

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Enzim Asparaginase dari Asparagus

Isolasi enzim asparaginase dari *Asparagus officinalis* dilakukan melalui beberapa tahap yaitu ekstraksi, sentrifugasi, fraksinasi bertingkat dengan menggunakan amonium sulfat, dan dialisis. Ekstraksi dilakukan secara mekanik yaitu dengan pemblenderan menggunakan larutan buffer Tris, yang bertujuan untuk menghancurkan dinding sel atau membran sel sehingga diharapkan enzim yang terkandung dalam asparagus dapat dikeluarkan dari dalam sel. Selanjutnya homogenat disaring dengan kain untuk memisahkan partikel-partikel besar. Supernatan kemudian disentrifuse pada 3400 rpm selama 16 menit untuk memisahkan enzim asparaginase dengan partikel lainnya berdasarkan perbedaan sifat dan ukuran partikel. Endapan yang diperoleh merupakan enzim kasar atau ekstrak enzim dan kemudian diuji aktivitasnya.

Ekstrak enzim kemudian dimurnikan dengan pengendapan secara bertingkat menggunakan garam amonium sulfat dengan kejenuhan tertentu yaitu tingkat kejenuhan F1(0-20 %), F2 (20-40 %), F3 (40-60 %), F4 (60-80 %), dan F5 (80-100%). Secara umum prinsip pemurnian enzim tidak jauh berbeda dengan pemurnian protein, karena enzim mengandung protein. Tujuan pengendapan bertingkat adalah untuk memisahkan makromolekul (yang tersusun atas asam-asam amino) secara bertingkat yaitu dengan mengelompokkannya berdasarkan ukuran partikel, berat molekul, dan

muatannya, karena pada dasarnya setiap protein mempunyai kejenuhan tertentu terhadap konsentrasi garam yang ditambahkan (*salting out*). Pada proses ini terjadi kompetisi antara molekul-molekul protein dan ion-ion garam dalam molekul air, karena ion-ion garam lebih polar bila dibandingkan dengan protein sehingga lebih banyak menarik air, dengan sendirinya kelarutan protein berkurang sehingga terjadi pengendapan.

Untuk menghilangkan molekul-molekul garam amonium sulfat dalam protein enzim dilakukan dialisis. Prinsip dialisis ini adalah memisahkan partikel-partikel besar dari partikel-partikel kecil dengan menggunakan selofan sebagai membran semi permeabel atas dasar proses difusi, karena ada perbedaan konsentrasi larutan di dalam atau di luar membran. Ion-ion garam (NH_4^+ , SO_4^{2-}) yang memiliki ukuran lebih kecil dapat keluar dari membran, sedangkan molekul protein (enzim) yang memiliki ukuran lebih besar akan tertahan di dalam membran. Selama proses dialisis ini temperatur dari larutan di dalam dan diluar kantong dialisis dijaga tetap rendah, agar enzim tidak terdenaturasi. Proses dialisis diakhiri dengan menguji larutan dialisat yang dipakai untuk dialisis dengan BaCl_2 hingga tidak terbentuk lagi endapan putih BaSO_4 . Hasilnya akan diperoleh larutan enzim yang sudah terbebas dari garam amonium sulfat, kemudian tiap-tiap fraksi diuji aktivitas spesifiknya.

4.2. Penentuan Uji Aktivitas Spesifik Enzim Asparaginase

Pada setiap tahap isolasi enzim dilakukan uji aktivitas spesifik agar kita dapat mengikuti penambahan atau pengurangan aktivitas enzim, dan dapat mengetahui tingkat kemurnian enzim. Uji aktivitas enzim asparaginase dilakukan

dengan substrat asparagin dan standar amonium sulfat. Prinsip dasar penetapan aktivitas asparaginase adalah adanya asparaginase yang menguraikan asparagin sebagai substratnya menjadi amonia dan asam aspartat, amonia yang terbentuk dianalisa dengan reagen Nessler akan menghasilkan larutan kuning kecoklatan yang selanjutnya ditentukan serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis dan ini menjadi dasar penentuan aktivitas enzim asparaginase. Sehingga satu unit aktivitas enzim asparaginase didefinisikan sebagai aktivitas enzim asparaginase yang menyebabkan terbentuknya 1 μ mol amonia per satuan waktu inkubasi pada kondisi optimum. Asparaginase mengkatalisis reaksi hidrolisis:



Sedangkan analisa kadar protein menggunakan metode Lowry yang akan menghasilkan warna biru. Warna biru ini disebabkan adanya reaksi kompleksasi antara ion Cu^{2+} dan nitrogen dari rantai peptida dalam suasana alkalis.

