimasukkan ke dalam 798 akuades steril kemudian ditambahkan reagen *BioRad Protein Assay* sebanyak 200 µl dan campuran divortex agar homogen. Pengukuran kadar protein didasarkan pada OD<sub>595 nm</sub> sampel menggunakan spektrofotometer dengan kurva standar protein BSA (Lampiran 1)

#### 4.4.4. Uji aktivitas enzim β-1,3-endoglukanase

Untuk menentukan aktivitas enzim β-1,3-glukanase maka sebelumnya dibuat kurva standar glukosa. Larutan standar glukosa dibuat dengan variasi konsentrasi 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5 mg/ml dari stok glukosa 10 mg/l. Masing-

masing larutan standar glukosa diambil sebanyak 1 ml ditambah dengan 1 ml akuades kemudian ditambah 3 ml pereaksi DNS (*3,5-dinitrosalisilic acid*) lalu dikocok kuat. Tabung dimasukkan ke dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Blanko yang digunakan adalah dengan mengganti glukosa dengan akuades sedangkan perlakuannya sama seperti pada glukosa, kemudian absorbansinya dibaca pada  $\lambda = 550 \text{ nm}$ .

Aktivitas enzim glukukanase ditentukan dengan cara mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat laminarin. Sebanyak 100  $\mu\text{l}$  substrat laminarin 1% (SIGMA) ditambah dengan 100  $\mu\text{l}$  enzim sampel (3%) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Hasil inkubasi ditambah 600  $\mu\text{l}$  pereaksi DNS kemudian dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit. Setelah itu segera didinginkan dalam air es selama 20 menit dan dibaca absorbansinya pada  $\lambda = 550 \text{ nm}$ . Kontrol yang digunakan adalah 100  $\mu\text{l}$  enzim sampel, ditambah dengan 100  $\mu\text{l}$  substrat dan 600  $\mu\text{l}$  pereaksi DNS kemudian diperlakukan sama dengan kondisi sebelumnya tetapi tanpa diinkubasi. Satu unit aktivitas  $\beta$ -1,3-endoglukanase menunjukkan 1  $\mu\text{mol}$  xilosa yang dihasilkan per menit untuk setiap mL enzim.

#### 4.4.5. Karakterisasi enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase

Karakterisasi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dilakukan terhadap enzim hasil pengendapan dengan ammonium sulfat dan enzim hasil kromatografi hidrofobitas dan kromatografi penukar ion. Karakterisasi meliputi penentuan pH optimum, suhu optimum, penentuan massa molekul relatif dengan SDS-PAGE

##### A. Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dilakukan pada kisaran pH 4-10 pada suhu 37°C. Larutan buffer yang digunakan adalah 50 mM buffer fosfat-sitrat (pH 4,5 dan 6), buffer fosfat (pH 6,7 dan 8), dan buffer glisin-NaOH (pH 8,9



dan 10). Aktivitas enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase diukur seperti pada prosedur uji aktivitas enzim. Data yang diperoleh dirata-rata dan dibuat grafik hubungan antara tingkat pH dengan aktivitas enzim.

## **B. Penentuan suhu optimum**

Pengujian untuk mengetahui suhu optimum enzim dilakukan dengan menginkubasi enzim dan substrat laminarin 1 mg/l pada berbagai tingkat suhu dengan kisaran antara 10 – 60°C dengan interval 10°C. Data yang diperoleh dirata-rata dan dibuat grafik hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim.

### **4.4.6. Pengendapan enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan amonium sulfat**

Pengendapan  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan amonium sulfat dilakukan dengan cara memasukkan sejumlah amonium sulfat secara perlahan ke dalam 400 mL ekstrak kasar enzim yang telah direndam dalam penangas es sambil diaduk perlahan dengan pengaduk magnetik sampai kadar amonium sulfat mencapai persentase kejenuhan 60%. Tabel kejenuhan amonium sulfat yang digunakan berdasarkan tabel kejenuhan amonium sulfat (Scopes, 1993). Enzim yang mengendap disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm pada suhu 4°C, selama 20 menit. Setelah terbentuk endapan hasil sentrifugasi tadi, endapan enzim tersebut dilarutkan dalam buffer fosfat sitrat pH 7, kemudian didialisis.

### **4.4.7. Pemurnian enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan seperangkat alat kromatografi interaksi hidrofobik**

Pemurnian  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan kromatografi interaksi hidrofobik ini dilakukan dengan cara memasukkan kapas secukupnya ke dalam kolom. Sebanyak 1-2 mL bubuk *Butil toyopearl* dalam etanol 96% dituangkan ke dalam kolom. Etanol

dibiarkan turun hingga batas bubuk, kemudian membilasnya dengan 5 mL akuades. Setelah itu menuangkan NaOH 1 N sebanyak 1 mL ke dalamnya dan membilasnya kembali dengan akuades. Proses berikutnya yaitu menjenuhkan kolom menggunakan 10 mL amonium sulfat jenuh dalam buffer Tris HCl pH 7 ke dalam matriks. Sebanyak 3 mL enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase hasil dialisis dipekatkan kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dialiri eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCl pH 7 (bergradien konsentrasi tinggi ke rendah). Fraksi enzim sebanyak 1 mL ditampung dalam tabung Eppendorf. Fraksi yang memberikan aktivitas 1,3-endoglukanase tertinggi dilanjutkan dengan dialisis (Yuliana, 2007). Rangkaian alat kromatografi interaksi hidrofobik dapat dilihat pada Gambar 5.

