

**Isolasi dan Karakterisasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi  
Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan**

**SKRIPSI**

oleh :

**RARA ANGGUN MEI NIRBAYA  
0910923054 - 92**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

**Isolasi dan Karakterisasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi  
Spermatozoa Tikus (*Rattus Norvegicus*) Jantan**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
dalam bidang kimia

oleh :

**RARA ANGGUN MEI NIRBAYA**

**0910923054 - 92**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

### Isolasi dan Karakterisasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan

oleh :

**RARA ANGGUN MEI NIRBAYA**  
**0910923054 – 92**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal .....  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES  
NIP. 196009031988022001

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS  
NIP. 195204121980021001

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Edi Priyo Utomo, MS  
NIP. 19571227198031003

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rara Anggun Mei Nirbaya  
NIM : 0910923054  
Jurusan : Kimia  
Penulis skripsi berjudul : Isolasi dan Karakterisasi Tirosin  
Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,  
Yang menyatakan,

(Rara Anggun Mei Nirbaya)  
NIM. 0910923054

## Isolasi dan Karakterisasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan

### ABSTRAK

Tirosin kinase merupakan enzim yang mengatur hubungan antar sel, diferensiasi, adhesi serta pengaturan sel. Aktivitas tirosin kinase penting dalam proses autofosforilasi spermatozoa dan aktivitasnya akan maksimal bila bekerja pada kondisi optimum. Tirosin kinase diisolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan cara sentrifugasi dan ultrasonikasi. Pada penelitian ini ditentukan kondisi optimum tirosin kinase dengan variasi pH (6; 6,5; 7; 7,5 dan 8), temperatur (20; 25; 30; 35 dan 40)<sup>0</sup>C, waktu inkubasi (20; 25; 30; 35; dan 40) menit, dan untuk penentuan berat molekul digunakan metode SDS-PAGE. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan pada pH 7, temperatur 35<sup>0</sup>C, waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas 0,263 unit dan didapatkan berat molekul sebesar 94,61 kDa. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pH, temperature, dan waktu inkubasi memberikan pengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ).

*Kata kunci* : Aktivitas tirosin kinase, tirosin kinase, spermatozoa, berat molekul tirosin kinase

## Isolation and Characterization of Tyrosine Kinase from Sperm Isolation of Rat (*Rattus norvegicus*) Male

### ABSTRACT

Tyrosine kinase is an enzyme which regulates the relationships between cell adhesion, differentiation, and cell settings. Tyrosine kinase activity is important in the process of autofosforilasi sperm and its activities will be maximum when the working conditions of optimum. Tyrosine kinase isolated from spermatozoa rats (*Rattus norvegicus*) males by centrifugation and ultrasonikasi technique. In this research specified conditions optimum tyrosine kinase with variations of pH ( 6; 6,5; 7; 7.5 and 8), temperature ( 20; 25; 30; 35 and 40 )<sup>0</sup>C, incubation periods ( 20; 25; 30; 35; and 40 ) minutes, and for the determination of molecular weight used method of SDS-PAGE. The result of this research showed that the optimum activity tyrosine kinase from sperm of rat (*Rattus norvegicus*) male at pH 7, temperature 35<sup>0</sup>C, and 30 minutes incubation time with 0,263 unit activity and obtained by molecular weight 94,61 kDa. The result of statistic analyzed showed the variation of pH, temperature, and incubation time give an very obvious influence ( $P < 0,01$ ).

*Keywords: Tyrosine kinase activity, tyrosine kinase, Sperm, Tyrosine kinase molecular weight*



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat-Nya, sehingga penyusunan skripsi yang berjudul **Isolasi dan Karakterisasi Tirosin Kinase Hasil Isolasi Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan** dapat terselesaikan dengan baik, sebagai salah satu syarat kelulusan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia di Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini adalah penelitian payung Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES tentang Unggulan Biopeptida Hanya Untuk Pengembangan Kontrasepsi Pria. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES, selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi.
2. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS, selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian hingga penulisan skripsi.
3. Drs. Mohammad Misbah Khunur, M.Si, selaku dosen pembimbing akademik.
4. Dr. Edi Priyo Utomo, MS, selaku ketua jurusan kimia yang telah memberikan dukungan dalam proses penyelesaian skripsi.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis dengan senang hati menerima kritik dan saran yang mendukung dalam meningkatkan mutu dari penulisan, sehingga dapat memperbaiki penulisan selanjutnya.

Malang, Juli 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>Halaman Judul.....</b>	<b>i</b>
<b>Lembar Pengesahan Skripsi .....</b>	<b>ii</b>
<b>Lembar Pernyataan.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstrak .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Kata pengantar .....</b>	<b>vi</b>
<b>Daftar Isi.....</b>	<b>vii</b>
<b>Daftar Tabel .....</b>	<b>viii</b>
<b>Daftar Gambar .....</b>	<b>ix</b>
<b>Daftar Lampiran.....</b>	<b>x</b>
<b>Daftar Istilah .....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Masalah .....	2
1.4 Batasan masalah .....	3
1.5 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Spermatozoa.....	4
2.2 Epididimis.....	5
2.3 Enzim.....	6
2.4 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Enzim.....	6
2.4.1 pH .....	6
2.4.2 Temperatur.....	7
2.4.3 Waktu Inkubasi.....	8
2.4.4 Konsentrasi Substrat.....	8
2.4.5 Konsentrasi Enzim.....	9
2.5 Tirosin Kinase.....	10
2.6 SDS-PAGE .....	11
<b>BAB III METODOLOGI.....</b>	<b>12</b>
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	12
3.2 Alat dan Bahan .....	12
3.2.1 Alat .....	12
3.2.2 Bahan.....	12
3.3 Tahapan Penelitian .....	13



3.4	Prosedur Kerja Penelitian	13
3.4.1	Isolasi Tirosin Kinase	13
3.4.2	Uji Aktivitas Tirosin Kinase	14
3.4.2.1	Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ATP	14
3.4.2.2	Penentuan Kurva Baku ATP	14
3.4.3	Penentuan Kondisi Optimum	14
3.4.3.1	Penentuan pH Optimum	14
3.4.3.2	Penentuan Temperatur Optimum	15
3.4.3.3	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	15
3.4.4	Penentuan Berat Molekul Menggunakan Metode SDS-PAGE	15
3.4.4.1	Persiapan Gel	15
3.4.4.2	Injeksi Sampel dan Running	16
3.5	Analisis Data	16
	<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>17</b>
4.1	Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Tirosin Kinase	17
4.2	Penentuan berat Molekul Tirosin Kinase	23
	<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>26</b>
5.1	Kesimpulan	26
5.2	Saran	26
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>27</b>
	<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	<b>30</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Spermatozoa.....	4
<b>Gambar 2.</b> Apididimis.....	5
<b>Gambar 3.</b> Grafik Hubungan Aktivitas Enzim Dengan Ph.....	7
<b>Gambar 4.</b> Grafik Hubungan Aktivitas Enzim Denga Temperatur... 8	8
<b>Gambar 5.</b> Grafik Hubungan Konsentrasi Substrat Dengan Kecepatan Reaksi Enzim.....	9
<b>Gambar 6.</b> Grafik Hubungan Konsentrasi Enzim Dengan Kecepatan Reaksi Enzim.....	10
<b>Gambar 7.</b> Kurva Hubungan Ph Dengan Aktivitas Tirosin Kinase	17
<b>Gambar 8.</b> Kurva Hubungan Temperatur Dengan Aktivitas Tirosin Kinase.....	20
<b>Gambar 9.</b> Kurva Hubungan Waktu Inkubasi Dengan Aktivitas Tirosin Kinase.....	21
<b>Gambar 10.</b> Pita Protein Hasil Eliktroforesis.....	23
<b>Gambar 11.</b> Mekanisme Aktivitas Tirosin Kinase.....	25
<b>Gambar 12.</b> Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Baku ATP.....	39
<b>Gambar 13.</b> Penentuan Kurva Baku ATP.....	40
<b>Gambar 14.</b> kurva skunder marker protein.....	48

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4.1</b>	Pengaruh Ph Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	19
<b>Tabel 4.2</b>	Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .	21
<b>Tabel 4.3</b>	Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	23
<b>Tabel 4.4</b>	Berat Molekul Setiap Pita.....	24
<b>Tabel L.6.1</b>	Nilai Serapan Larutan Baku ATP Pada Berbagai Panjang Gelombang.....	38
<b>Tabel L.6.2</b>	Nilai absorbansi dari konsentrasi ATP bertingkat pada $\lambda_{max}$ 260 nm .....	39
<b>Tabel L.7.1</b>	Data Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	42
<b>Tabel L.7.2</b>	Analisis Ragam Satu Arah Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	44
<b>Tabel L.7.3</b>	Uji BNT 5% Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	45
<b>Tabel L.7.4</b>	Data Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	45
<b>Tabel L.7.5</b>	Dara Statistika Perhitungan RAL Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	45
<b>Tabel L.7.6</b>	Analisis Ragam Satu Arah Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	46
<b>Tabel L.7.7</b>	Uji BNT 5% Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	46
<b>Tabel L.7.8</b>	Data Statistik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	46
<b>Tabel L.7.9</b>	Dara Statistika Perhitungan RAL Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	47
<b>Tabel L.7.10</b>	Analisis Ragam Satu Arah Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	47
<b>Tabel L.7.11</b>	Uji BNT 5% Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	47
<b>Tabel L.8.1</b>	Penentuan kurva baku standar protein .....	48
<b>Tabel L.8.2</b>	Penentuan Nilai Rf.....	49
<b>Tabel L.8.3</b>	Penentuan BM dari Antilog BM .....	50
<b>Tabel L.9.1</b>	Komposisi Separating Gel 12% .....	54
<b>Tabel L.9.2</b>	Komposisi Separating Gel 3% .....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Tahap Penelitian .....	30
<b>Lampiran 2.</b> Isolasi Tirosin Kinase dari Spermatozoa .....	31
<b>Lampiran 3.</b> Uji Aktivitas Tirosin Kinase .....	32
L.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ATP.....	32
L.3.2 Pembuatan Kurva Baku ATP.....	32
<b>Lampiran 4.</b> Penentuan Kondisi Optimum .....	33
L.4.1 Penentuan pH Optimum.....	33
L.4.2 Penentuan Temperatur Optimum.....	34
L.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum .....	35
<b>Lampiran 5.</b> Penentuan Berat Molekul Dengan Metode SDS- PAGE .....	36
L.5.1 Persiapan Gel .....	36
L.5.2 Injeksi Sampel dan Running.....	37
<b>Lampiran 6.</b> Perhitungan Uji Aktivitas Tirosin Kinase .....	38
L.6.1 Panjang Gelombang Maksimum ATP .....	38
L.6.2 Pembuatan Kurva Baku ATP.....	39
<b>Lampiran 7.</b> Perhitungan Penentuan Aktivitas Tirosin Kinase.....	41
L.7.1 Data Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase.....	42
L.7.2 Data Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	45
L.7.3 Data Statistik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase .....	46
<b>Lampiran 8.</b> Perhitungan Penentuan Berat Molekul.....	48
L.8.1 Perhitungan Penentuan Kurva Baku Standar Protein	48
L.8.2 Perhitungan Berat Molekul Tirosin Kinase .....	49
<b>Lampiran 9.</b> Pembuatan Reagen .....	51
L.9.1 Larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2M ( $M_r=137,99$ g/mol) .....	51
L.9.2 Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2M ( $M_r=141,96$ g/mol).....	51
L.9.3 Larutan Buffer Fosfat 0,2M pH7 .....	51
L.9.4 Larutan Stock ATP 125 ppm .....	52
L.9.5 Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) .....	52
L.9.6 Larutan Histon 70 ppm .....	52
L.9.7 Larutan TCA 8%.....	53
L.9.8 Larutan Buffer Tris-Cl pH 6,5 .....	53
L.9.9 Larutan APS 10% .....	53

L.9.10 Larutan Poliakrilamida (T-Akrlil).....	53
L.9.11 Larutan Upper Gel Buffer.....	53
L.9.12 Larutan Lower Gel Buffer.....	54
L.9.13 Larutan Running Buffer.....	54
L.9.14 Larutan Reducing Sampel Buffer.....	54
L.9.15 Larutan Staining.....	54
L.9.16 Larutan Destaining.....	55
<b>Lampiran 10. Keterangan Kelaikan Etik.....</b>	<b>56</b>

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UNIVERSITAS BRAWIJAYA





# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan senyawa protein, yang berfungsi sebagai katalis biologis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia yang terdapat dalam jaringan makhluk hidup (Muchtadi, 1992). Suatu enzim bekerja secara khas terhadap substrat tertentu atau dapat dikatakan memiliki sifat yang spesifik (Poedjiadi, 2006). Sifat khas yang dimiliki enzim yaitu enzim dibentuk dalam protoplasma sel, di tempat yang lain di luar tempat sintesisnya (eksoenzim) dapat juga enzim beraktifitas di dalam sel tempat sintesisnya (endoenzim) (Akhyasrinuki, 2011).

