

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2015 – Desember 2015 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian dan Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tomat (diambil sesaat sebelum proses pemanenan), H₂O₂ (Merck, Germany), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (AppliChem, Germany Lot no. 2X001714), *DEAE-Sepharose* (Sigma-Aldrich, USA, Lot no. MKBS5227V), *Sodium Chloride* (HIMEDIA, India), *di-Sodium Hydrogen Phosphate* (HIMEDIA, India), *rare sugar* D-psikosa dan L-psikosa (Kagawa Rare Sugar Research Center, Japan) dan bahan reagen lainnya yang sesuai dengan dipersyaratkan. Alat yang digunakan diantaranya timbangan analitik, kolom purifikasi, *plate reader* (Biochrom EZ Read 800 Plus Microplate Reader, United Kingdom), *centrifuse tube*, *centrifuge*, *vortex*, *micropipet*, *refrigerator* dan *microtube*.

3.2. Metode

Metode penelitian yang dilaksanakan terdiri dari Ekstraksi Daun Tomat, Purifikasi Peroksidase Daun Tomat, Uji Profil Protein Elektroforesis Gel Poliakrilamida-Sodium Dodesil Sulfat (SDS PAGE), Uji Total Protein Bradford,

Pengujian Aktivitas Enzim dengan Inhibitor D-psikosa dan L-psikosa, Perhitungan Kinetika Enzim dan Analisis Data.

3.2.1. Ekstraksi Daun Tomat

Proses ekstraksi daun tomat dilakukan berdasarkan penelitian Kokkinakis dan Brooks (1979) dengan dimulai dengan ekstraksi daun tomat 400 g dengan ditambahkan amonium sulfat 0,1 M sebanyak 400 ml menggunakan hand mixer. Hasil yang didapatkan disaring menggunakan kain saring dan disentrifugasi 6000 rpm selama 20 menit. Diambil bagian supernatan untuk dilanjutkan ke proses purifikasi.

3.2.2. Purifikasi Peroksidase Daun Tomat

Proses purifikasi bertujuan untuk menghilangkan senyawa lain yang tidak diinginkan sehingga menggunakan metode *Ion Exchange Chromatography* (Kokkinakis dan Brooks, 1979). Proses purifikasi dimulai dengan melakukan pengelusian (pengaliran) supernatan melalui kolom yang telah diisi dengan resin *DEAE-Sepharose* sebanyak 60 g. *Phosphat buffer* aquades 100 mM pH 7 dialirkan sebanyak 300 ml. *Phosphat buffer* NaCl pH 6,5 dialirkan dengan tiga konsentrasi, masing-masing 0,5 M, 1,0 M dan 1,5 M sebanyak 300 ml kemudian ditampung per 10 ml pada setiap konsentrasi. Hasil tiap fraksi dilanjutkan dengan pengukuran jumlah protein.

Pengukuran jumlah protein pada setiap fraksi dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 280 nm. Hasil pengukuran tersebut kemudian dicatat, untuk menganalisis fraksi yang mempunyai kandungan protein

tertinggi. Fraksi dengan nilai kandungan protein tertinggi yang akan digunakan untuk metode selanjutnya (profil protein *SDS PAGE*).

3.2.3. Uji Profil Protein Poliakrilamida-Sodium Dodesil Sulfat (SDS PAGE)

Pengujian profil Protein SDS PAGE dilakukan berdasarkan penelitian Kokkinakis dan Brooks (1979). Sampel enzim yang digunakan dalam metode ini adalah enzim dari beberapa fraksi yang sudah ditentukan berdasarkan prediksi penghitungan jumlah protein dan sudah dikeringkan selama tiga hari dengan alat *Slow Rate Blower* pada suhu ± 4 °C. Setelah itu setiap sampel tersebut disiapkan (preparasi). Preparasi dilakukan dengan cara 15 μ l 100 mM PB aquades ditambahkan ke setiap sampel yang sudah dikeringkan, kemudian dicampur dengan *vortex*. Selanjutnya ditambahkan 15 μ l *SDS buffer* dan 3 μ l *mercaptoethanol* dan dicampur lagi dengan *vortex* merata.

Saat sampel sudah siap, langkah berikutnya adalah persiapan alat-alat dan pembuatan gel *SDS PAGE*. Saat alat-alat dan gel sudah dipasang dengan benar, sampel yang sudah di preparasi dipanaskan ke dalam air mendidih selama 2 menit. Selanjutnya setiap sampel dimasukkan ke dalam sumur *gel* secara hati-hati sesuai urutan yaitu standar, kontrol dan delapan sampel PO dari fraksi-fraksi terpilih. Setelah itu alat elektroforesis diatur pada 60V dan 12 mA selama ± 8 jam.

Saat sudah selesai *gel* dipindahkan ke dalam wadah, kemudian direndam dalam larutan *Coomassi Brilliant Blue* (CBB) selama 60 menit dan di bilas dengan aquades. Pembilasan tersebut diulangi hingga tiga kali. Terakhir adalah *gel* direndam dalam larutan pencuci (*staining*). Proses perendaman tersebut

dikontrol dengan cara larutan pencuci diganti saat sudah keruh dan dilakukan hingga letak protein di dalam *gel* terlihat jelas.