Gambar 5. Rangkaian alat kromatografi hidrofobik

#### **4.4.8. Pemurnian enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan seperangkat alat kromatografi penukar ion**

Kromatografi penukar ion memisahkan protein enzim berdasarkan muatannya, di mana tergantung pada komposisi fasa geraknya. Fasa gerak yang digunakan di sini yaitu NaCl [0-0,5] M dalam buffer Tris HCl dengan matriks *DEAE-toyopearl* dalam kolom yang berukuran sama dengan kolom pada kromatografi interaksi hidrofobik.

Dengan membuat variasi pH dan fasa gerak bergradien, maka molekul-molekul protein enzim dapat dipisahkan. Variasi pH fasa gerak tersebut dibuat pada pH 5, 6, dan 7, dengan eluen NaCl [0-0,5 M) dalam buffer Tris HCl yang dibuat bergradien dari konsentrasi rendah ke tinggi.

Cara yang dilakukan yaitu memasukkan kapas secukupnya ke dalam kolom. Sebanyak 1-2 mL bubuk *DEAE-toyopearl* dalam etanol dituangkan ke dalam kolom. Selanjutnya ke dalam matriks ditambahkan 10 mL larutan jenuh buffer Tris HCl. Sebanyak 1-2 mL enzim 1,3-endoglukanase hasil kromatografi interaksi hidrofobik dimasukkan ke dalam kolom. Fraksi enzim dipisahkan dengan mengalirkan eluen NaCl [0 - 0,5] M dalam buffer Tris HCl dibuat bergradien dari konsentrasi rendah ke tinggi ke dalam kolom. Selanjutnya masing-masing fraksi diukur kadar protein dan aktivitasnya. Untuk menentukan kondisi optimum, aktivitas yang diukur adalah pada tiap fraksi dan tiap kondisi dalam kromatografi penukar ion. Rangkaian alat kromatografi penukar ion dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6. Rangkaian alat kromatografi penukar ion

#### 4.4.9. Analisis SDS-PAGE

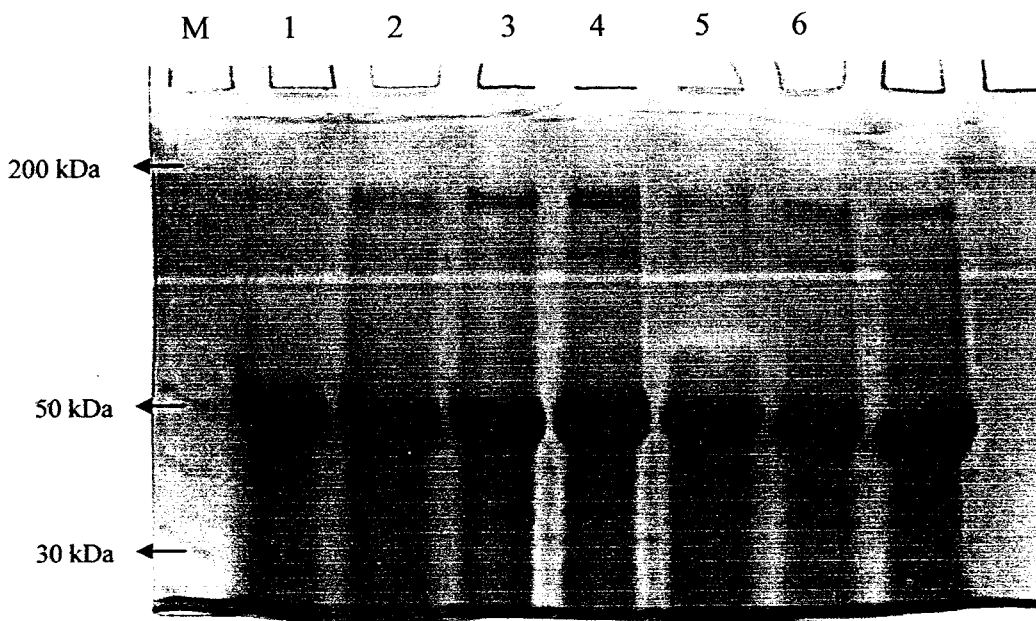
Enzim yang telah dimurnikan, dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE. SDS-PAGE yang digunakan adalah berdasarkan Laemmli (1970) menggunakan marker berat molekul medium range tertentu. Protein enzim divisualisasikan dengan pewarnaan *Coomassie brilliant blue* (Laemmli, 1970).

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Isolasi Protein Total Tanaman Kubis (*Brassica oleracea* cv. *capitata* L.)

Isolasi protein total dari tanaman kubis telah dilakukan pada penelitian tahap I dengan hasil sebagai berikut.



Gambar 7. Profil protein berbagai hibrida tanaman kubis, (1) hibrida K-K Cross, (2) Gloria osena, (3) Ishito, (4) Sinjuku, (5) Rotan osena, (6) Investor, (M) marker

Dari hasil isolasi protei total berbagai hibrida tanaman kubis diperoleh profil protein yang sama, sehingga untuk karakterisasi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase cukup diambil salah satu dari ke-enam hibrida tersebut, yaitu hibrida gloria osena.

#### 5.2. Hasil Optimasi Suhu dan pH Enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase

Sebelum dilakukan pemurnian, terlebih dahulu dicari suhu dan pH optimum untuk bekerjanya enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase. Hasil optimalisasi suhu dan pH dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 berikut.

