BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Petai (*Parkia speciosa* Hassk)

Petai (*Parkia speciosa* Hassk), termasuk suku *Mimosaceae*, berasal dari Malaysia. Tanaman ini berbentuk pohon, tingginya mencapai 5-25 m dan bercabang banyak. Kulit batang berwarna coklat kemerah-merahan[6]. Daunnya menyirip ganda, bunganya berbentuk bonggol yang kemudian tumbuh buah berbentuk polong. Petai dibudidayakan untuk dipungut buahnya. Nilai ekonomisnya cukup tinggi. Buah dapat dimakan mentah atau dilalap, atau untuk penyedap masakan[7].

2.2. Benalu Petai

Menurut catatan dalam buku *Journal of the Asiatic Society of Bengal vol. LVI part 2 (1887)* dijelaskan bahwa sebelum tahun 1887 telah ditemukan tumbuhan benalu di Indonesia. Di daerah tropis, benalu hidup di dataran rendah dan dataran tinggi.

Di dalam ilmu botani, klasifikasi tumbuhan benalu adalah sebagai berikut :

Divisio	: *Spermatophyta*
Subdivisio	: *Angiospermae*
Kelas	: *Dicotyledonae*
Famili	: *Loranthaceae*
Genus antara lain	: *Amynema, Barathranthus, Dicymanthes, Dendrophthoe, Elytranthe, Ginalloa, Helixanthera, Korthalsella, Lepeostegeres, Loxanthera, Macrosolen, Notothixos, Scurrula, Viscum.*

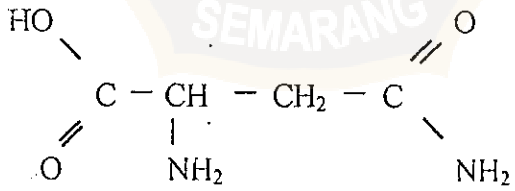
This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Tanaman petai di lapangan ada yang terganggu oleh benalu, seperti *Dendrophthoe* dan *Scurrula*. Benalu dapat tumbuh subur dan rimbun karena terdukung oleh lunaknya kayu dan suburnya tanaman petai. Tumbuhan parasit ini biasanya hinggap menahun dan akhirnya mengakibatkan kematian cabang atau ranting tanaman petai.

Penggunaan benalu sebagai obat banyak ditujukan untuk penyakit tumor atau kanker. Dari hasil pengujian terhadap larutan daun segarnya menunjukkan bahwa pada tumbuhan benalu terdapat kandungan asam amino arginin, asparagin, prolin, sistin, dan hidroksilisin[7].

2.3. Asparagin

Asparagin adalah salah satu asam amino non esensial yaitu asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh dan tubuh sendiri dapat mensintesisnya dari asam aspartat dengan menggunakan enzim sintetase asparagin sehingga tidak memerlukan asparagin dari luar. Rumus kimia L-asparagin disajikan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Rumus Kimia L-Asparagin

Pada manusia asam amino non esensial ini dapat disintesis dalam jumlah yang cukup untuk menjamin pertumbuhan yang optimum pada anak-anak dan mempertahankan keseimbangan nitrogen pada orang dewasa. Bila enzim yang diperlukan untuk biosintesis salah satu dari asam-asam amino ini mengalami cacat,

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

asam amino yang bersangkutan tidak dapat disintesis dan dengan demikian menjadi asam amino yang esensial. Umumnya biosintesis asam-asam amino non esensial ini diatur oleh tersedia atau tidaknya asam amino tersebut dalam makanan[8].

Asparagin dapat ditemukan dalam beberapa jaringan tetapi dalam jumlah yang kecil terdapat pada sel kanker. Tetapi bila L-asparagin dalam sel kanker berlebih atau abnormal maka akan dimanfaatkan oleh sel kanker ini sebagai makanan, sehingga sel ini berkembang semakin cepat dan membahayakan.

2.4. Asparaginase

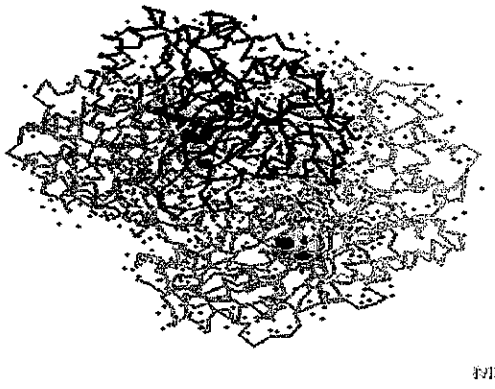
Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi-reaksi kimia pada sistem biologi. Enzim merupakan molekul beragam yang dihasilkan sel hidup. Keragaman ini tidak hanya dalam bentuk dan ukurannya, tetapi juga di dalam peranannya pada setiap reaksi biokimia. Tanpa enzim, maka reaksi seluler berlangsung sangat lambat, bahkan mungkin tidak terjadi reaksi [9].