3.2.4. Uji Total Protein Metode Bradford

Metode uji total protein ini mengacu pada penelitian Bradford (1976) yang diawali dengan persiapan pembuatan *Bradford Kit* (CBB 0,2%). *Bradford Kit* dibuat dengan cara 10 mg CBB dilarutkan ke dalam 50 ml etanol 95%. Setelah itu ditambahkan 100 ml *phosphoric acid* (H_3PO_4) 85% dan kemudian diencerkan dengan aquades dalam perbandingan 1:2. Selanjutnya larutan yang sudah diencerkan tersebut disaring menggunakan kertas saring.

Total protein diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 nm. Pengukuran tersebut dilakukan dengan cara tiap sampel diambil sebanyak 100 μ l dan ditambah *Bradford Kit* hingga volume menjadi 1 ml dan selanjutnya absorbansi tiap sampel diukur. Setelah itu jumlah protein dihitung berdasarkan hasil absorbansi yang sudah didapat. Penghitungan dilakukan dengan rumus dari kurva standar Bradford dengan Ovalbumin.

3.2.5. Pengujian Aktivitas Enzim dengan Inhibitor D-psikosa dan L-psikosa

Pengujian aktivitas enzim dengan inhibitor D-psikosa dan L-psikosa dilakukan berdasarkan penelitian Al-Baarri *et al.*, (2011). Enzim diujikan dengan berbagai jenis gula dengan berbagai konsentrasi. Gula yang digunakan adalah gula D-psikosa dan L-psikosa. Masing-masing gula dibuat dengan konsentrasi 0 %; 0,1%; dan 0,4% direaksikan dengan H_2O_2 dengan konsentrasi 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM dan 0,5 %. Campuran gula dan H_2O_2 sebanyak 45 μ l di

reaksikan dengan PO daun tomat 10 μl dan ABTS 45 μl . Pengujian menggunakan alat *plate reader* dengan panjang gelombang 412 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan mencerminkan jumlah H_2O_2 sisa setelah reaksi enzim yang dihasilkan. Data tersebut dapat digunakan untuk metode selanjutnya yaitu perhitungan kinetika enzim.

3.2.6. Perhitungan Kinetika Enzim

Perhitungan Kinetika Enzim dilakukan berdasarkan penelitian Al-Baarri *et al.*, (2011) yang diawali dengan pengkonversian data absorbansi yang diperoleh ke dalam rumus kurva standar H_2O_2 yang telah ditentukan sebelumnya. Nilai yang didapatkan kemudian diubah menjadi kurva *polinomial* untuk mengetahui pengaruh penambahan gula D-psikosa dan L-psikosa.

Penentuan nilai K_m dan V_{\max} diawali dengan *reciprocal* nilai hasil konversi dengan rumus kurva standar H_2O_2 untuk mencari rumus kurva linier dari masing-masing konsentrasi pada setiap gula. Rumus linier yang didapatkan digunakan untuk mencari nilai $x = 0$ dan $y = 0$ pada kurva *Lineweaver-Burk plot*. Setelah didapatkan kurva *Lineweaver-Burk plot*, maka nilai K_m dan V_{\max} pada masing-masing konsentrasi gula dapat diketahui. Setelah nilai K_m dan V_{\max} diketahui dilakukan penentuan nilai K_i pada enzim peroksidase daun tomat pada D-psikosa dan L-psikosa. Penentuan nilai K_i menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\frac{1}{V_{\max}'} = \frac{1}{V_{\max}} \left[1 + \frac{[I]}{K_I} \right]$$

dan rumus tersebut dapat dimodifikasi menjadi :

$$V_{\max}' = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{KI}\right)} \quad \text{atau} \quad KI = \frac{[I]}{\left(\frac{V_{\max}}{V_{\max}'} - 1\right)}$$

Keterangan : V_{\max} = Kecepatan reaksi maksimum tanpa penambahan inhibitor

V_{\max}' = Kecepatan reaksi maksimum dengan penambahan inhibitor

$[I]$ = Konsentrasi inhibitor (mM)

Dalam kurva tersebut juga dapat diidentifikasi jenis inhibisi pada gula D-psikosa dan L-psikosa.

3.3. Analisis Data

Penelitian ini akan menggunakan analisis deskriptif kuantitatif yang akan mendapatkan kurva *Lineweaver-burk plot* sebagai model akhir dari aktivitas penghambatan (Lineweaver dan Burk, 1934). Identifikasi nilai data kinetik enzim peroksidase daun tomat (K_m , V_{\max} dan K_i) dari masing-masing konsentrasi substrat inhibitor D-psikosa dan L-psikosa akan dihitung berdasarkan penelitian Afzelius *et al.*, (2000). Data yang diambil merupakan hasil dari rata-rata 3 kali pengulangan ditambah \pm standar deviasi.