Tabel 1. Hasil optimasi suhu dari enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase

Kondisi suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	$A_{550}$ (enzim-kontrol)	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
30	0,004	0	0
40	1,465	1,8314	925,98
60	0,340	0,2470	124,78
80	0,811	0,9103	459,98

Tabel 2. Hasil optimasi pH dari enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase

Kondisi pH	$A_{550}$ (enzim-kontrol)	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
4	0,309	0,2034	102,78
5	0,327	0,2287	115,63
6	0,240	0,1062	53,66
7	0,384	0,3089	156,09
8	0,021	0	0
9	0,027	0	0

Dari Tabel 1 dan Tabel 2, diperoleh bahwa suhu optimum untuk bekerjanya enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase adalah  $40^{\circ}\text{C}$  dan pH optimum untuk bekerjanya enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase adalah pada pH 7. Hasil optimasi suhu dan pH ini selanjutnya digunakan untuk kondisi pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase.

### 5.3. Hasil Pengendapan Enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase yang telah dihasilkan masih mengandung protein-protein lain. Untuk memisahkan campuran enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dan protein-protein lain tersebut tidak dapat dilakukan dengan sentrifugasi sehingga digunakan cara pengendapan ekstrak kasar dengan amonium sulfat. Pengendapan enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase ini menggunakan amonium sulfat dengan kejenuhan 40% yaitu berdasarkan hasil optimasi sebelumnya. Proses tersebut

dilakukan dengan menambahkan sedikit demi sedikit amonium sulfat ke dalam larutan enzim dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*. Hal yang perlu diperhatikan saat pengadukan yaitu tidak menimbulkan busa dengan cara menggunakan kecepatan lambat. Pengadukan tersebut menimbulkan kontak antara garam dengan air, sehingga enzim dapat mengendap. Penambahan garam amonium sulfat ke dalam larutan protein menarik molekul air yang pada awalnya melindungi permukaan protein, akibatnya setiap protein mengendap pada kejenuhan amonium sulfat dan terjadi fraksinasi protein. Artinya, amonium sulfat berfungsi menarik air yang terjebak pada daerah hidrofob sehingga memungkinkan terjadinya agregasi dan pengendapan molekul-molekul enzim. Hasil pengendapan amonium sulfat dipisahkan dengan sentrifugasi sehingga diperoleh larutan filtrat dan pelet. Pelet tersebut merupakan enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase target, sedangkan filtratnya merupakan campuran berbagai protein terlarut. Selanjutnya pelet tersebut dilarutkan dalam buffer PC 100 mM pH 7 karena pada kondisi ini enzim dapat larut dan stabil. Aktivitas enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase yang diukur adalah sebesar 0,68 U/mL, sedangkan besarnya kadar protein setelah pengendapan enzim ini adalah 1,98 mg/mL.

#### 5.4. Hasil Dialisis Enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase

Setelah dilakukan pengendapan dengan amonium sulfat, enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dimurnikan dengan cara dialisis. Dialisis juga dilakukan setelah proses kromatografi interaksi hidrofobik, yaitu sebelum proses pemurnian dengan kromatografi penukar ion. Proses ini bertujuan untuk mengeluarkan garam amonium sulfat atau partikel lainnya yang terdapat dalam larutan enzim yang dapat mengganggu aktivitas enzim. Larutan enzim yang berada dalam tabung selofan direndam dengan buffer PC 50 mM pH 7, yaitu kondisi yang sesuai untuk enzim  $\beta$ -

1,3-endoglukanase. Tabung selofan digunakan karena merupakan tabung semipermeabel sehingga amonium sulfat dan protein yang lebih kecil menembus membran sedangkan protein yang ukurannya lebih besar tertinggal di dalam tabung. Dialisis dihentikan setelah tidak ada lagi amonium sulfat yang keluar dari tabung. Hal tersebut dibuktikan saat penggantian buffer setiap 4 jam yaitu 4 jam, 8 jam, 12 jam, dan 24 jam, diambil sedikit larutan buffer PC yang kemudian ditambahkan larutan  $\text{BaCl}_2$ , tetapi jika masih terbentuk endapan putih  $\text{BaSO}_4$  maka dialisis dilanjutkan. Endapan putih ini menandakan proses difusi belum selesai karena masih terdapat amonium sulfat pada larutan enzim.

Setelah dialisis selesai, diperoleh volume enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase sebesar 3 mL dengan aktivitas enzim sebesar 0,234 U/mL. Aktivitas ini mengalami penurunan dari tahap pengendapan dengan amonium sulfat. Jumlah kadar protein yang dihasilkan dari dialisis ini adalah sebesar 3,708  $\mu\text{g/mL}$ .