Saat ini, enzim merupakan biokatalisator yang banyak digunakan pada berbagai bidang industri produk pertanian, kimia, dan medis. Dimana salah satu contoh yang sampai sekarang dikembangkan yaitu pemanfaatan enzim dibidang medis (Adi, 2011). Pemanfaatan enzim dibidang medis yaitu enzim yang berperan dalam pembentukan spermatozoa (spermatogenesis), salah satu protein membran plasma spermatozoa yang berfungsi sebagai mediator utama terjadinya fusi spermatozoa dengan zona pelusida 3 (ZP3).

Tirosin kinase merupakan salah satu enzim dari subgrup kelas protein kinase, yang dapat memediasi respon inti sel terhadap rangsangan eksternal, golongan transferase. Kerjanya mentransfer fosfat dari ATP ke serin (Burkin, 2000). Dalam spermatozoa, tirosin kinase merupakan salah satu protein membran plasma spermatozoa yang memiliki fungsi sebagai mediator pertemuan antara spermatozoa dengan sel telur. Serta berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin (Leyton, et al, 1992). Aktivitas tirosin kinase berperan penting dalam autofosforilasi spermatozoa, dimana aktivitas tirosin kinase dari penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya terhadap membran plasma spermatozoa sapi akan maksimum apabila bekerja pada kondisi optimum yaitu pH 7, temperatur 30°C, dan waktu inkubasi 30 menit (Madyawati, 2007). Berdasarkan penelitian penentuan berat molekul tirosin kinase dalam membran plasma spermatozoa sapi sebesar 95 kDa (Aitken, et al, 1998). Aktivitas enzim tirosin kinase dapat

dipengaruhi oleh pH, temperatur, *feed back* inhibitor, konsentrasi substrat, serta konsentrasi enzim tersebut sendiri dan waktu inkubasi.

Penelitian karakterisasi tirosin kinase telah dilakukan sebelumnya oleh Sari (2006), dengan mengisolasi spermatozoa sapi perah. Sementara dalam penelitian ini ditentukan karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dalam bentuk ekstrak kasar (*crude* enzim). Perbedaan strain ini menyebabkan adanya perbedaan kandungan enzim tirosin kinase. Oleh karena itu perlu diketahui karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan ini dalam menghidrolisis fosfat agar mencapai aktivitas maksimum, yang meliputi kondisi optimum pH, temperatur, waktu inkubasi dan berat molekul. Serta penentuan berat molekul tirosin kinase dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Uji aktivitas enzim dilakukan dengan mengukur nilai absorbansinya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dirumuskan beberapa rumusan masalah yaitu:

1. Bagaimanakah kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berdasarkan variasi pH, temperatur, dan waktu inkubasi?
2. Berapa berat molekul (BM) tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan?

## 1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka penelitian ini memiliki batasan masalah sebagai berikut:

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan berusia 2,5-3 bulan dengan berat badan 150-300 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba yang dilakukan dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat etik oleh Komite Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 165-KEP-UB.
2. Tirosin kinase diisolasi dari spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan.

#### **1.4 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berdasarkan variasi pH, temperatur, dan waktu inkubasi.
2. Untuk mengetahui berat molekul (BM) tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

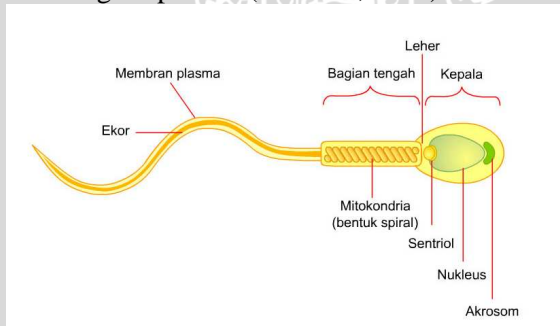
Manfaat dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum dari tirosin kinase sehingga dalam jangka panjang dapat dipakai sebagai acuan dasar untuk melakukan penelitian tentang pengembangan kontrasepsi pria.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Spermatozoa

Spermatozoa yang memiliki bentuk normal adalah memiliki struktur yang lengkap untuk melindungi muatan genetik yang dibawanya. Pada dasarnya, sperma memiliki bagian-bagian yang memiliki fungsi masing-masing, yaitu kepala, leher, badan, dan ekor. Komponen bagian kepala sel spermatozoa terdapat selubung tebal yang dimaksud adalah akrosom. Fungsi dari akrosom adalah untuk melindungi nukleus, juga menghasilkan enzim. Enzim yang dihasilkan akrosom merupakan enzim pematangan yaitu hialuronidase dan akrosin. Akrosin merupakan enzim protease yang dapat menghancurkan glikoprotein (Mochtar, 1998).



**Gambar 1.** Spermatozoa (Mochtar, 1998).

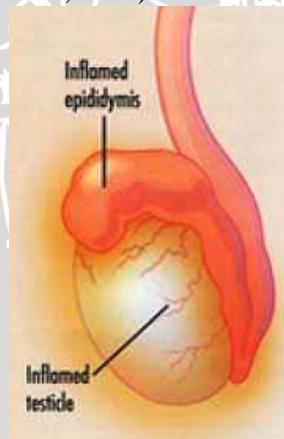
Spermatozoa telah ditutupi oleh membran sel dari kepala hingga ekor. Spermatozoa memiliki struktur yang kompleks dalam susunannya. Komposisi membran spermatozoa terdiri dari protein, lipid, karbohidrat serta molekul lain yang spesifik terhadap faktor luar seperti kekuatan ionik, polaritas pelarut dan temperatur. Lipid merupakan komponen struktur membran spermatozoa yang penting dalam pertahanan stabilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa, serta kemampuan untuk melakukan kapasitasi (Chung, et al, 2009).

Kepala spermatozoa terdapat membran akrosom, yaitu ujung kepala sperma yang berbentuk agak runcing dan menghasilkan enzim hialuronidase yang berfungsi untuk kapasitasi, reaksi akrosom dan penembusan ovum pada proses fertilisasi. Bagian belakang membran akrosom (*post acromal region*) berfungsi untuk mengadakan kontak

pling awal dan menjadi satu dengan oolema ovum pada proses fertilisasi. Membran bagian ekor (*mid piece*) bersifat *motil* atau banyak bergerak dan berfungsi untuk mendapatkan energi yang penting bagi spermatozoa dan menghantarkan gelombang gerak, dan dapat membantu pergerakan spermatozoa (Hubkin, 1978).

## 2.2 Epididimis

Epididimis merupakan saluran berkelok-kelok di dalam skrotum yang keluar dari testis. Epididimis berjumlah sepasang di sebelah kanan dan kiri. Epididimis merupakan daerah penumpukan dan penyimpanan spermatozoa setelah meninggalkan testis. Secara umum epididimis memiliki fungsi utama, yaitu transportasi, pemekatan (konsentrasi), pematangan dan penyimpanan spermatozoa. Sewaktu meninggalkan testis, spermatozoa belum mampu bergerak atau membuahi (belum matang secara fisiologis). Spermatozoa memperoleh kedua kemampuan tersebut selama perjalanannya melintasi epididimis. Proses pematangan ini dirangsang oleh testosteron yang tertahan di dalam cairan tubulus oleh protein pengikat androgen. Epididimis juga memekatkan spermatozoa beberapa ratus kali lipat dengan menyerap sebagian besar cairan yang masuk dari tubulus seminiferus. Spermatozoa yang telah matang secara perlahan bergerak melintasi epididimis ke dalam duktus deferens akibat kontraksi ritmik otot polos di dinding saluran-saluran tersebut (Sherwood, 2001).



**Gambar 2.** Epididimis (Sherwood, 2001).



## 2.3 Enzim

Enzim merupakan senyawa protein yang berfungsi sebagai katalis biologis yang mampu mengendalikan berbagai reaksi biokimia yang terdapat dalam jaringan makhluk hidup (Muchtadi, 1992). Enzim dapat juga dikatakan sebagai biomolekul berupa protein. Fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk proses biokimia yang terjadi di dalam sel maupun diluar sel (Poedjiadi, 2006). Menurut Taufik (1992), enzim berupa unit fungsional dari metabolisme sel yang berfungsi sebagai biokatalisator, yaitu dapat mempercepat suatu reaksi kimia atau biokimia tanpa mempengaruhi produk hasil reaksi. Enzim bersifat spesifik terhadap substrat tertentu dan bekerja pada kisaran temperatur tertentu (Dhamarni, 2004).

Enzim didapatkan dalam keadaan murni dengan proses isolasi enzim, dimana dilakukan dengan cara ekstraksi enzim secara fisika dan kimia. Proses sentrifugasi, pengendapan dengan garam anorganik, pengendapan dengan pelarut anorganik dan *liofilisasi* (pengeringan beku). Proses sentrifugasi enzim, sistem pemisahan enzim dilakukan berdasarkan berat dan ukuran. Sedangkan, pada teknik ekstraksi (pemisahan) enzim, dilakukan berdasarkan jenis sifat, sumber enzim serta bentuk ekstrak yang diinginkan (Tanti, 2011).

Pada umumnya enzim bekerja pada kondisi netral, kecuali beberapa jenis enzim yang bekerja pada suasana asam atau pada suasana basa. Kerja enzim juga dipengaruhi oleh *feed back* inhibitor dimana suatu keadaan pada saat substansi hasil (produk) kerja enzim terakumulasi dalam jumlah berlebihan akan menghambat kerja enzim yang bersangkutan. Enzim juga harus memiliki kecocokan dengan substratnya (konsentrasi substrat) agar bisa bekerja dengan optimal, serta konsentrasi enzim berbanding lurus dengan efektivitas kerja enzim. Semakin tinggi konsentrasi maka kerja enzim akan semakin baik dan cepat (Nie, 2005).

## 2.4 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

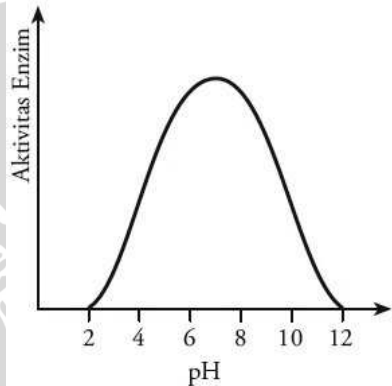
### 2.4.1 pH

Laju reaksi suatu enzim dapat dipengaruhi oleh banyak faktor. Faktor tersebut adalah zat penghambat (inhibitor), zat pengaktif (aktivator), temperatur, pH, konsentrasi enzim dan substrat (Page, 1985). Enzim mempunyai pH optimum, dimana pH tersebut dapat menyebabkan aktivitas enzim maksimum. Aktivitas enzim dapat



dipengaruhi oleh pH, dimana sifat ionik gugus karboksil dan gugus amino mudah dipengaruhi oleh pH. Sehingga menyebabkan fungsi dan konformasi katalitik enzim menjadi berubah (Martin, 1983). pH optimum pada enzim yaitu menyebabkan aktivitas maksimal (Voet, 1990).

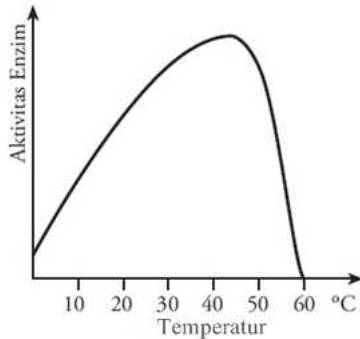
Seiring peningkatan pH aktivitas enzim terus meningkat sampai dengan pH optimumnya, setelah tercapai pH optimum maka aktivitas enzim akan turun, karena telah mengalami perubahan konformasi gugus aktif pengikat substrat. Hubungan aktivitas enzim dengan pH ditunjukkan dengan grafik (Girindra, 1993):



**Gambar 3.** Grafik hubungan aktivitas enzim dengan pH

#### 2.4.2 Temperatur

Setiap enzim dapat bekerja secara efektif pada temperatur tertentu dan aktivitasnya akan berkurang ketika berada pada kondisi diatas atau dibawah titik temperatur tersebut. Kondisi yang menyebabkan kerja enzim tidak efektif disebut kondisi optimum (Martin, 1983). Penentuan temperatur optimum aktivitas enzim sangat diperlukan, sebab temperatur yang terlalu rendah mengakibatkan kestabilan enzim tinggi akan tetapi mempunyai aktivitas enzim rendah. Sedangkan pada temperatur terlalu tinggi, aktivitas enzim sangat tinggi tapi kestabilannya rendah (Tranggono, 1990).



**Gambar 4.** Grafik hubungan aktivitas enzim dengan temperatur

Dari gambar 4. dapat dilihat bahwa pada temperatur rendah yang mendekati titik beku biasanya tidak merusak enzim. Pada temperatur dimana enzim masih aktif. Pada temperatur optimum reaksi berlangsung paling cepat. Bila temperatur dinaikan, maka jumlah enzim aktif akan berkurang karena enzim mengalami denaturasi.

Enzim dapat berfungsi secara optimal dalam batas temperatur 30-50°C (Nie, 2005). Energi aktivasi enzim sekitar 4-20 kkal/g mol. Dengan kenaikan temperatur diatas 40°C menghasilkan laju katalisis dan denaturasi sebanyak 1,8-4 kali lipat (Rodwell, 1988).