Asparaginase merupakan enzim yang dapat digunakan untuk melawan kanker, yang bekerja dengan menghambat sintesis protein sel kanker. Asparaginase disebut juga aminohidrolase asparagin, colasplase, asnase, kidrolase, leocogen, leunase, elspar, crastinin, E. C. 3. 5. 1. 1., MK-965, dan NSC-109229[10].

L-asparaginase termasuk enzim hidrolase yang bekerja mengkatalisis reaksi hidrolisis asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia. Enzim tersebut mempunyai berat molekul 133.000, aktif pada pH 5 sampai 9, larut dalam air tetapi tidak larut dalam metanol, aseton, dan kloroform[10].

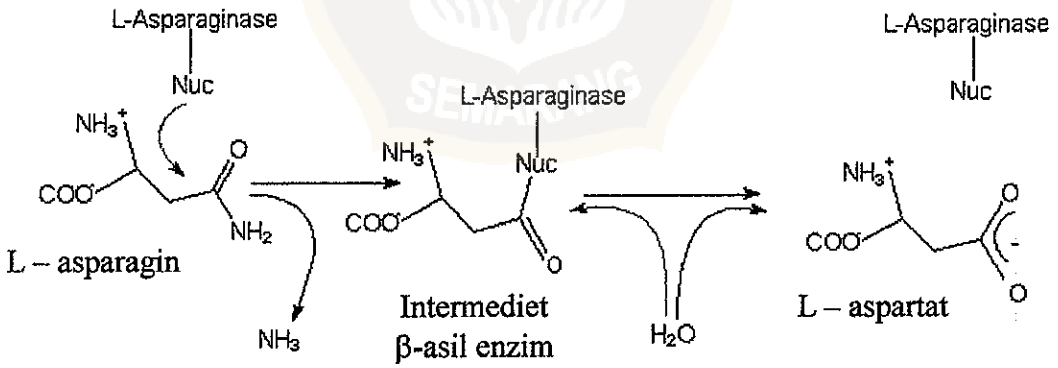
This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

L-asparaginase memiliki struktur tetrametrik dengan 4 monomer atau 4 subunit dengan dua asam amino treonin sebagai penyumbang gugus nukleofil (OH^-) utama pada sisi aktifnya. Struktur kristal L-asparaginase disajikan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur Kristal L-Asparaginase

Mekanisme reaksi hidrolisis L-asparagin oleh L-asparaginase menjadi asam L-aspartat dan amonia ditunjukkan pada persamaan reaksi 2.1.



Persamaan Reaksi 2.1. Mekanisme Reaksi Hidrolisis L-Asparagin menjadi L-Aspartat dan NH_3 oleh L-Asparaginase

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

2.5. Isolasi dan Pemurnian Enzim

Enzim adalah protein terlarut[11]. Untuk mengeluarkan enzim dari sumbernya perlu dilakukan isolasi, karena enzim yang terpisah dari sumbernya manfaatnya lebih besar dalam bidang industri maupun kesehatan. Isolasi enzim dapat dilakukan dengan cara ekstraksi dan menggunakan metode sentrifugasi.

Ekstraksi enzim dari tumbuhan ditentukan oleh tipe sumbernya. Enzim yang terdapat pada tepung biji-bijian diekstraksi dengan cara mencampur pada media cair kemudian diaduk; enzim dari bagian tanaman yang bersifat lunak diekstraksi dengan dipotong kecil-kecil, dipres, kemudian disaring dengan kain; sedangkan untuk mengekstrak enzim dari daun dan biji-bijian dengan cara digiling, dihomogenisasi dalam media cair atau langsung diblender dengan media cair. Dalam ekstraksi enzim dari tanaman digunakan bufer untuk mempertahankan harga pH. Beberapa bufer yang dapat digunakan misalnya bufer Tris-hidroksimetil aminometan, glisin, dan fosfat[12].

Metode sentrifugasi merupakan cara pemisahan enzim dari partikel-partikel lain yang tidak dikehendaki berdasarkan ukuran partikel. Semakin kecil partikel, kecepatan sentrifugasi yang diperlukan semakin besar[11].

Pemurnian enzim dapat dilakukan melalui beberapa cara seperti dengan pelarut organik, gel filtrasi atau menggunakan garam.[13]. Fraksinasi dengan garam berdasarkan pada sifat-sifat garam seperti kelarutan dan keefektifannya dalam mengendapkan protein. Garam-garam yang sangat efektif adalah garam-garam yang mengandung anion bermuatan banyak seperti sulfat, fosfat, dan sitrat. Garam yang paling sering digunakan adalah garam amonium sulfat[12].

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Amonium sulfat yang terlarut setelah proses fraksinasi dipisahkan dengan cara dialisis. Prinsip dialisis adalah pemisahan partikel protein yang bermolekul besar dengan partikel amonium sulfat dengan berat molekul kecil melalui membran semipermeabel atas dasar sifat difusi karena perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar membran.