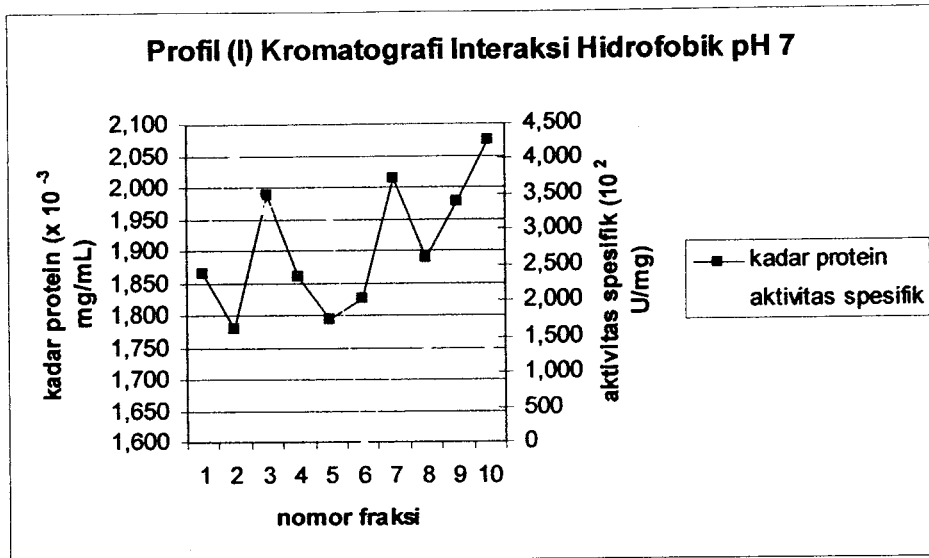
#### **5.5. Hasil Pemurnian Enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan Teknik Kromatografi Hidrofobik**

Pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan teknik kromatografi interaksi hidrofobik pada penelitian ini menggunakan gradien amonium sulfat dengan kejenuhan tinggi ke rendah sebagai eluen yang dialirkan ke dalam kolom berisi enzim dengan matriks *Butyl-toyopearl 650 M* dalam etanol. Eluen tersebut yang digunakan adalah amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCl pH 7 (bergradien konsentrasi tinggi ke rendah), dimana persentase kejenuhan amonium sulfat optimumnya 40% pH 7 yaitu saat enzim memiliki aktivitas tertinggi. Pengadukan buffer dalam amonium sulfat dengan *magnetic stirrer* dilakukan agar terjadi homogenitas aliran gradien. Aliran gradien amonium sulfat kejenuhan tinggi ke rendah (dari buffer Tris HCl pH 7 dialirkan ke Tris HCl pH 7 dalam amonium



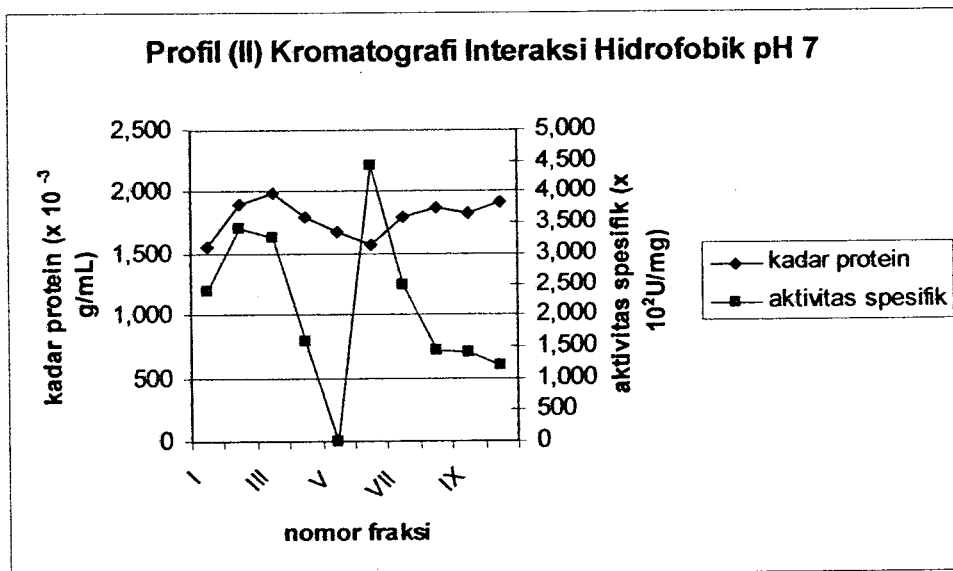
sulfat pada Gambar 5) bertujuan melemahkan interaksi antara enzim dan matriks sehingga enzim dapat terelusi dari kolom. Eluen tersebut dialirkan ke dalam kolom bening berukuran 5 mL yang berisi kapas berlemak, matriks *Butyl toyopearl* 650 M dalam etanol, enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase, serta akuades. Fungsi kapas berlemak tersebut adalah untuk mencegah kebocoran matriks dan mencegah enzim tersangkut pada kapas. Matriks *Butyl-toyopearl* merupakan suatu adsorben hidrofobik untuk protein yang dapat dilarutkan dalam air (Elsevier, 1984). Etanol tersebut berfungsi mencegah kontaminasi saat proses kromatografi berlangsung. Untuk mengaktifkan matriks digunakan NaOH 1 N sebanyak 1 mL., kemudian dibilas dengan akuades 5 mL. Sebelum enzim dimasukkan, kolom dijenuhkan terlebih dahulu dengan eluen agar diperoleh jumlah zat terlarut di dalam larutan tetap. Elusi enzim yang berhasil dilakukan menunjukkan terjadinya interaksi antara residu hidrofobik pada permukaan enzim dengan rantai alifatik atau aromatis dari matriks. Hal ini sesuai dengan prinsip dasar kromatografi hidrofobik. Interaksi tersebut ditingkatkan dengan adanya penambahan garam sehingga molekul air tertarik pada molekul garam sedangkan molekul enzim yang mengandung residu hidrofobik akan lebih mudah berinteraksi dengan residu hidrofobik pada molekul matriks.