Tabel IV. 1. Aktivitas Spesifik Enzim Asparaginase pada Berbagai Fraksi

No	Fraksi	Unit Aktivitas (U. mL ⁻¹)	Kadar Protein (mg. mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U. mg protein ⁻¹)	Tingkat Kemurnian
1	EK	6,5684	23,2909	0,2820	1
2	F1	10,1839	4,6010	2,2134	8
3	F2	19,4706	1,4420	13,5024	48
4	F3	11,8466	1,1740	10,1253	36
5	F4	4,8090	0,2550	18,8588	67
6	F5	7,7413	0,2760	28,0483	100

Dari hasil penelitian pada Tabel IV.1 menunjukkan bahwa fraksi yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi adalah F5 (kejenuhan 80-100%) sebesar 28,0483 U. mg protein⁻¹. Aktivitas spesifik tertinggi ini menunjukkan bahwa derajat kemurnian enzim pada F5 relatif lebih tinggi dibandingkan fraksi-fraksi yang lain. Fraksi-fraksi selain F5 memiliki aktivitas lebih kecil disebabkan karena banyaknya protein enzim non enzim asparaginase yang masih ikut terendapkan bersama enzim asparaginase pada fraksi-fraksi tersebut.

4.3. Karakterisasi Enzim Asparaginase

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum reaksi enzimatik enzim asparaginase hasil isolasi. Dalam penelitian ini karakterisasi dilakukan untuk mengetahui pH, temperatur, dan waktu inkubasi optimum. Fraksi yang digunakan pada karakterisasi ini adalah F5 yang memiliki aktivitas spesifik yang paling tinggi atau memiliki tingkat kemurnian yang paling tinggi sebesar 100 kali.

4.3.1. Penentuan pH optimum

Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh perubahan pH lingkungan. Karena perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat (ES).

Tabel IV. 2. Aktivitas Spesifik Enzim Fraksi 5 pada berbagai variasi pH

No	pH	Unit Aktivitas (U. mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U. mg protein ⁻¹)
1	7,0	0,7038	2,5498
2	7,5	7,1549	25,9234
3	8,0	12,1398	43,9848
4	8,4	11,5533	41,8599
5	8,5	8,9143	32,2980
6	8,6	7,7413	28,0483
7	9,0	5,3955	19,5488

Kadar protein F5: 0,276 mg. mL⁻¹

Terlihat dalam tabel IV. 2. bahwa pada pH 8,0 enzim asparaginase dari asparagus mempunyai aktivitas spesifik tertinggi sebesar 43,9848 U. mg protein⁻¹. Sementara pada pH 7,0 mempunyai aktivitas spesifik sebesar 2,5498 U. mg protein⁻¹ dan pada pH 9,0 mempunyai aktivitas spesifik sebesar 19,5488 U. mg protein⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa pada pH yang lebih rendah dari kisaran pH optimum akan menyebabkan sisi aktif enzim terprotonasi, sedangkan pada pH yang lebih tinggi dari kisaran pH optimum menyebabkan deprotonasi. Karena terjadi protonasi dan deprotonasi menyebabkan struktur molekul tersier enzim berubah sehingga sisi aktif enzim berubah. Hal ini menyebabkan efektivitas sisi aktif enzim berkurang dan aktivitasnya menurun.

4.3.2. Penentuan Temperatur Optimum

Kecepatan reaksi enzim selain dipengaruhi oleh pH, juga dipengaruhi oleh temperatur. Berdasarkan hasil penelitian ternyata enzim asparaginase dari asparagus mempunyai temperatur optimum 37 °C.