### 2.4.3 Waktu Inkubasi

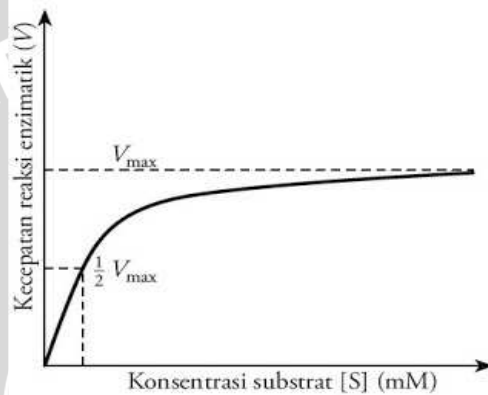
Waktu inkubasi juga dapat mempengaruhi aktivitas enzim. Dimana waktu inkubasi sangat diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat. Semakin lama waktu inkubasi, maka semakin banyak enzim yang berikatan dengan substra sehingga produk yang terbentuk semakin banyak. Akan tetapi, waktu inkubasi tidak berpengaruh ketika enzim sudah jenuh dengan substrat (Martin, 1983).

### 2.4.4 Konsentrasi Substrat

Kerja enzim juga dapat dipengaruhi oleh banyaknya substrat. Untuk suatu enzim tertentu, kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat hingga mencapai kecepatan konstan. Kecepatan reaksi enzim berpengaruh

pada jumlah gugus aktif dan luas permukaannya (Kusnawijaya, 1983). Kecepatan reaksi maksimum dapat terjadi saat konsentrasi substrat tinggi. Pada keadaan ini kecepatan reaksi tidak lagi tergantung pada konsentrasi substrat. Dikarenakan semua molekul enzim telah membentuk ikatan kompleks dengan substrat (Tranggono, 1990).

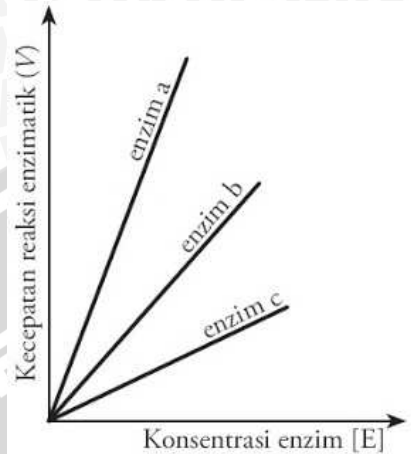
Hubungan hubungan konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzim dapat dilihat pada grafik berikut (Page, 1985):



**Gambar 5.** Grafik hubungan konsentrasi substrat dengan kecepatan reaksi enzim

#### 2.4.5 Konsentrasi Enzim

Semua jenis enzim bekerja pada pH, temperatur, waktu reaksi, dan konsentrasi substrat yang tepat, maka konsentrasi enzim menunjukkan hubungan linier hingga mencapai batas tertentu yaitu semua substrat telah habis bereaksi dengan enzim (Martin, 1983). Semakin besar konsentrasi enzim maka semakin cepat pula reaksi yang berlangsung. Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan kecepatan reaksi. Supaya laju reaksi berjalan optimum, maka perbandingan antara jumlah enzim dan substrat harus sesuai. Jika jumlah enzim sedikit dan substrat terlalu banyak, menyebabkan reaksi berjalan lambat dan bahkan ada substrat yang tidak terkatalisasi. Semakin banyak enzim, reaksi akan semakin cepat (Syamsyuri, 2004).



**Gambar 6.** Grafik hubungan konsentrasi enzim dengan kecepatan reaksi enzim

## 2.5 Tirosin Kinase

Tirosin kinase merupakan salah satu enzim yang dapat memindahkan grup fosfat dari ATP ke residu tirosin pada protein. Tirosin kinase merupakan subgrup dari kelas protein kinase. Tirosin kinase dikelompokkan dalam protein tirosin pospatase. Famili tirosin kinase dibagi dalam dua famili utama yaitu transmembran receptor-linked kinase dan protein cytoplasmic (Muhaiminrifai, 2011).

Tirosin kinase merupakan enzim yang mengatur hubungan antar sel, diferensiasi, adhesi serta pergerakan sel. Aktivitas tirosin kinase sangat dipengaruhi oleh pH, temperatur dan waktu inkubasi. Aktivitas tirosin kinase penting dalam proses autofosforilasi spermatozoa dan aktivitasnya akan maksimum apabila bekerja pada kondisi optimum (Bruce, 2002). Berdasarkan hasil penelitian penentuan kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa sapi, tirosin kinase dapat bekerja pada kondisi optimum pH 7, temperatur 35<sup>0</sup>C, dan waktu inkubasi 30 menit, dalam protein membran plasma spermatozoa, tirosin kinase mempunyai berat molekul 95 kDa (Winarno, 1986). Tirosin kinase penting untuk mengontrol fungsi spermatozoa dan mekanisme redoks yang mengatur fosforilasi tirosin kinase (Aitken, et al, 1998).

Reseptor tirosin kinase (RTK) adalah reseptor yang terlibat dalam sinyal transduksi, dan proses berbagai lingkungan serta sinyal interselular. Sedangkan, protein tirosin kinase (PTK) adalah enzim yang mengkatalisis fosforilasi residu tirosin. Ligan menstimulasi aktivitas tirosin kinase, yang kemudian menstimulasi jalur Ras-MAP kinase dan beberapa sinyal transduksi lainnya. Reseptor Tirosin Kinase (RTKs) terdiri dari empat domain (Muhaiminrifai, 2011):

1. Domain ekstraselular ligan.
2. Domain tirosin kinase intraseluler, dengan sekuens asam amino dalam substrat ATP dan cAMP-dependent protein kinase (cAPK, PKA).
3. Domain intraselular (mengikat faktor pertumbuhan)
4. Domain transmembran (terletak di membran plasma)

## **2.6 SDS-PAGE**

*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengkarakterisasi protein antigen berdasarkan berat molekulnya (BM) (Dewi, 2009). Pemisahan protein dilakukan menggunakan matrik tiga dimensi yang telah dialiri listrik. Dan matrik tersebut memiliki fungsi, yaitu memisahkan protein sesuai ukuran dan bentuk, dan memisahkan protein berdasarkan muatan listrik. Pemisahannya diperlukan buffer yang sesuai (Fendik, 2003).

## **2.7 Hipotesis**

pH, temperatur dan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap aktizitas tirosin kinase.



## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2013.

### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: seperangkat alat bedah, labu takar (10mL, 100mL), pipet tetes, beaker glass, mikropipet, pengaduk kaca, tabung reaksi, corong gelas, stirer, tabung polipropilene, tabung mikro (eppendorf), lemari pendingin, neraca analitik (Sartorius basic P-160 kepekaan 0,0001 G/160G), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Denley type-BR 401), shaker, vortex (Guo-Huq), inkubator (memmert), sonikator (Branson 200), spektrofotometer UV-Vis, dan seperangkat alat elektroforesis.

#### 3.2.2 Bahan

Dalam penelitian ini bahan yang digunakan adalah: hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang diperoleh dari laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam universitas Brawijaya Malang.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Adebosin Trifosfat (ATP Merk M 551,15 g/mol Adenosin-5 trifosfat dinatrium),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , NaCl, KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Histon (sigma-H5505 MP. Biomedicals, LLC Germany 37244-51-2), trikloroasetat ( $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ ), sukrosa ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ , ICN Biomedical, Inc), Tris base, imidazole ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ , E. Merck, 64271 Darmstadt, Germany), asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ), asam klorida (HCl), Sodium dedosil sulphate (SDS), BO Caffein (*Bracket and Oll'phant Caffein*), *Ammonium persulphate* ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), N, N, N',N' tetramethyl ethylene diamine (TEMED, dd  $\text{H}_2\text{O}$ ), bromophenol blue,  $\beta$ -



merkuptoetanol ( $C_2H_6O_5$ ), running sample buffer (RSB), Comassie Brilliant Blue R-250, aquades steril.

### **3.3 Tahapan Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus (*Rattus norvegicus*) jantan. Tikus tersebut tanpa ada perlakuan khusus terlebih dahulu. Tahapan penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Persiapan hewan coba
2. Pengambilan sperma
3. Isolasi protein
4. Uji kondisi optimum aktivitas enzim (variasi pH, temperatur dan waktu inkubasi)
5. Penentuan profil protein dari hasil isolasi spermatozoa menggunakan metode SDS-PAGE
6. Analisis data

### **3.4 Prosedur Kerja Penelitian**

#### **3.4.1 Isolasi Tirosin Kinase**

Sampel sperma dimasukkan dalam ependrof ditambah PBS, disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Substrat yang didapat dibuang sedangkan endapan di tambah PBS 1:1, disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, pencucian dengan PBS diulangi sebanyak tiga kali. Substrat yang didapat dibuang sedangkan endapan ditambah PBS dan dimasukkan dalam mortir dingin (sudah dibilas alkohol 70%). Ditambah pasir kuarsa sedikit dan digerus hingga halus dan homogen. Ditambah PBST-PMSF sebanyak 5kali volume larutan di mortir, digerus hingga homogen. Diambil cairan (berwarna putih susu) dimasukkan dalam ependrof. Disonikasi selama 10 menit, disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terbentuk dibuang, sedangkan supernatan yang didapat ditambah etanol dingin dengan perbandingan 1:1. Dimasukkan freezer selama 12jam sampai terbentuk endapan. Disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan ekstrak kasar tirosin kinase, supernatan yang didapat dibuang sedangkan endapan dikering anginkan sampai bau dari etanol hilang. Sebelum dilakukan penentuan kondisi optimum aktivitas ekstrak kasar tirosin kinase

diencerkan terlebih dahulu dengan ditambah buffer Tris-Cl perbandingan 1:1.

### **3.4.2 Uji Aktivitas Tirosin Kinase**

#### **3.4.2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ATP**

Membuat larutan stok ATP dengan konsentrasi 125 ppm. Ditimbang 0,0125 g ATP, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1M dan dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, diencerkan hingga tanda batas. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan pengukuran absorbansi dari larutan ATP 125 ppm, menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada kisaran gelombang 230-280 nm. Dibuat grafik antara data absorbansi dan panjang gelombang ( $\lambda$ ). Panjang gelombang maksimum terjadi ketika tercapai absorbansi maksimum.

#### **3.4.2.2 Penentuan Kurva Baku ATP**

Larutan ATP 125 ppm dipipet secara berturut-turut 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480  $\mu$ L, dimasukkan dalam ependrof. Diencerkan dengan ditambah buffer fosfat 0,1M pH 7 sampai volume mencapai 1500  $\mu$ L, divorteks 1menit. Diperoleh konsentrasi ATP 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; dan 40 ppm. Tiap larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yaitu 260nm. Dibuat persamaan regresi dan kurva baku ATP antara absorbansi versus konsentrasi ATP.

### **3.4.3 Penentuan Kondisi Optimum**

#### **3.4.3.1 Penentuan pH Optimum**

Penentuan pH optimum dengan cara, 50  $\mu$ L ekstrak kasar tirosin kinase hasil isolasi ditambah 150  $\mu$ L Tris-HCl, 200  $\mu$ L larutan ATP 125 ppm dalam larutan buffer fosfat dengan fariasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8 dan 200  $\mu$ L histon 70 ppm dalam larutan buffer fosfat dengan fariasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8, kemudian diinkubasi pada temperatur 35<sup>0</sup>C selama 30 menit, lalu ditambah 200  $\mu$ L TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat yang dihasilkan diambil 100  $\mu$ L dan ditambah Tris-HCl sebanyak 1 mL. Ditentukan pH optimum dengan ditentukan nilai absorbansi menggunakan panjang gelombang maksimum ATP yaitu 260 nm. Cara penentuan kondisi optimum fariasi pH dapat dilihat diagram alir L.4.1 (Lampitan 4). Data yang diperoleh dibuat grafik antara

aktivitas enzim terhadap variasi pH. pH optimum ditunjukkan pada aktivitas maksimum.

### **3.4.3.2 Penentuan Temperatur Optimum**

Penentuan temperatur optimum dengan cara, 50  $\mu\text{L}$  ekstrak kasar tirosin kinase hasil isolasi, ditambah 150  $\mu\text{L}$  Tris-HCl, 200  $\mu\text{L}$  larutan ATP 125 ppm pH 7, dan 200  $\mu\text{L}$  histon 70 ppm. Diinkubasi dengan variasi temperatur 20; 25; 30; 35; dan 40°C selama 30 menit. Ditambah 200  $\mu\text{L}$  TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat yang dihasilkan diambil 100  $\mu\text{L}$  dan ditambah Tris-HCl sebanyak 1 mL. Ditentukan temperatur optimum dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ATP yaitu 260 nm. Cara penentuan kondisi optimum variasi temperatur dapat dilihat diagram alir L.4.2 (Lampiran 4). Data yang diperoleh dibuat grafik antara aktivitas enzim terhadap variasi temperatur.