Tiga puluh fraksi enzim masing-masing 1 mL ditampung, kemudian diuji aktivitasnya serta diukur kadar proteinnya. Hasil pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase menggunakan kromatografi interaksi hidrofobik menggunakan amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCl pH 7 dapat dilihat pada Gambar 8.



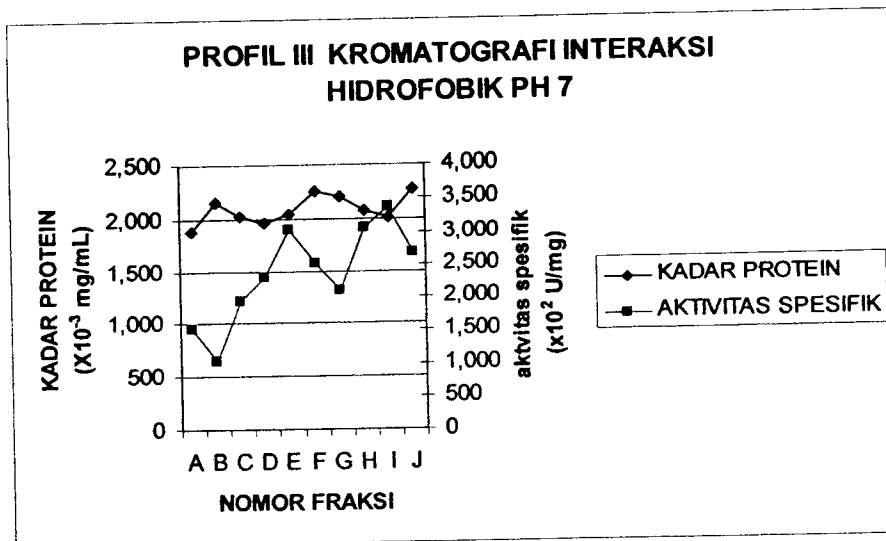
Gambar 8. Kurva kromatografi interaksi hidrofobik (eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCL pH 7) dari fraksi 1-10

Hasil pada Gambar 8 menunjukkan bahwa sebagian besar protein telah terelusi dari kolom pada fraksi ke-1 ( $1,86 \times 10^{-3}$  mg/mL) sampai fraksi ke-10 ( $2,075 \times 10^{-3}$  mg/mL). Aktivitas spesifik enzim dapat dilihat pada sebagian besar fraksi kecuali fraksi ke-6 dan aktivitas spesifik enzim yang tinggi dijumpai pada fraksi ke-2 dan ke-4 yaitu 405,349 U/mg dan 347,831 U/mg (data pada lampiran 1).



Gambar 9. Kurva kromatografi interaksi hidrofobik (eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCL pH 7) dari fraksi I-X

Hasil pada Gambar 9 menunjukkan bahwa sebagian besar protein telah terelusi dari kolom pada fraksi ke-I ( $1,556 \times 10^{-3}$  mg/mL) sampai pada fraksi ke-X ( $1,917 \times 10^{-3}$  mg/mL). Aktivitas spesifik enzim dapat dilihat pada sebagian besar fraksi kecuali fraksi ke-V dan aktivitas spesifik enzim yang tinggi dijumpai pada fraksi ke II dan ke-VI, masing-masing yaitu 341,658 U/mg dan 444,219 U/mg (data pada lampiran 2).

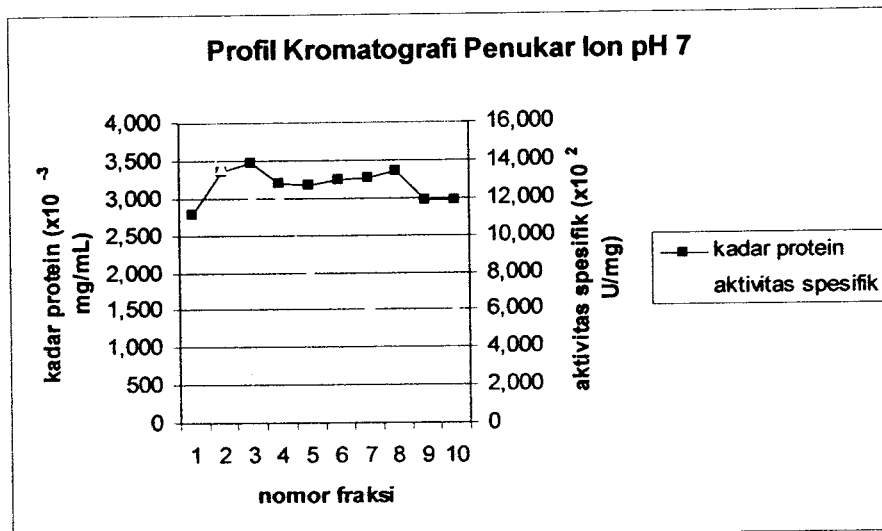


Gambar 10. Kurva kromatografi interaksi hidrofobik (eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCL pH 7) dari fraksi A-J

Hasil pada Gambar 10 menunjukkan bahwa sebagian besar protein telah terelusi dari kolom pada fraksi ke-A ( $1,889 \times 10^{-3}$  mg/mL) sampai pada fraksi ke-I ( $2,271 \times 10^{-3}$  mg/mL). Aktivitas spesifik enzim dapat dilihat pada semua fraksi dan aktivitas spesifik enzim yang tinggi dijumpai pada fraksi ke-H dan I, masing-masing yaitu 305,182 U/mg dan 338,463 U/mg (data pada lampiran 3).