Tabel IV. 3. Aktivitas Spesifik Enzim Fraksi 5 pada berbagai variasi temperatur

No	Temperatur (°C)	Unit Aktivitas (U. mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U. mg protein ⁻¹)
1	33	2,4631	8,9244
2	35	8,3278	30,1732
3	37	12,1398	43,9848
4	39	7,7413	28,0483
5	41	1,5835	5,7371

Kadar protein F5: 0,276 mg. mL⁻¹

Terlihat dalam tabel IV. 3. bahwa pada temperatur 37 °C enzim asparaginase dari asparagus mempunyai aktivitas spesifik sebesar 43,9848 U.mg protein⁻¹. Sementara pada temperatur 33 °C aktivitas spesifiknya sebesar 8,9244 U.mg protein⁻¹ sedangkan pada temperatur 41 °C aktivitas spesifiknya sebesar 5,7371 U.mg protein⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa pada temperatur yang lebih rendah dari kisaran temperatur optimum aktivitas spesifik enzim kecil karena energi aktivasi yang diperlukan oleh setiap enzim untuk membentuk kompleks enzim-substrat belum tercapai, dan ikatan molekul reaktan belum putus, sehingga produk yang terbentuk sedikit. Sedangkan pada temperatur yang lebih tinggi dari kisaran temperatur optimum terjadi proses denaturasi karena putusanya ikatan-ikatan kimia pada enzim sehingga sisi aktif enzim akan berubah dan konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang hingga kecepatan reaksi berkurang.

4.3.3. Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi adalah waktu kontak antara enzim dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat (ES) yang pada akhirnya membentuk produk

dan enzim kembali. Penentuan waktu inkubasi dilaksanakan pada pH optimum 8,0 dan temperatur optimum 37 °C

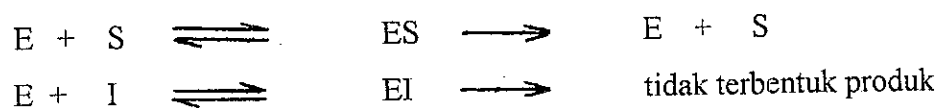
Tabel IV. 4. Aktivitas Spesifik Enzim Fraksi 5 pada berbagai variasi Waktu Inkubasi

No	Waktu (menit)	Unit Aktivitas (U. mL ⁻¹)	Aktivitas Spesifik (U. mg protein ⁻¹)
1	26	2,5037	9,0715
2	28	4,5241	16,3919
3	30	12,1398	43,9848
4	32	5,6081	20,3191
5	34	4,7607	17,2489

Kadar protein F5: 0,276 mg. mL⁻¹

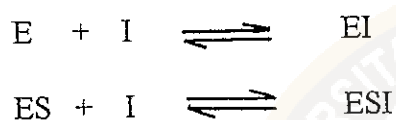
Terlihat dalam tabel IV. 4. bahwa pada waktu inkubasi 30 menit enzim asparaginase mempunyai aktivitas spesifik tertinggi yaitu 43,9848 U. mg protein⁻¹. Sementara pada waktu inkubasi 26 menit aktivitas spesifiknya sebesar 9,0715 U. mg protein⁻¹, sedangkan pada waktu inkubasi 34 menit aktivitas spesifiknya sebesar 17,2489 U. mg protein⁻¹. Hal ini menunjukkan bahwa waktu inkubasi di bawah kisaran waktu inkubasi optimum menunjukkan aktivitas yang rendah, disebabkan belum semua sisi aktif enzim berikatan dengan substrat sehingga aktivitasnya belum optimum. Sedangkan pada waktu inkubasi di atas kisaran waktu inkubasi optimum menunjukkan penurunan aktivitas, kemungkinan karena adanya inhibitor yang menghambat pembentukan produk. Cara penghambatan pembentukan produk ada dua yaitu pertama, penghambatan yang terjadi karena adanya molekul yang mirip dengan substrat, dan membentuk kompleks enzim-inhibitor (EI), dengan demikian kompleks enzim-substrat tidak terbentuk, sehingga produkpun tidak terbentuk.

Mekanisme reaksinya sebagai berikut:



Yang kedua penghambatan yang terjadi karena adanya penggabungan inhibitor dengan enzim di luar bagian aktif yang menghasilkan kompleks EI atau adanya penggabungan dengan kompleks ES yang menghasilkan kompleks ESI, di mana kompleks EI maupun kompleks ESI bersifat inaktif sehingga tidak dapat membentuk produk.

Mekanisme reaksinya sebagai berikut:



Keterangan:

E = Enzim

I = Inhibitor

ES = Kompleks enzim-substrat

EI = Kompleks enzim-inhibitor

ESI = Kompleks enzim-substrat-inhibitor