### **3.4.3.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum**

Penentuan temperatur optimum dengan cara, 50  $\mu\text{L}$  ekstrak kasar tirosin kinase hasil isolasi, ditambah 150  $\mu\text{L}$  Tris-HCl, 200  $\mu\text{L}$  larutan ATP 125 ppm pH 7, dan 200  $\mu\text{L}$  histon 70 ppm. Diinkubasi pada temperatur 35°C selama 20; 25; 30; 35; dan 40 menit. Ditambah 200  $\mu\text{L}$  TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat yang dihasilkan diambil 100  $\mu\text{L}$  dan ditambah Tris-HCl sebanyak 1 mL. Ditentukan temperatur optimum dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang maksimum ATP yaitu 260 nm. Cara penentuan kondisi optimum variasi waktu inkubasi dapat dilihat diagram alir L.4.3 (Lampiran 4). Data yang diperoleh dibuat grafik antara aktivitas enzim terhadap variasi waktu inkubasi.

## **3.4.4 Penentuan Berat Molekul Menggunakan Metode SDS-PAGE**

### **3.4.4.1 Persiapan Gel**

Persiapan gel langkah pertama yang perlu dilakukan adalah disiapkan plat gel dengan cara merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat  $\pm 1$  mm. Gel dibagi menjadi dua jenis yaitu gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*) dan gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*). *Separating gel* dibuat dengan komposisi pada Tabel L.9.1 (Lampiran 9). Kemudian dituangkan

larutan *separating gel* dalam plat dengan menggunakan pipet mikro, dituangkan pula akuades steril di atas gel, dan dibiarkan 10-30 menit sehingga gel memadat. Setelah gel mulai memadat, akuades steril yang ada di atas gel tersebut dibuang. *Stacking gel* dibuat dengan komposisi pada Tabel L.9.2 (Lampiran 9). Dituangkan larutan *stecking gel* di atas *separating gel* yang telah memadat terlebih dahulu dengan pipet mikro. Sisiran dipasang hingga gel memadat dan terbentuk sumuran. Berikutnya setelah gel memadat, sisiran dilepas, plat dipasang pada alat elektroforesis “*set mini protein gel*” dan dituangkan dalam larutan running buffer pada alat tersebut.

#### **3.4.4.2 Injeksi Sampel dan Running**

Isolat tirosin kinase dipipet sebanyak 2 $\mu$ l dan dimasukkan dalam tabung mikro. Ditambah 13 $\mu$ L Tris-Cl dan 15  $\mu$ L RBS, dilanjutkan pemanasan pada temperatur 100<sup>0</sup>C selama 5 menit. Didinginkan pada temperatur kamar, kemudian disuntikkan ke dalam sumur. Dilakukan running dengan arus 30 mA, 600 V selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda  $\pm$  0,5 cm dari batas bawah plat. Gel hasil running, direndam dalam larutan *staining* (pewarna) sambil digoyang selama 30 menit, kemudian gel di pindah dan direndam dalam larutan *destaining* (penghilang warna) sambil digoyang selama 30 menit sampai bening. Pita-pita hasil elektroforesis discan dan ditentukan Berat molekul tirosin kinase, sehingga didapatkan data.

#### **3.5 Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam pola rancangan acak lengkap sederhana (RAL) dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) (Lampiran 7).



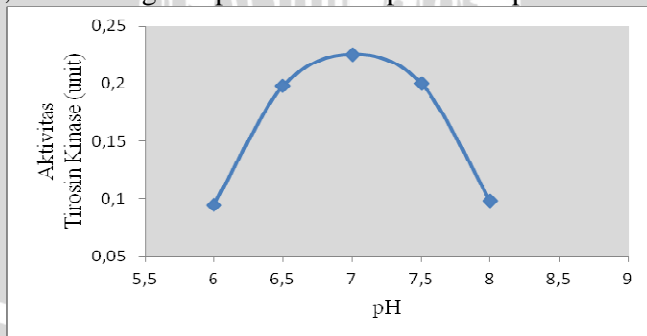
## BAB IV PEMBAHASAN

Karakterisasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dilakukan melalui beberapa tahap antara lain isolasi tirosin kinase, penentuan berat molekul tirosin kinase, serta penentuan kondisi optimum aktivitas tirosin kinase yang meliputi pH, temperatur dan waktu inkubasi.

### 4.1 Penentuan Kondisi Optimum Ekstrak Kasar Tirosin Kinase

Tirosin kinase merupakan salah enzim yang mengatur hubungan antar sel, diferensial, pergerakan sel, kematian sel dan adhesi. Enzim tersebut memiliki aktivitas seperti enzim yang lain, yaitu aktivitasnya dapat dipengaruhi pH, temperatur, waktu inkubasi, aktivator dan inhibitor. Untuk mengetahui aktivitas maka dilakukan penentuan kondisi optimum aktivitas tirosin kinase yang didasarkan banyaknya ATP yang bereaksi untuk menrasfer fosfat. Untuk penentuan kondisi optimum tirosin kinase perlu diketahui panjang gelombang maksimum ATP dan kurva baku ATP dapat dilihat pada Lampiran 6.

pH merupakan salah satu kondisi untuk menentukan karakteristik enzim dalam bekerja secara maksimal. Tinggi rendahnya pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim, karena adanya perubahan konformasi gugus aktif pengikat substrat. Penentuan pH optimum dalam penelitian ini dilakukan dengan memberikan pengaruh pH terhadap aktivitas tirosin kinase dengan variasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8. Pengaruh pH tersebut dapat dilihat pada Gambar 7:



**Gambar 7.** Kurva hubungan pH dengan aktivitas tirosin kinase

Pada gambar 7 menunjukkan bahwa variasi pH dapat mempengaruhi nilai aktivitas tirosin kinase yang berbeda. Aktivitas maksimum yang ditunjukkan dari kurva diatas yaitu pada pH 7 dengan aktivitas sebesar 0,225 unit. Maka pH optimum tirosin kinase yaitu pada pH 7 untuk menghasilkan produk secara maksimal. Pada kondisi pH sebelum dan sesudah pH optimum, dapat dilihat pada gambar 7 menunjukkan bahwa pada pH tersebut memiliki aktivitas rendah. Menurut martin (1986), pH ekstrim dapat menurunkan aktivitas enzim. Menurut Winarno (1986), keaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan oleh terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim- substrat.

pH optimum merupakan pH dimana enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan yaitu gugus pemberi dan penerima proton pada sisi aktif enzim dan substrat sesuai. Pada sisi aktif enzim tirosin kinase terjadi pelepasan proton pada gugus tiol (SH) yaitu sistein, sehingga atom S bersifat nukleofil dan akan berikatan dengan gugus fosfat yang berada di substrat. Pada pH 7 terjadi pelepasan proton lebih banyak untuk menyeimbangkan banyak ion OH<sup>-</sup> dilingkungannya, sehingga aktivitas enzim untuk mengikat fosfat menjadi maksimum.

Pada pH 6,0 aktivitas yang ditunjukkan merupakan aktivitas tirosin kinase paling rendah dibandingkan dengan aktivitas pH 6,5. Hal ini dikarenakan bahwa konsentrasi H<sup>+</sup> yang tinggi dapat mengakibatkan sulit terjadinya pelepasan proton pada gugus tiol (SH) sehingga tidak terbentuknya nukleofil yang akan berikatan dengan fosfat. Diantara pH 6 sampai pH 7 terjadi peningkatan aktivitas tirosin kinase, namun tidak maksimum. Dimungkinkan pada kondisi pH lingkungan semakin tinggi, konsentrasi OH<sup>-</sup> juga semakin tinggi sehingga dapat membantu pelepasan gugus tiol (SH). Pada pH 6-7 ini tirosin kinase banyak yang berikatan dengan substrat (fosfat) sehingga aktivitasnya semakin tinggi.

pH 7 merupakan pH optimum yang digunakan sebagai variabel tetap untuk penentuan temperatur optimum maupun penentuan waktu inkubasi optimum. Aktivitas tirosin kinase akan menurun pada pH diatas 7, karena terjadinya penolakan sisi aktif enzim yang bermuatan negatif (COO<sup>-</sup>) dengan gugus fosfat, sehingga atom S sulit berikatan dengan fosfat.



Berdasarkan hasil analisis statistik uji F (Lampiran 7) menunjukkan adanya perbedaan nyata, dimana nilai  $F_{hitung} > F_{tabel}$  yang berarti pH berpengaruh nyata terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan. Sedangkan dari uji BNT 5% untuk melihat perbedaan antara perlakuan.

**Tabel 4.1** Pengaruh pH terhadap aktivitas tirosin kinase

pH	rataan aktivitas (unit)	Notasi
6	$0,095 \pm 1,6 \times 10^{-2}$	a
8	$0,098 \pm 0,777 \times 10^{-2}$	a
6,5	$0,198 \pm 0,702 \times 10^{-2}$	b
7,5	$0,2 \pm 0,346 \times 10^{-2}$	b
7	$0,225 \pm 0,436 \times 10^{-2}$	c

Keterangan:

a = tidak berpengaruh nyata

b = tidak berpengaruh nyata

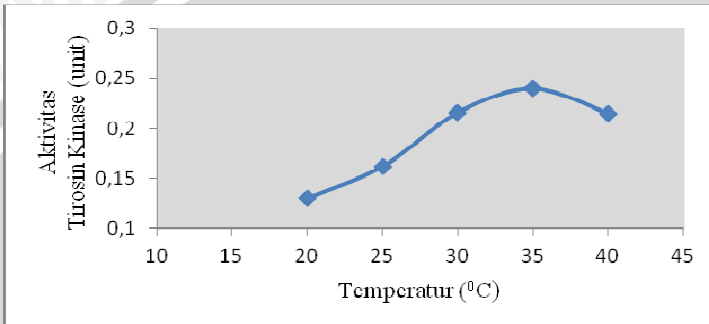
c = berpengaruh nyata

Dari tabel diatas menunjukkan bahwa pada variasi pH 6 dan 8 tidak menunjukkan pengaruh yang nyata ( $p > 0,05$ ), karena aktivitas tirosin kinase hampir sama. begitu juga pada variasi pH 6,5 dan 7,5, Sedangkan pada pH 7 menunjukkan pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) karena memiliki aktivitas tertinggi. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa pH optimum tirosin kinase yaitu pH 7 dengan aktivitas 0,225 unit.

Temperatur lingkungan enzim dapat mempengaruhi reaksi yang dikatalisis oleh enzim seperti halnya reaksi kimia yang lain. Kenaikan temperatur akan meningkatkan energi kinetik molekul dalam enzim yang bereaksi, karena banyaknya molekul yang bertumbukan dengan cepat. Namun tidak semua pada kondisi temperatur dapat meningkatkan aktivitas enzim, pada temperatur tertentu justru menurunkan aktivitas enzim, karena enzim dapat rusak pada temperatur yang tinggi yaitu temperatur diatas temperatur optimum. Sehingga enzim yang berinteraksi dengan substrat menjadi terhambat, yang mengakibatkan turunya aktivitas enzim dan enzim terdenaturasi.

Pengujian pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dilakukan pada variasi temperatur 20, 25, 30, 35, dan 40°C. Menurut

Lehninger (1995), pada umumnya aktivitas enzim terjadi pada temperatur berkisar pada 30-40<sup>0</sup>C dan akan mengalami denaturasi pada temperatur diatas 50<sup>0</sup>C. Pengaruh variasi temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan ditunjukkan pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Kurva hubungan temperatur dengan aktivitas tirosin kinase.

Pada temperatur 20-35<sup>0</sup>C mengalami kenaikan aktivitas, karena adanya peningkatan temperatur yang dapat meningkatkan energi kinetik sehingga frekuensi tumbukan antar molekul enzim dengan substrat semakin besar, sehingga produk meningkat sampai pada temperatur optimum. Temperatur optimum ditunjukkan pada 35<sup>0</sup>C, dimana pada temperatur tersebut substrat bereaksi dengan enzim untuk menghasilkan produk secara maksimum. Temperatur optimum yang ditunjukkan pada temperatur 35<sup>0</sup>C menunjukkan aktivitas enzim sebesar 0,24 unit. Hal ini sesuai dengan pendapat Winarno (1986) bahwa semakin tinggi temperatur, aktivitas enzim akan semakin besar sampai batas tertentu. Bila temperatur sangat tinggi, maka energi kinetik molekul enzim menjadi semakin besar sehingga melampaui energi yang dibutuhkan untuk memecah ikatan-ikatan yang mempertahankan enzim pada struktur alaminya atau pada keadaan katalitik aktif. Akibatnya terjadi kerusakan struktur enzim dimana sebagian ikatan yang menjaga struktur enzim putus sehingga molekul enzim akan terbuka. Dengan terbukanya molekul enzim mengakibatkan kerusakan sisi aktif enzim, sehingga aktivitas enzim berkurang (Martin *et al.*, 1983). Hal ini dapat diketahui pada

aktivitas tirosin kinase yang menurun pada temperatur diatas temperatur 35<sup>0</sup>C.