Selanjutnya fraksi-fraksi yang mempunyai aktivitas enzim tinggi, yaitu fraksi ke-2, fraksi ke-4, fraksi ke-II, fraksi ke-VI, fraksi ke-A, dan fraksi ke-J dijadikan satu, kemudian didialisis dan dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi penukar ion.

Ditampung 10 fraksi berisi 1 mL dari campuran ke-enam fraksi hasil kromatografi hidrofobik dengan kondisi pH 7. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 11 di bawah ini.



Gambar 11. Kurva kromatografi penukar ion campuran 6 fraksi hasil kromatografi hidrofobik (pH 7 dan eluen NaCl [0-0,5] M dalam buffer Tris HCl)

Pada Gambar 11, hasil menunjukkan bahwa sebagian besar enzim terelusi pada fraksi ke-1 dengan kadar protein  $2,799 \times 10^{-3}$  mg/mL sampai fraksi ke-10 dengan kadar protein  $2,981 \times 10^{-3}$  mg/mL. Fraksi yang menunjukkan adanya aktivitas spesifik tinggi yaitu fraksi ke-1 (152,38 U/mg), fraksi ke-2 (136,13 U/mg), fraksi ke-3 (120,47 U/mg), dan fraksi ke-4 (120,86 U/mg).

Dari semua data hasil penelitian ini, diperoleh bahwa setelah dilakukan pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dengan kromatografi interaksi hidrofobik dan kromatografi penukar ion maka diperoleh data pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Hasil pemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase

Tahap Pemurnian	Volume (mL)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Kemurnian
Ekstrak kasar	100	68,2	1979,0	0,034	100	1
Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	0,63	1,825	0,345	0,924	10,147
Dialisis	12	2,808	0,044	63,818	4,117	1.877
Kromatografi Interaksi Hidrofobik	9	6,071	0,013	467	8,902	13.735,3
Kromatografi Penukar Ion	6	2,283	0,019	120,158	3,347	3.534,1

Pada Tabel 3 di atas, hasil (%) diperoleh dari aktivitas total masing-masing tahap pemurnian dibagi dengan aktivitas total ekstrak kasar kali 100%, sedangkan kemurnian diperoleh dari aktivitas spesifik masing-masing tahap pemurnian dibagi dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar.

Dari Tabel 3 di atas diketahui bahwa terjadi peningkatan kemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari gabungan 9 fraksi pada kromatografi interaksi hidrofobik sebesar 13.735,3 kali dari ekstrak kasarnya, sedangkan kemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari 6 fraksi pada kromatografi penukar ion sebesar 3.534,1 kali dari ekstrak kasarnya.

Dari data tersebut di atas juga diketahui bahwa terjadi penurunan tingkat kemurnian dari fraksi hasil kromatografi penukar ion. Penyebab penurunan kemurnian ini diduga seiring dengan menurunnya kandungan enzim. Selain itu penurunan tingkat kemurnian juga disebabkan masih terdapatnya kontaminan (protein lain selain protein target). Pemurnian yang baik dinilai dari tingkat kemurnian dan persentase hasil. Tingkat kemurnian yang tinggi dan persentase hasil yang rendah, berarti kandungan proteinnya sedikit (tidak banyak kontaminan). Persentase hasil yang tinggi dengan

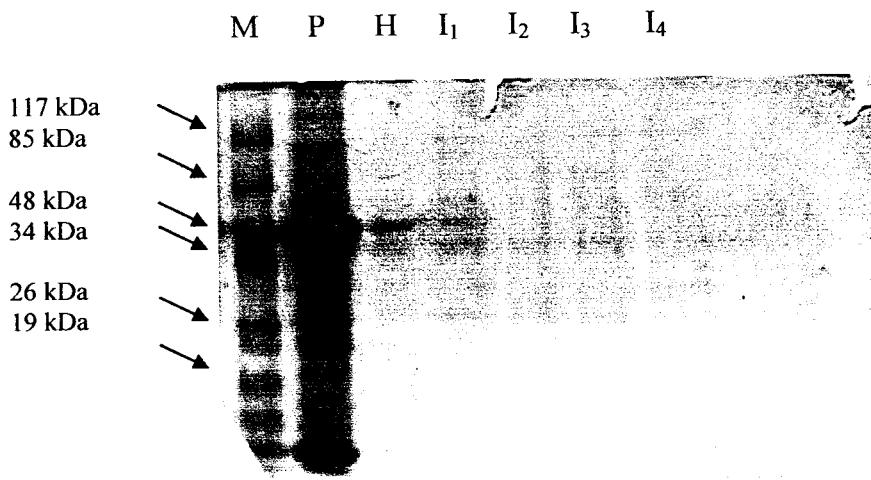
tingkat kemurnian yang rendah berarti masih terdapatnya banyak kontaminan (protein lain selain protein target) (Berg et al., 2003).

### 5.7. Analisis SDS-PAGE Enzim $\beta$ -1,3-endoglukanase Hasil Pemurnian

Analisis dengan SDS-PAGE pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemurnian molekul enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase berdasarkan ukuran dan muatan listrik serta menentukan berat molekulnya (Berg et al., 2003). Hal ini sesuai dengan prinsip bahwa *sodium dodecyl sulfat-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) adalah metode yang murah, reproducible, cepat untuk menentukan secara kuantitatif, membandingkan, serta cepat untuk mengarakterisasi protein (Bollag et al., 1996). Metode ini memisahkan protein terutama berdasarkan berat molekulnya (Laemmli, 1970).