2.6. Penentuan Aktivitas Asparaginase

Setiap hasil isolasi perlu disertai dengan uji aktivitas dan penentuan protein agar dapat mengikuti penambahan atau ;urangan aktivitas dan aktivitas spesifik asparaginase. Prinsip penentuan aktivitas asparaginase adalah penguraian asparagin menjadi asam aspartat dan amonia oleh asparaginase. Selanjutnya jumlah amonia yang terbentuk menunjukkan besarnya aktivitas asparaginase[11].

Pereaksi Nessler spesifik untuk penetapan kadar amonia, pada akhir reaksi terbentuk warna coklat kekuningan. Selanjutnya warna yang terbentuk dibaca absorbansinya pada panjang gelombang optimum sesuai dengan perjanjian internasional. Unit aktivitas asparaginase dapat didefinisikan sebagai banyaknya µmol produk amonia yang terbentuk dari substrat asparagin persatuan waktu pada kondisi optimum sistem tersebut. Karena yang terbentuk adalah amonia maka banyaknya µmol amonia yang terbentuk dihitung menggunakan metode Nessler berdasarkan kurva standar larutan amonium sulfat[8].

2.7. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry[15]

Kadar protein harus diketahui untuk menentukan aktivitas spesifik enzim per mg protein. Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan metode Lowry berdasarkan kurva standar larutan BSA

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

Prinsip metode Lowry dalam penentuan kadar protein adalah reaksi pembentukan kompleks dari nitrogen pada ikatan peptida dengan ion-ion Cu^{2+} pada suasana basa dan reduksi asam fosfomolibdat fosfotungstat pada reagen Folin-Ciocaltaeu oleh rantai samping asam amino tirosin dan triptofan menjadi heteropolimolibdenum berwarna biru yang dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Keuntungan metode Lowry adalah sensitifitasnya cukup tinggi, yaitu 0,005 – 0,1 mg/mL protein, harganya murah dan bisa digunakan untuk analisis pada beberapa λ, yaitu 500, 540, 600, 660, dan 750 nm.

2.8. Karakterisasi Asparaginase

Setiap asparaginase yang terdapat dalam berbagai sumber di alam mempunyai karakteristik yang berbeda-beda. Untuk mengetahui kondisi optimum asparaginase hasil isolasi, perlu dilakukan karakterisasi yang meliputi suhu, dan waktu inkubasi enzim.

Asparaginase dari *E.coli* diketahui mempunyai karakterisasi: berat molekul 141.000, aktivitas spesifik 20-50 U.mg protein^{-1}, suhu optimum 37°C, waktu inkubasi optimum 10 menit dan pH optimum 8,6 [1].

Dari hasil penelitian lain, diketahui bahwa aktivitas spesifik dari asparaginase yang terdapat pada daun benalu teh (*Loranthus globasus* Roxb) sebesar 1,370 U. mg protein $^{-1}$ dengan suhu optimum 37 °C, waktu inkubasi 30 menit, dan pH optimum 8,5 [5]. Sedangkan aktivitas spesifik asparaginase yang diperoleh dari benalu mangga kuweni sebesar 1,576 U. mg protein^{-1} dengan tingkat kemurnian 17,511, dimana hasil tersebut diperoleh dalam kondisi optimum yaitu suhu 37 °C, waktu

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)

inkubasi 30 menit dan pH 8,5 pada fraksi F_2 dengan tingkat kejenuhan amonium sulfat 20-40 %[4]. Untuk itu perlu dilakukan karakterisasi asparaginase dari sumber lain.

2.9. Analisis dengan Spektrofotometri UV-Vis[14]

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang paling umum digunakan untuk penentuan aktivitas enzim. Prinsip metode tersebut adalah penyerapan sinar UV-Vis oleh suatu molekul sehingga molekul mengalami eksitasi.

Penentuan produk reaksi enzimatis dilakukan dengan analisis serapan sinar sesuai hukum Lambert-Beer pada persamaan 2.2.

$$-\log T = A = \varepsilon \, . \, b \, . \, c \qquad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (2.2)$$

dengan :

T = Transmitansi

A = Absorbansi

ε = koefisien ekstingsi molar (L/mol.cm)

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi (mol/L)

Dalam pengukuran, ε dan b dianggap konstan sehingga konsentrasi berbanding lurus dengan absorbansi. Dengan mengetahui absorbansinya, maka dapat diketahui konsentrasi sampel.

This document is Undip Institutional Repository Collection. The author(s) or copyright owner(s) agree that UNDIP-IR may, without changing the content, translate the submission to any medium or format for the purpose of preservation. The author(s) or copyright owner(s) also agree that UNDIP-IR may keep more than one copy of this submission for purposes of security, back-up and preservation. (http://eprints.undip.ac.id)