Setelah dilakukan analisis statistik uji BNT 5% untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan dimana data ditunjukkan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2** Pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase

Temperatur (°C)	rataan aktivitas (unit)	Notasi
20	$0,13 \pm 0,611 \times 10^{-2}$	a
25	$0,16 \pm 0,656 \times 10^{-2}$	b
40	$0,215 \pm 1,007 \times 10^{-2}$	b
30	$0,216 \pm 1,40 \times 10^{-2}$	c
35	$0,24 \pm 0,611 \times 10^{-2}$	d

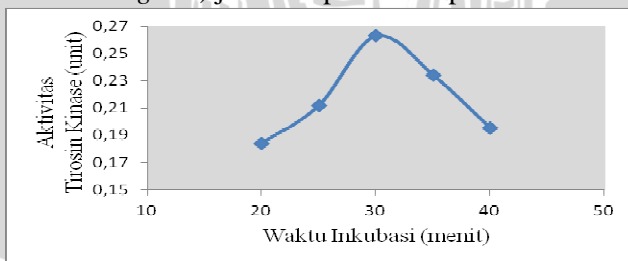
Keterangan:

a, c dan d = berpengaruh nyata

b = tidak berpengaruh nyata

Temperatur 20, 30 dan 35 °C memberikan pengaruh nyata terhadap temperatur 25 dan 40°C. Aktivitas tirosin kinase yang optimum dapat ditunjukkan pada temperatur 35<sup>0</sup>C. Dengan demikian dapat diketahui bahwa temperatur optimum tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan adalah pada temperatur 35<sup>0</sup>C dengan aktivitas sebesar 0,24 unit.

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Pengujian pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase dilakukan pada variasi waktu inkubasi 20, 25, 30, 35, dan 40 menit. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Kurva hubungan waktu inkubasi dengan aktivitas tirosin kinase.

Waktu inkubasi optimum yang ditunjukkan dalam gambar diatas dicapai pada waktu inkubasi 30 menit. Sebelum mencapai kondisi optimum aktivitas enzim akan meningkat sampai pada titik optimum, sedangkan pada waktu inkubasi diatas titik optimum yaitu diatas 30 menit aktivitas tirosin kinase mengalami penurunan dengan seiring bertambahnya waktu inkubasi.

Kondisi dibawah waktu inkubasi optimum aktivitas tirosin kinase kecil, karena waktu untuk bereaksi sangat singkat dan ketika reaksi dihentikan produk yang dihasilkan belum terbentuk secara maksimal. Peningkatan produk terjadi seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi hingga mencapai waktu inkubasi optimum yaitu 30 menit. Pada waktu inkubasi optimum substrat bereaksi dengan enzim sehingga terbentuk produk secara maksimal. Namun untuk reaksi setelah waktu inkubasi optimum aktivitas enzim menurun dikarenakan jumlah reaksi enzimatis tidak sebanding dengan produk yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan pendapat Darnosuwito (1987), bahwa waktu reaksi berbanding terbalik dengan aktivitas enzim.

Hasil analisis statistik waktu inkubasi optimum tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel L.7.3 (Lampiran 7) terlihat bahwa terdapat pengaruh nyata pada perlakuan variasi waktu inkubasi dimana  $F_{hitung} > F_{tabel}$ . Setelah dilakukan analisis statistik uji BNT 5% untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan dimana data ditunjukkan pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3** Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

Waktu inkubasi	Rataan Aktivitas (unit)	Notasi
20	$0,184 \pm 0,058 \times 10^{-2}$	a
40	$0,195 \pm 0,854, \times 10^{-2}$	b
25	$0,212 \pm 0,8 \times 10^{-2}$	c
35	$0,234 \pm 0,2 \times 10^{-2}$	d
30	$0,263 \pm 0,115 \times 10^{-2}$	e

Keterangan:

a, b, c, d, dan e = berpengaruh nyata

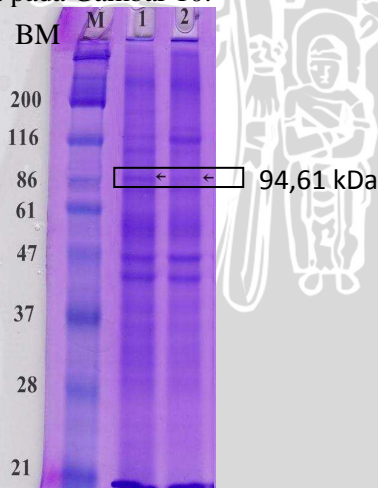
Pada variasi waktu inkubasi 20-40 menit memberikan pengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap aktivitas enzim. Aktivitas tirosin kinase yang optimum ada pada waktu inkubasi 30 menit. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa waktu inkubasi optimum



tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yaitu pada waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas sebesar 0,263 unit.

#### 4.2 Penentuan Berat Molekul Relatif Tirosin Kinase

Penentuan berat molekul tirosin kinase dapat ditentukan dengan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Penggunaan SDS berfungsi untuk memisahkan dan mengetahui berat molekul tirosin kinase. SDS merupakan detergen lemah yang akan mengikat protein dan memutuskan ikatan antar subunit protein. Dalam hal ini dipergunakan juga suatu pereaksi tiol seperti  $\beta$ -merkaptotanol untuk mereduksi semua ikatan disulfida yang ada pada protein. Penentuan berat molekul menggunakan metode SDS-PAGE, didasarkan pada pergerakan partikel bermuatan melalui suatu gel yang dikarenakan adanya pengaruh medan listrik. Pita-pita protein yang terbentuk dari hasil elektroforesis terdapat satu pita protein yang ditentukan, dengan menunjukkan nilai berat molekul dari ekstrak kasar tirosin kinase. Berat molekul tersebut dapat ditentukan dengan perhitungan massa molekul relatif dari sampel tirosin kinase yang diperoleh dengan mengkonversikan nilai  $R_f$  kepersamaan regresi dari kurva baku standar berat molekul protein (Lampiran 8). Hasil elektroforesis yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 10:



**Gambar 10.** Pita protein hasil elektroforesis



Keterangan:

M = marker

1 dan 2 = ekstrak kasar tirosin kinase

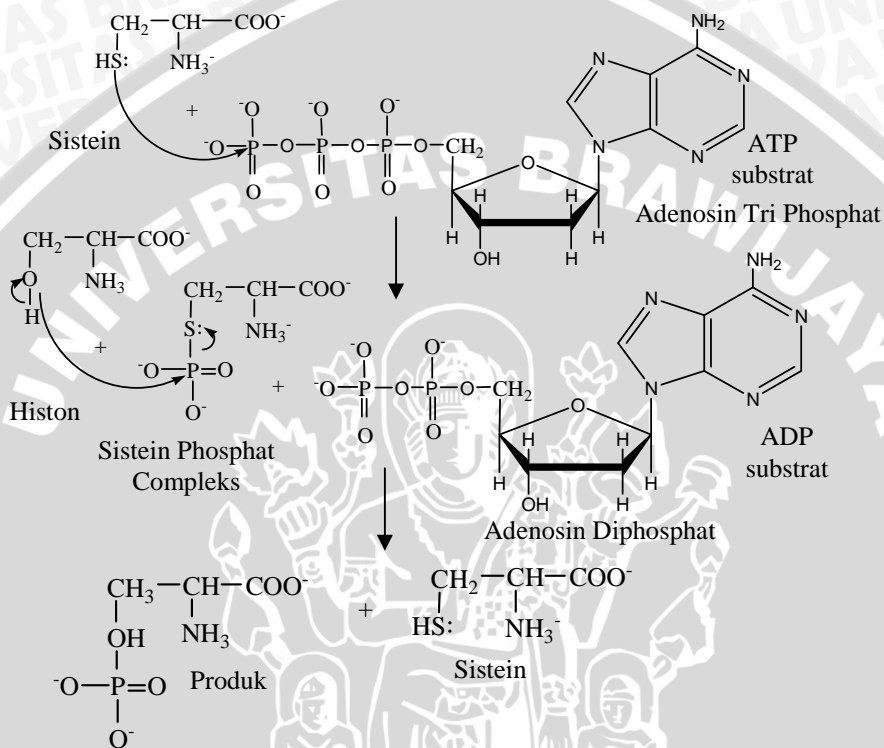
Ekstrak kasar dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan mengandung tirosin kinase dengan berat molekul 94,61 kDa, dapat dilihat pada Tabel 4.4:

**Tabel 4.4** Berat molekul setiap pita

Pita ke-	BM (kDa)
1	164,009
2	112,225
3	106,016
<b>4</b>	<b>94,61</b>
5	86,049
6	68,529
7	58,879
8	50,589
9	41,847
10	37,345
11	33,327
12	16,835

Hasil elektroforesis ekstrak kasar spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan pada pita ke-4 dengan berat molekul 94,61 kDa diyakini sebagai berat molekul enzim tirosin kinase, karena sesuai pendapat Aitken (1998) berat molekul tirosin kinase yang di temukan dari hasil isolasi spermatozoa sapi yaitu sebesar 95 kDa.

Tirosin kinase termasuk salah satu enzim yang ada dalam spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan. Tirosin kinase memiliki sisi aktif golongan dari salah satu asam amino yang mempunyai gugus tiol (SH) yaitu sistein. Dimana sistein mengandung S yang bermuatan negatif, S tersebut akan menyerang fosfat (P) yang ada pada ATP, sehingga fosfat dari ATP akan lepas dan terbentuk ADP dan sistein fosfat. Kemudian terjadi substitusi dari histon dengan sistein fosfat, sehingga dapat terbentuk sistein kembali dan produk, mekanisme aktivitas tirosin kinase dapat ditunjukkan pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Mekanisme aktivitas tirosin kinase

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan yaitu pada pH 7, temperatur optimum  $35^{\circ}\text{C}$ , dan waktu inkubasi optimum 30 menit dengan aktivitas sebesar 0,263 unit.
2. Berat molekul yang dimiliki tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan sebesar 94,61 kDa.

### 5.2 Saran

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh penambahan penghambat aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan.

## DAFTAR PUSTAKA

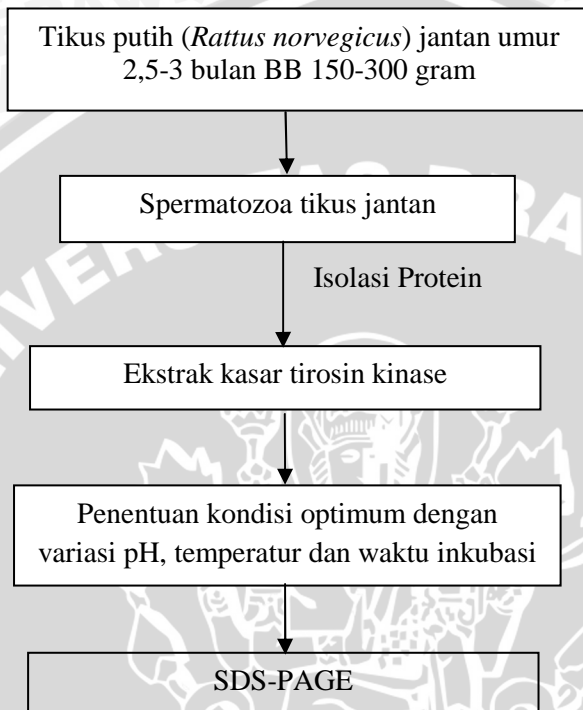
- Adi, P.D., R. Richa, H. Hanik, S. Fransisca, dan P.S. Ratna, 2011, **Penggunaan Enzim Dalam Industri Pangan**, Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Aitken, R.J., D. Harkiss, W. Knox, M. Peterson and D.S Irvine, 1998, **A Novel Transduction cascade in Capacitating Human Spermatozoa Characterised by a Redox-regulated, camp-mediated Induction Of Tyrosine Phosphorylation**, MRC Reproductive Biology Unit. 27 Chalmers Steet, Edinburgh EH3 9EQ, Scotland. Pp.645-654.
- Akhyasrinuki, 2011, **Definisi Dan Fungsi Enzim, Pengertian Koenzim Dan Sifat-Sifat Khusus**, [Http://Id.Shvoong.Com/Writing-AndSpeaking/2150299/Definisi-Dan-Fungsi-Enzim-Pengertian/](http://id.shvoong.com/writing-and-speaking/2150299/definisi-dan-fungsi-enzim-pengertian/), Diakses Tanggal 1 Februari 2013.
- Bruce, A., 2002, **Molecular Biology of The Cell, 4th Ed**, Garland Science: United States.
- Burkin, H.R., and Miller, D.J., 2000, **Zona Pellucida Protein Binding Ability of Porcine Sperm During Epididymal Maturation and The Acrosomal Reproduction**, dev. Biol, jun.1 222(1):99-109.
- Chung, E., Y. Young-Chul, K. Hee-Woong, C. Ki-Ho, J. Je-Cheon, and L. Ki-Young, 2009, **Ultrastructure Of Germ Cells And The Functions Of Leydig Cells And Sertoli Cells Associated With Spermatogenesis In *Pampus Argenteus* (Teleostei: Perciformes: Stromateidae)**, *Department Of Marine Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Korea*.
- Dewi, A., K., 2009, **Kajian Brusellosis Pada Sapi Dan Kambing Potong Yang Dilalulintaskan Di Penyeberangan Merak Banten**, Sekolah Pasca Sarjana, IPB, Bogor.