Pada penelitian ini dilakukan SDS-PAGE untuk gabungan fraksi yang mempunyai aktivitas enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase tinggi pada kromatografi interaksi hidrofobik, 4 fraksi yang mempunyai aktifitas enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase pada kromatografi penukar ion dan perolehan protein enzim total. Hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 12.

Dari Gambar 12 diketahui terdapat 8 pita protein pada hasil isolasi protein total dari tanaman kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), 1 pita dari fraksi enzim hasil kromatografi interaksi hidrofobik, sedangkan 4 fraksi enzim (I<sub>1</sub> – I<sub>4</sub>) dari hasil kromatografi penukar ion tidak menunjukkan adanya pita protein. Hal ini diduga karena semakin murni, pita-pita enzim yang muncul juga semakin sedikit. Selain itu intensitas (ketebalan) pita juga semakin rendah.



Gambar 12. Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dari enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase tanaman kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) setelah dilakukan pemurnian.

M: penanda standar protein, P: protein total, H: enzim hasil pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub>: enzim hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion dari fraksi 1-4

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

1. Sifat enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis adalah dapat bekerja secara optimal pada suhu 40°C dan pH 7
2. Kemurnian tertinggi enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase diperoleh dari hasil kromatografi interaksi hidrofobik menggunakan eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCL pH 7 yaitu sebesar 13.735,3 kali lebih besar dari ekstrak kasarnya.
3. Hasil kromatografi penukar ion menggunakan eluen NaCl [0-0,5] M dalam buffer Tris HCl pH 7 menunjukkan tingkat kemurnian enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase sebesar 3.534,1 kali lebih besar dari ekstrak kasarnya.

#### **5.2. Saran**

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk menguji enzim  $\beta$ -1,3-endoglukanase dalam menghambat pertumbuhan jamur, agar dapat digunakan sebagai biofungisida, sehingga dapat menggantikan penggunaan fungisida.



## DAFTAR PUSTAKA

- Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Strayer, 2003. *Biochemistry*, Fifth Edition, United State of America.
- Bollag M.D., D.M. Rozycki, J.S. Edelstein, 1996. *Protein Methods* 2<sup>nd</sup> Edition, New York.
- Builder, E., 1993. *Hydrophobic Interaction Chromatography: Principles and Methods*, Amersham Bioscience, San Fransisco.
- Djatnika, I., 1993. Penyakit-penyakit tanaman kubis dan cara pengendaliannya. Dalam A.H. Permadi & S. Sastrasiswojo (Penyunting). *Kubis*. Kerjasama Balithort Lembang dengan Program Nasional PHT Bappenas.
- Harris E.L.V and Angal S., 1993. *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.
- Heftmann, E., 1992. *Chromatography*, 5<sup>th</sup> Edition. USA.
- Ingham, J., 1973. Concept of pre-infectional and post-infectional resistance. *Phytopathology* Z 78, 314.
- Keen, N.T. 1981 Evaluation of the role of phytoalexin. In RC Staple, ed, *Plant Disease Control*. John Wiley & Sons, New York.
- Keen, N.T. and Yoshikawa, N. 1983.  $\beta$ -1,3-endoglucanase from soybean release elicitor-active carbohydrate from fungus cell walls. *Plant Physiol.* 71:460-465.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka N. and Yoshikawa, M. 1995. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell wall by plant  $\beta$ -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.* 109:839-845.
- Peumans, W.J., A. Barre, V. Derycke, P.Rouge, W. Zhang, G.D. May, J.A. delcour, F. van Leuven dan J.M. van Damme, 2000. Purification, characterization and structural analysis of an abundant  $\beta$ -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur. J. Biochem*, 267:1188-1195.
- Salzer, P., B. Hubner, A. Sirrenberg, dan A. Hager, 1997. Differential effect of purified in spruce roots infected with a pathogenic *Phytium* sp. Isolate include chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Phys. Mol. Plant Pahology*, 43:57-67.
- Selitennikoff, C.P., 2001. Antifungal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2883-2894.

Scope, R., 1987. *Protein Purification : Principles and Practice*, Spinger-Verlag, New York.

Scope, R., 1993. *Protein Purification : Principles and Practice*, Spinger-Verlag, New York.

Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Tanaka, K., Shibata, D., Horino, O. 1990. Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiol.* 93:673-682.

Yoshikawa, M., Keen, N.T. and Wang, M.C. 1983. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phitoalexin accumulation. *Plant Physiol.* 73:49-52.

Yoshikawa, M., Tsuda, M. and Takeuchi, Y. 1993. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80: 417-420.