- Dharani and Aiyer, 2004, **Effect of C:N Ratio on Alpha Amylase Production by *Bacillus Licheniformis* SPT 27**, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 3 (10), hal 519-522.
- Fendik, A., R., 2003, **Metode Imonologi**, Airlangga University Press, Surabaya.
- Girindra, 1993, **Biokimia I**, PT Gramadia Pustaka Utama, Jakarta.
- Huckins, C., 1978. **The Morphology And Kinetics Of Spermatogonial Degeneration In Normal Adult Rat: Ananalysis Using A Simplified Classification Of The Germinal Epithelium**. *The Anatomical Record* , 190,905-926.
- Kusnawijaja, K., 1983, **Biokimia**, Penerbit Alumni, Bndung.
- Lehninger, A.L., 1995, **Dasar-Dasar Biokimia**, Ahli Bahasa: Maggy Tenawijaya, Erlangga, Jakarta.
- Leyton,L.,P.Leguen, D.Bunch and P.M. Saling., 1992. **Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase**. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 89. 11692 – 11695.
- Madyawati, S. P. dan P. Srianto, 2007, **Optimasi Aktivitas Tyrosin Kinase Hasil Isolasi Dari Spermatozoa Sapi Perah Friesian Holstein (FH)**, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Vol. 23, No. 3
- Martin, D. W., Rowell, V. W., 1983, **Harper's Review of Biochemistry, 19<sup>th</sup> edition**, lange Medical Publicating, Maruzen Asia, Singapura.
- Mochtar, R., 1998, **Sinopsis Obtetri: Obstetri Fisiologi-Obsteri Patologi, Ed.2**, EGC, Jakarta.
- Muchtadi D.S., Palupi N. S., Dan Astawan M., 1992. **Enzim Dalam Industri Pangan**, PAU Pangan Dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
- Muhaiminrifai, 2011, **Buku Ajar Fisiologi I**, Universitas Brawijaya, Malang.

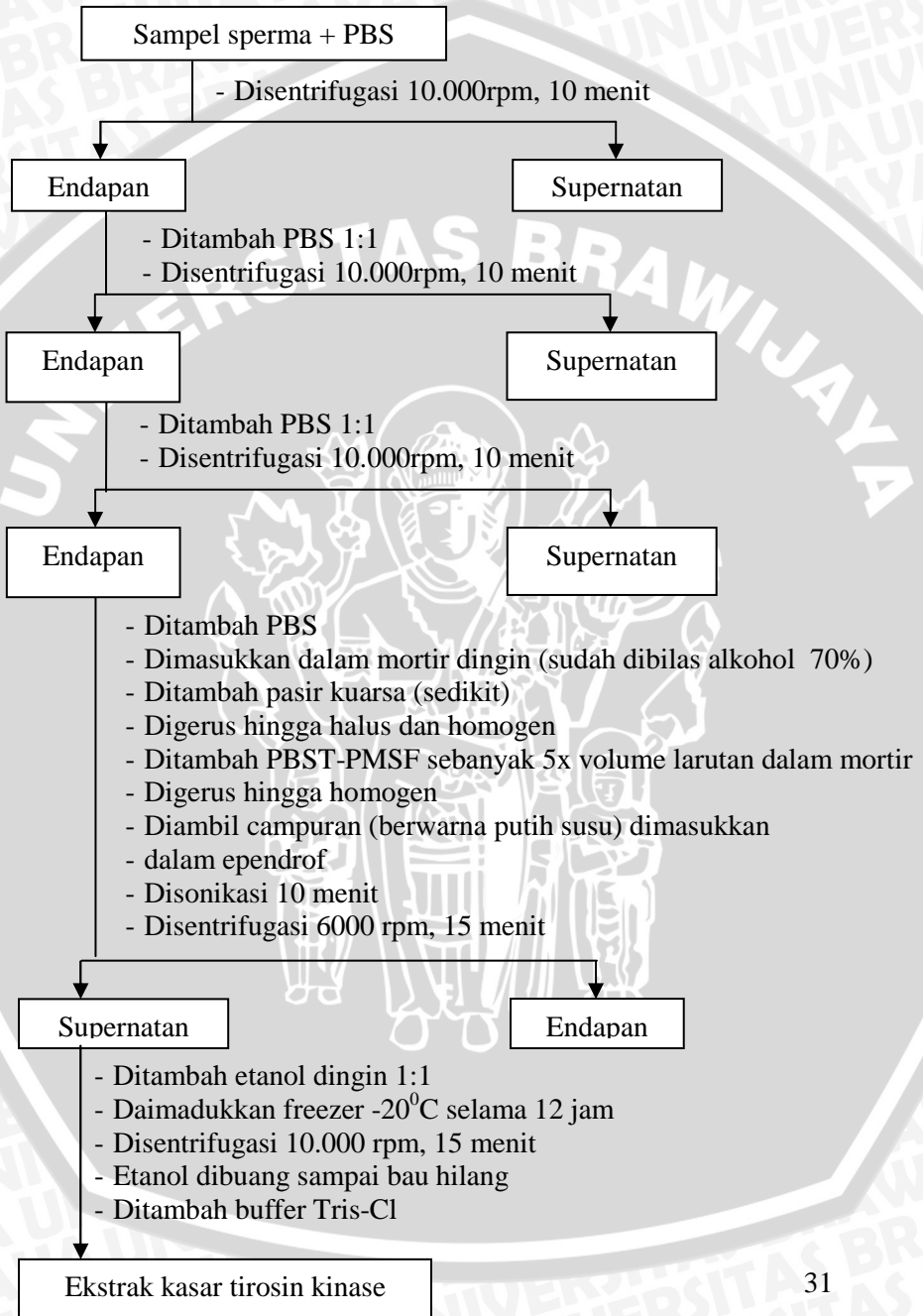


- Nie, G., 2005, **PC6: A target for preventing pregnancy and HIV infection**, [www.princehenrys.org/PC6-is-a-potential-target-for-contraception](http://www.princehenrys.org/PC6-is-a-potential-target-for-contraception), tanggal akses 23 januari 2013.
- Page, D.S., 1985, **Prinsip Biokimia**, Edisi ke-2, Alih Bahasa; Adji Dharma, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Poedjiadi, A. Dan Supriyanti F. M. T., 2006, **Dasar-Dasar Biokimia**, UI Press, Jakarta.
- Rodwell, V. W., 1988, **Harper's Review Biochemistry**, edisi 20, terjemahan Aji Dharma, Penerbit EGC Buku Kedokteran, Jakarta.
- Sari, R.H., 2006, **Karakterisasi Tirosin Kinase dari Spermatozoa Sapi Perah**, Universitas Brawijaya, Malang
- Sherwood, 2001, **Fisiologi Epididimis dan Duktus (Vas) Deferens**, [www.rashekimsar.com/epididimis-dan-duktus-vas-deferens](http://www.rashekimsar.com/epididimis-dan-duktus-vas-deferens), tanggal akses 23 Februari 2013
- Tanti, 2011, **Proses Isolasi Enzim**, <http://www.artikelkimia.info/proses-isolasi-enzim->, tanggal akses 21 Januari 2013
- Taufik E., 1992, **Fermentasi Media Padat Kulit Buah Coklat oleh *Aspergillus sp* untuk Produksi Pektinase**, *Skripsi*, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- Tranggono dan Sutardi, 1990, **Biokimia dan Teknologi Pasca Panen, PAU Pangan dan Gizi**, Gajahmada University Press, Yogyakarta.
- Voet, D. and J. Voet, 1990, **Biochemistry**, John Willey and Sons, London.
- Winarno, 1986, **Enzim Pangan, Cetakan ke -3**, Penerbit PT. Gramedia, Pustaka Utama, Jakarta.

## Lampiran 1. Tahap Penelitian

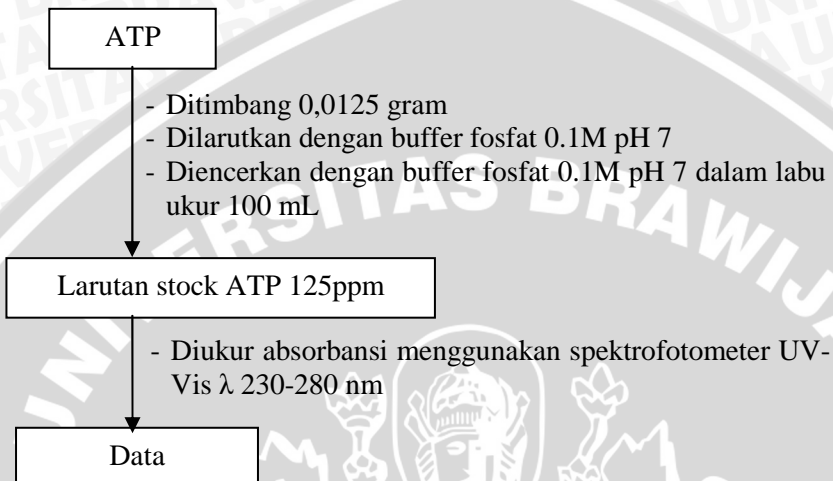


## Lampiran 2. Isolasi Tirosin Kinase dari Spermatozoa

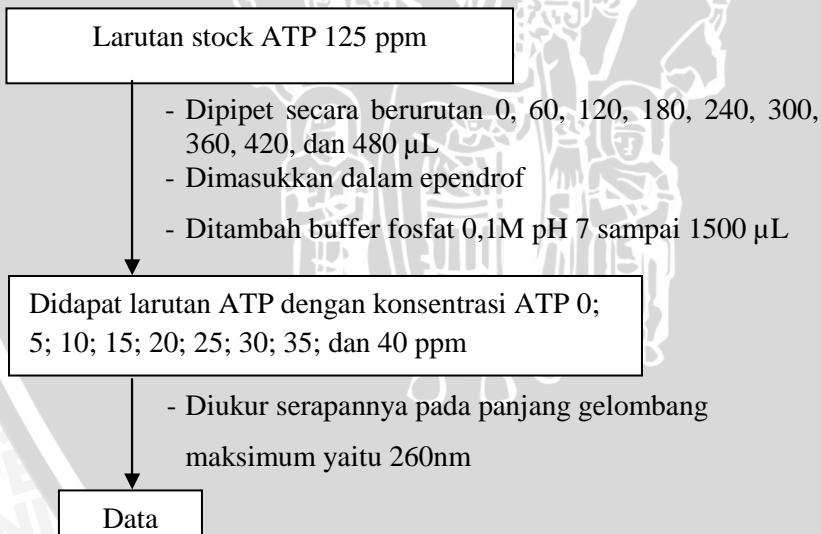


### Lampiran 3. Uji Aktivitas Tirosin Kinase

#### L.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ATP

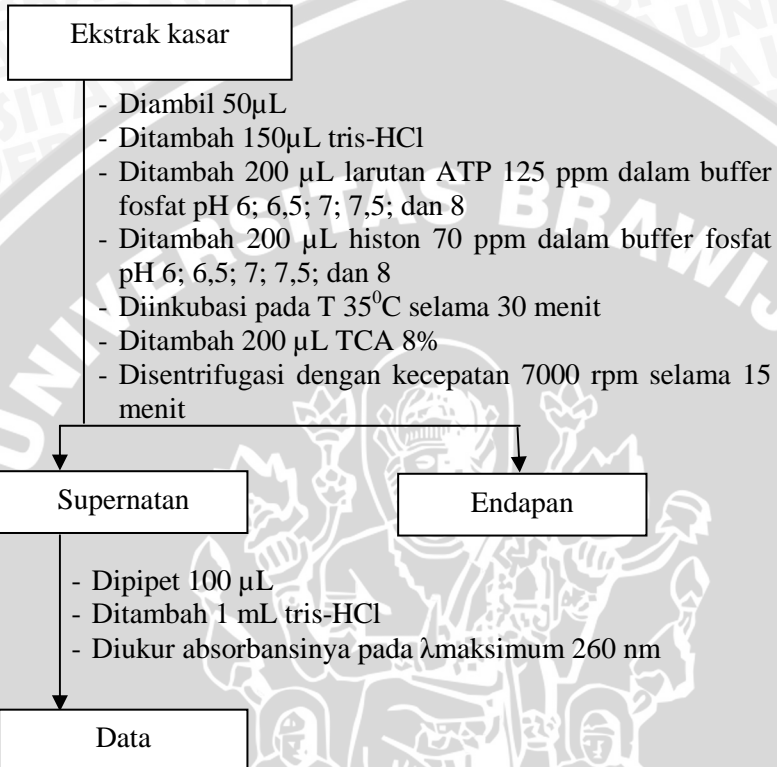


#### L.3.2 Pembuatan Kurva Baku ATP



## Lampiran 4. Penentuan Kondisi Optimum

### I.4.1 Penentuan pH Optimum





## L.4.2 Penentuan Temperatur Optimum

Ekstrak kasar

- Diambil 50 $\mu$ L
- Ditambah 150 $\mu$ L tris-HCl
- Ditambah 200  $\mu$ L larutan ATP 125 ppm
- Ditambah 200  $\mu$ L histon 70 ppm
- Diinkubasi pada variasi temperatur 20, 25, 30, 35, dan 40<sup>0</sup>C selama 30 menit
- Ditambah 200  $\mu$ L TCA 8%
- Disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 15 menit

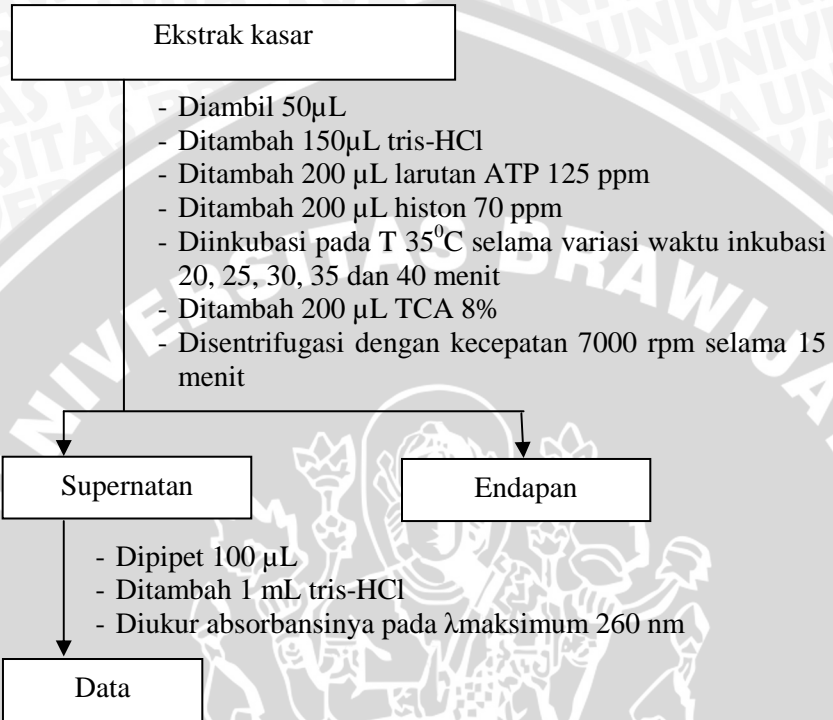
Supernatan

- Dipipet 100  $\mu$ L
- Ditambah 1 mL tris-HCl
- Diukur absorbansinya pada  $\lambda$  maksimum 260 nm

Data

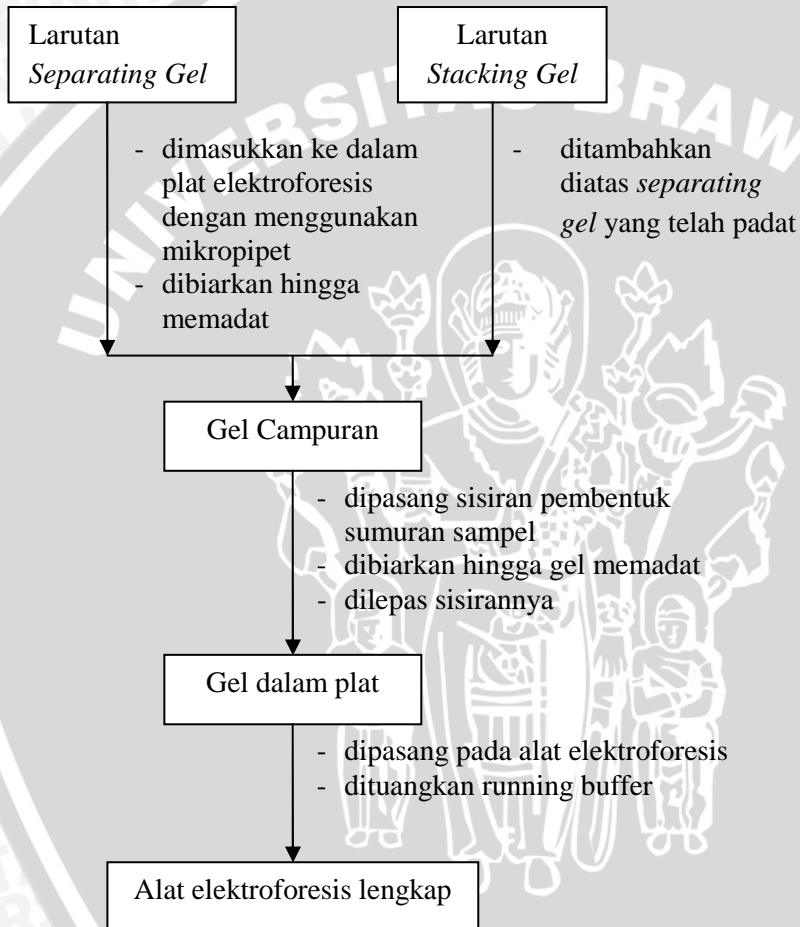
Endapan

### L.4.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

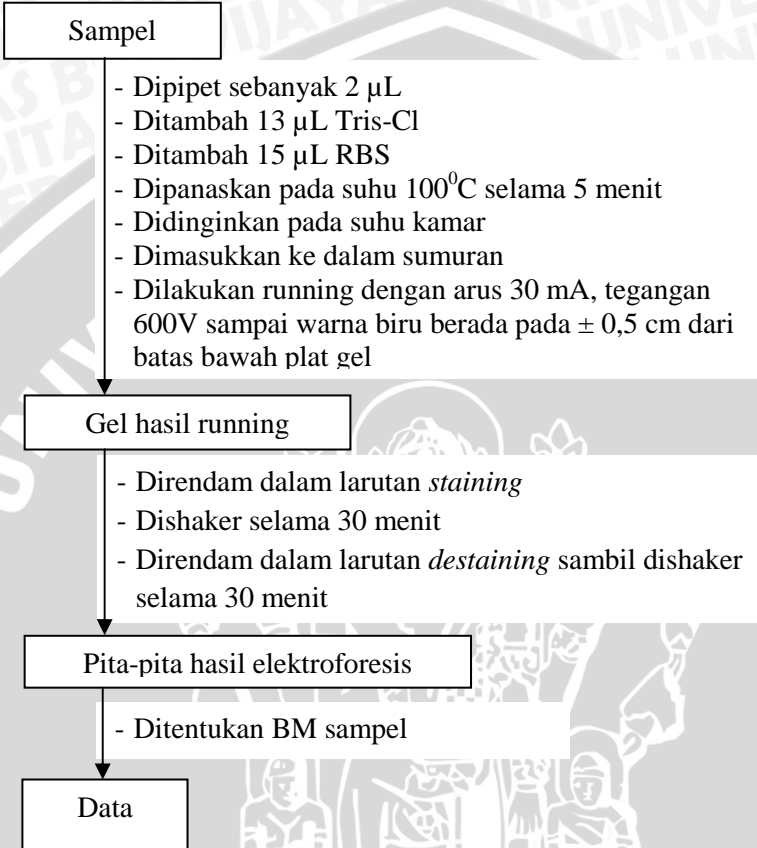


## Lampiran 5. Penentuan Berat Molekul Dengan Metode SDS-PAGE

### L.5.1 Persiapan Gel



## L.5.2 Injeksi Sampel dan Running



## Lampiran 6. Uji Aktivitas Tirosin kinase

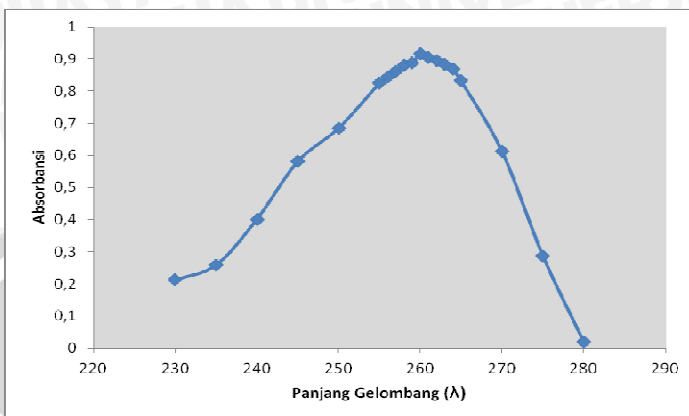
### L.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Baku ATP

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan metode spektrometri UV-vis, dengan mengukur nilai serapan larutan baku ATP pada panjang gelombang kisaran 230-280 nm. Absorbansi tertinggi pada panjang gelombang maksimum yaitu 260 nm sebesar 0,917.

**Tabel L.6.1** Nilai serapan larutan baku ATP pada berbagai panjang gelombang

No.	$\lambda$	absorbansi
1	230	0,213
2	235	0,259
3	240	0,401
4	245	0,581
5	250	0,685
6	255	0,825
7	256	0,844
8	257	0,862
9	258	0,881
10	259	0,889
<b>11</b>	<b>260</b>	<b>0,917</b>
12	261	0,905
13	262	0,895
14	263	0,884
15	264	0,868
16	265	0,832
17	270	0,613
18	275	0,288
19	280	0,02





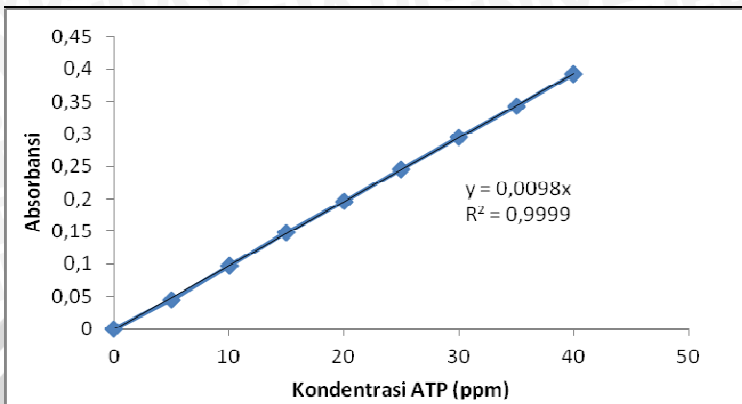
**Gambar 12.** penentuan panjang gelombang maksimum

### L.6.2 Pembuatan Kurva Baku ATP pada $\lambda_{\max}$ 260 nm

Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum ATP dapat ditentukan kerva baku ATP pada panjang gelombang 260 nm.

**Tabel L.6.2** nilai absorbansi dari konsentrasi ATP bertingkat pada  $\lambda_{\max}$  260 nm

Konsentrasi (ppm)	absorbansi
0	0
5	0,045
10	0,098
15	0,149
20	0,196
25	0,246
30	0,295
35	0,343
40	0,393



**Gambar 13.** penentuan kurva baku ATP



## Lampiran 7. Penentuan Aktivitas Tirosin kinase

Analisis data menggunakan analisis ragam pola rancangan acak lengkap sederhana (RAL) dan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$

2. Menghitung jumlah kuadrat (JK)

a. JK total =  $\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$

b. JK perlakuan (JK<sub>p</sub>) =  $\frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_1} - FK$

c. JK galat percobaan (JK<sub>G</sub>) = JK<sub>total</sub> - JK<sub>perlakuan</sub>

3. Menghitung kuadrat tengah (KT) setiap sumber karagaman

a. Kuadrat Tengah perlakuan (KT<sub>p</sub>) =  $\frac{JK_p}{db_{perlakuan}}$

b. Kuadrat Tengah galat percobaan (KT<sub>G</sub>) =  $\frac{JK_{GP}}{db_{percobaan}}$

4. Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_G}$$

Keterangan: Y<sub>ij</sub> = aktivitas Tirosin Kinase  
p = banyaknya percobaan  
n = banyaknya ulangan

5. Menghitung nilai BNT 5%

$$BNT (\alpha) = t_{dbg}^{\alpha/2} \sqrt{\frac{2KTgalat}{n}}$$

**L.7.1 Data Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase**

**Tabel L.7.1** Data Statistik Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

pH	Absorbansi			Rata-rata	Aktivitas (unit)			Rata-rata
	A1	A2	A3		I	II	III	
6	0,205	0,234	0,218	0,219	0,11	0,078	0,096	0,095
6,5	0,118	0,132	0,122	0,124	0,204	0,189	0,200	0,198
7	0,093	0,098	0,105	0,099	0,232	0,226	0,218	0,225
7,5	0,124	0,118	0,124	0,122	0,198	0,204	0,198	0,2
8	0,221	0,214	0,213	0,216	0,093	0,100	0,101	0,098
Jumlah								0,816

Diketahui :  $y = ax$

$$0,205 = 0,0098x$$

$$x = 20,918 \mu\text{g/mL}$$

Nilai x merupakan banyaknya ATP yang digunakan dalam reaksi tranfer fosfat. Ditentukan juga konsentrasi ATP dalam sampel

$$125 \text{ ppm} \times 200 \mu\text{L} = M_2 \times 800 \mu\text{L}$$

$$M_2 = 31,25 \text{ ppm}$$

Contoh penentuan aktitavis tirosin kinase

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas} &= \frac{(ATP_{awal} - ATP_{akhir})}{BM \text{ ATP}} \times \frac{V}{p \times q} \times fp \\ &= \frac{(31,25 - 20,918) \mu\text{g/mL}}{551,1 \mu\text{g}/\mu\text{mol}} \times \frac{0,8 \text{ mL}}{0,05 \text{ mL} \times 30 \text{ menit}} \times 11 \\ &= 0,11 \text{ unit} \end{aligned}$$

Untuk faktor pengenceran yaitu 100  $\mu\text{L}$  sampel dalam 1000  $\mu\text{L}$  tris-HCl.