**Lampiran 1. Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi 1-10 (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)**

**1a. Nilai absorbansi dan kadar protein (Metode *BioRad Protein Assay*)**

Nomor Fraksi	A <sub>595</sub>	Kadar Protein (x 10 <sup>-3</sup> mg/mL)
1	0,1547	1,8656
2	0,1469	1,7797
3	0,1660	1,9901
4	0,1541	1,8590
5	0,1481	1,7929
6	0,1511	1,8259
7	0,1683	2,0154
8	0,1569	1,8899
9	0,1647	1,9758
10	0,1737	2,0749

**1b. Nilai absorbansi dan aktivitas enzim (Metode DNS)**

Nomor Fraksi	Absorbansi sampel (A <sub>550</sub> )	Absorbansi kontrol (B <sub>550</sub> )	Absorbansi enzim (A-B) <sub>550</sub>	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1	0,9440	0,5103	0,4337	0,5251	282,920
2	0,9701	0,2875	0,6826	0,7214	405,349
3	0,9331	0,3285	0,6046	0,6599	331,591
4	0,9423	0,3409	0,6014	0,6574	347,831
5	0,7429	0,2596	0,4833	0,5642	314,686
6	0,1820	0,2360	-0,0540	0	0
7	0,1854	0,1400	0,0454	0,2187	108,514
8	0,1848	0,0957	0,0891	0,2532	133,975
9	0,2014	0,0729	0,1285	0,2843	143,891
10	0,2501	0,1230	0,1271	0,2832	136,489

**Lampiran 2. Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi I-X (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)**

**2a. Nilai absorbansi dan kadar protein (Metode *BioRad Protein Assay*)**

Nomor Fraksi	A <sub>595</sub>	Kadar Protein
I	0,1266	1,5562
II	0,1580	1,9019
III	0,1658	1,9879
IV	0,1478	1,7896
V	0,1378	1,6796
VI	0,1283	1,5749
VII	0,1486	1,7989
VIII	0,1550	1,8689
IX	0,1506	1,8205
X	0,1594	1,9174

**2b. Nilai absorbansi dan aktivitas enzim (Metode DNS)**

Nomor Fraksi	Absorbansi sampel (A <sub>550</sub> )	Absorbansi kontrol (B <sub>550</sub> )	Absorbansi enzim (A-B) <sub>550</sub>	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
I	0,3210	0,0823	0,2387	0,3712	238,529
II	0,7750	0,1832	0,5918	0,6498	341,658
III	0,8862	0,2977	0,5885	0,6472	325,569
IV	0,4410	0,3134	0,1276	0,2836	158,471
V	0,1750	0,2587	-0,0837	0	0
VI	0,9564	0,3015	0,6549	0,6996	444,219
VII	0,4200	0,0880	0,3320	0,4448	247,317
VIII	0,2560	0,1495	0,1065	0,2669	142,811
IX	0,2260	0,1331	0,0929	0,2562	140,731
X	0,1796	0,1177	0,0619	0,2317	120,841

**Lampiran 3. Hasil Elusi Kromatografi Interaksi Hidrofobik Fraksi A-J (Eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 50% dalam buffer Tris HCl pH 7)**

**3a. Nilai absorbansi dan kadar protein (Metode *BioRad Protein Assay*)**

Nomor Fraksi	A <sub>595</sub>	Kadar Protein
A	0,1569	1,8899
B	0,1809	2,1542
C	0,1692	2,0253
D	0,1643	1,9714
E	0,1704	2,0385
F	0,1897	2,2511
G	0,1852	2,2015
H	0,1742	2,0804
I	0,1688	2,0209
J	0,1915	2,2709

**3b. Nilai absorbansi dan aktivitas enzim (Metode DNS)**

Nomor Fraksi	Absorbansi sampel (A <sub>550</sub> )	Absorbansi kontrol (B <sub>550</sub> )	Absorbansi enzim (A-B) <sub>550</sub>	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
A	0,2418	0,1050	0,1368	0,2908	153,871
B	0,1985	0,1471	0,0514	0,2234	103,704
C	0,3633	0,0938	0,2695	0,3955	195,279
D	0,4928	0,1443	0,3485	0,4578	232,221
E	0,6716	0,1157	0,5559	0,6215	304,881
F	0,6296	0,1411	0,4885	0,5683	252,454
G	0,5697	0,2163	0,3534	0,4617	209,721
H	0,6849	0,1119	0,5730	0,6349	305,182
I	0,7524	0,1172	0,6352	0,6840	338,463
J	0,6785	0,1400	0,5385	0,6077	267,603

**Lampiran 4. Hasil Elusi Kromatografi Penukar Ion (pH 7, eluen NaCl [0-0,5] M dalam buffer Tris HCl)**

**4a. Nilai absorbansi dan kadar protein (Metode *BioRad Protein Assay*)**

Nomor Fraksi	A <sub>595</sub>	Kadar Protein
1	0,2395	2,7996
2	0,2900	3,3557
3	0,3005	3,4714
4	0,2756	3,1971
5	0,2739	3,1784
6	0,2797	3,2423
7	0,2817	3,2643
8	0,2897	3,3524
9	0,2555	2,9757
10	0,2560	2,9813

**4b. Nilai absorbansi dan aktivitas enzim (Metode DNS)**

Nomor Fraksi	Absorbansi sampel (A <sub>550</sub> )	Absorbansi kontrol (B <sub>550</sub> )	Absorbansi enzim (A-B) <sub>550</sub>	Aktivitas (U/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)
1	0,6329	0,2639	0,3690	0,4266	152,378
2	0,7092	0,2977	0,4115	0,4568	136,127
3	0,6227	0,2656	0,3571	0,4182	120,470
4	0,6089	0,2966	0,3123	0,3864	120,859
5	0,4028	0,2726	0,1302	0,2570	80,851
6	0,3030	0,2400	0,0630	0,2093	64,553
7	0,7977	0,2382	0,0596	0,2068	63,352
8	0,3155	0,1965	0,1234	0,2522	75,229
9	0,2832	0,2311	0,0521	0,2016	67,749
10	0,2721	0,2516	0,0205	0,1792	60,108