Contoh:

1. Penentuan faktor korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{np}$$

$$FK = \frac{2,447^2}{3 \times 5}$$
$$= 0,399 \text{ unit}$$

2. Penentuan Jumlah Kuadrat (JK)

a. JK total =  $\left[ \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (Y_{ij})^2 \right] - FK$

$$JK_{\text{total}} = (0,11^2 + 0,078^2 + \dots + 0,101^2) - 0,399$$
$$= 0,0468 \text{ unit}^2$$

b. JK perlakuan (JKp) =  $\frac{\left[ \sum_{i=1}^p \left( \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right)^2 \right]}{n_i} - FK$

$$JK_p = \frac{0,284^2 + 0,593^2 + 0,676^2 + 0,6^2 + 0,294^2}{3} - 0,399$$
$$= 0,046 \text{ unit}^2$$

c. JK galat percobaan (JKG) = JKtotal - JKperlakuan

$$JK \text{ galat percobaan (JKG)} = 0,0468 - 0,046$$
$$= 0,0008 \text{ unit}^2$$

3. Penentuan Kuadrat Tengah (KT)

a. Kuadrat Tengah perlakuan (KTp) =  $\frac{JK_p}{db_{\text{perlakuan}}}$

$$KT \text{ perlakuan} = \frac{0,046}{4}$$
$$= 0,0115 \text{ unit}^2$$



$$b. \text{ Kuadrat Tengah galat percobaan (KTg)} = \frac{JK_{GP}}{db_{\text{percobaan}}}$$

$$\text{KT galat Percobaan} = \frac{0,0008}{10} \\ = 0,00008 \text{ unit}^2$$

4. Menghitung nilai F

$$F_{\text{hitung}} = \frac{0,0115}{0,00008} \\ = 143,75$$

5.  $F_{\text{tabel}} 5\% = F(0,05; 4, 10) = 3,84$   
 $F_{\text{tabel}} 1\% = F(0,01 ; 4, 10) = 5,99$

**Tabel L.7.2** Analisis ragam satu arah

Sumber	dB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0,01	0,05
Pelakuan	4	0,046	0,0115	143,75	5,99	3,84
Galat	10	0,0008	0,00008			
Total	14	0,0468				

Dari hasil analisis dapat ditunjukkan bahwa  $F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$ , artinya pH berpengaruh terhadap aktivitas tirosin kinase. Data yang telah diperoleh selanjutnya di uji menggunakan uji beda nyata ter kecil (BNT) dengan  $\alpha = 5\%$  untuk mengetahui apakah pada setiap perlakuan memiliki perbedaan.

6. Uji BNT Pada variasi pH

$$\text{BNT } 5\% = t_{\text{tabel}}(0,05/2 ; 10) \sqrt{\frac{2 \times 0,00008}{3}} \\ = 0,0162$$

**Tabel L.7.3** Uji BNT 5% Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

pH	Rataa Aktivitas	0,095	0,098	0,198	0,2	0,225
6	0,095 <sup>a)</sup>	-	0,003	0,103*	0,105*	0,13*
8	0,098 <sup>a)</sup>		-	0,1*	0,102*	0,127*
6,5	0,198 <sup>b)</sup>			-	0,002	0,027*
7,5	0,2 <sup>b)</sup>				-	0,025*
7	0,225 <sup>c)</sup>					-

**L.7.2 Data Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase**

**Tabel L.7.4** Data Statistik Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

Temperatur (°C)	Absorbansi			Rata-rata	Aktivitas			Rata-rata
	A1	A2	A3		I	II	III	
20	0,191	0,187	0,18	0,186	0,125	0,129	0,137	0,130
25	0,158	0,163	0,15	0,157	0,171	0,156	0,171	0,160
30	0,099	0,117	0,106	0,107	0,225	0,205	0,217	0,216
35	0,084	0,071	0,073	0,076	0,241	0,255	0,253	0,240
40	0,115	0,103	0,107	0,108	0,208	0,220	0,216	0,215
Jumlah								0,966

**Tabel L.7.5** Dara Statistika Perhitungan RAL Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

No.	FK	0,556
1.	Jktotal	0,0249
2.	Jk perlakuan	0,0241
3.	JK galat percobaan	0,0008
4.	KT perlakuan	0,006
5.	KT galat percobaan	0,00008
6.	F perlakuan	75
7.	BNT 5%	0,0166

**Tabel L.7.6** Analisis Ragam Satu Arah Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

sumber keragaman	dB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0,01	0,05
perlakuan	4	0,0241	0,006	75016	5,99	3,84
galat	10	0,0008	0,00008			
Total	14	0,0249				

**Tabel L.7.7** Uji BNT 5% Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase

Temperatur (°C)	Rataan Aktivitas	0,130	0,160	0,215	0,216	0,240
20	0,130 <sup>a)</sup>	-	0,03*	0,085*	0,086*	0,11
25	0,160 <sup>b)</sup>		-	0,055*	0,056*	0,08*
40	0,215 <sup>b)</sup>			-	0,001	0,025*
30	0,216 <sup>c)</sup>				-	0,024*
35	0,240 <sup>d)</sup>					-

**L.7.3 Data Statistik Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Tirosin Kinase**

**Tabel L.7.8** Data statistik pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

Waktu (menit)	Absorbansi			Rata-rata	Aktivitas			Rata-rata
	A1	A2	A3		I	II	III	
20	0,138	0,137	0,137	0,137	0,183	0,184	0,184	0,184
25	0,119	0,104	0,11	0,111	0,203	0,22	0,213	0,212
30	0,071	0,057	0,064	0,064	0,255	0,271	0,263	0,263
35	0,089	0,091	0,093	0,091	0,236	0,234	0,232	0,234
40	0,128	0,126	0,125	0,126	0,194	0,196	0,196	0,195
Ju,lah								1,088

**Tabel L.7.9** Dara Statistika Perhitungan RAL pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

No.	FK	
1.	Jktotal	0,71025
2.	Jk perlakuan	0,012
3.	JK galat percobaan	0,0003
4.	KT perlakuan	0,00301
5.	KT galat percobaan	0,00003
6.	F perlakuan	105,37
7.	BNT 5%	0,0097

**Tabel L.7.10** Analisis Ragam Satu Arah pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

sumber keragaman	dB	JK	KT	Fhitung	Ftabel	
					0,01	0,05
perlakuan	4	0,012	0,00301	105,37	5,99	3,84
galat	10	0,0003	0,00003			
Total	14	0,0123				

**Tabel L.7.11** Uji BNT 5% pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

Temperatur (°C)	Rataan Aktivitas	0,184	0,195	0,212	0,234	0,263
20	0,184 <sup>a)</sup>	-	0,011*	0,028*	0,05*	0,078*
40	0,195 <sup>b)</sup>		-	0,017*	0,039*	0,068*
25	0,212 <sup>c)</sup>			-	0,022*	0,051*
35	0,234 <sup>d)</sup>				-	0,029*
30	0,263 <sup>e)</sup>					-

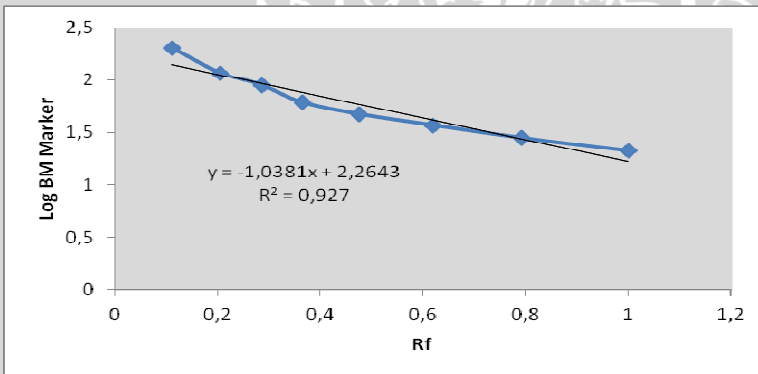
## Lampiran 8. Penentuan Berat Molekul

### L.8.1 Perhitungan penentuan kurva baku standar protein

Tabel L.8.1 Penentuan kurva baku standar protein

No.	Pita BM	Log BM	A (cm)	B (cm)	Rf (a/b)
1.	200	2,301	0,7	6,3	0,111
2.	116	2,06	1,3	6,3	0,206
3.	86	1,949	1,8	6,3	0,286
4.	61	1,785	2,3	6,3	0,365
5.	47	1,673	3	6,3	0,476
6.	37	1,568	3,9	6,3	0,619
7.	28	1,447	5	6,3	0,794
8.	21	1,322	6,3	6,3	1

Setelah didapatkan data dapat diketahui data hasil pengukuran jarak antara garis protein awal ke protein berikutnya dapat ditentukan kurva baku standar protein, yaitu sebagai berikut:



Gambar 14. kurva skunder marker protein



## L. 8.2 Perhitungan Berat Molekul Tirosin Kinase

Tabel L.8.2 Penentuan nilai Rf

No.	A		Rf		
	1	2	1	2	Rata-rata
1	0,3	0,3	0,048	0,048	0,048
2	1,3	1,3	0,206	0,206	0,206
3	1,45	1,45	0,230	0,230	0,230
4	1,75	1,75	0,278	0,278	0,278
5	2	2	0,317	0,317	0,317
6	2,6	2,6	0,413	0,413	0,413
7	3	3	0,476	0,476	0,476
8	3,4	3,4	0,539	0,539	0,539
9	3,9	3,9	0,619	0,619	0,619
10	4,2	4,2	0,667	0,667	0,667
11	4,5	4,5	0,714	0,714	0,714
12	6,3	6,3	1	1	1

Setelah diketahui kerva skunder marker protein dapat dihitung BM dengan cara

$$Y = ax + b$$

$$Y = -1,0381x + 2,2643$$

Contoh pengukuran BM pada 1 pita

$$Y = (-1,0381 \times 0,278) + 2,2643$$

$$= 1,976$$

Nilai Y = Log BM, untuk mendapatkan nilai BM maka nilai Y di hitung anti Log BM

**Tabel L.8.3** Penentuan BM dari anti log BM

pita	Log BM		BM		Rataan BM (kDa)
	1	2	1	2	
1	2,215	2,215	164,009	164,009	164,01
2	2,050	2,050	112,225	112,225	112,225
3	2,025	2,025	106,016	106,016	106,016
4	1,976	1,976	94,610	94,610	94,61
5	1,935	1,935	86,049	86,049	86,049
6	1,836	1,836	68,529	68,529	68,529
7	1,769	1,769	58,879	58,879	58,879
8	1,704	1,704	50,589	50,589	50,589
9	1,622	1,622	41,848	41,848	41,848
10	1,572	1,572	37,345	37,345	37,345
11	1,523	1,523	33,327	33,327	33,327
12	1,226	1,226	16,835	16,835	16,835

## Lampiran 9. Preparasi Larutan

### L.9.1 Larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,2M (Mr=137,99 g/mol)

Berat  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  yang harus ditimbang untuk membuat larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dengan konsentrasi 0,2 M sebanyak 100 mL, adalah:

$$\begin{aligned}\text{Massa NaH}_2\text{PO}_4 &= 137,99 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \\ &= 27,598 \text{ g/L} \\ &= 2,7598 \text{ g/100 mL}\end{aligned}$$

Jadi  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ditimbang sebanyak 2,7598 g, dilarutkan dengan aquades steril, dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan penambahan aquades steril sampai tanda batas.

### L.9.2 Larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2M (Mr=141,96 g/mol)

Berat  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  yang harus ditimbang untuk membuat larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dengan konsentrasi 0,2 M sebanyak 1000 mL, adalah:

$$\begin{aligned}\text{Massa Na}_2\text{HPO}_4 &= 141,96 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ mol/L} \\ &= 28,392 \text{ g/L} \\ &= 7,098 \text{ g/250 mL}\end{aligned}$$

Jadi  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ditimbang sebanyak 7,098 g, dilarutkan dengan aquades steril dalam gelas kimia 100 mL, dan diencerkan dalam labu ukur 250 mL dengan penambahan aquades steril sampai tanda batas.

### L.9.3 Larutan Buffer Fosfat 0,2M pH7

Misal : Volume  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M (sebagai asam) diambil sebanyak 78 mL dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (sebagai basa konjugat)



$$\text{pH} = -\log K_a + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4]}$$

$$7 = -\log 6,2 \times 10^{-8} + \log \frac{0,2\text{M}/V}{0,2\text{M}/78\text{mL}}$$

$$7 = 7,21 + \log \frac{0,2\text{M}/V}{0,2\text{M}/78\text{mL}}$$

$$-0,21 = \log \frac{0,2M/V}{0,2M/78mL}$$

$$\text{antilog} (-0,21) = \frac{0,2M/V}{0,2M/78mL}$$

$$0,6166 \times \frac{0,2M}{78mL} = \frac{0,2M}{V}$$

$$V = \frac{1}{7,9051 \times 10^{-3}}$$

$$= 125,5 \text{ mL}$$

#### L.9.4 Larutan Stock ATP 125 ppm

Ditimbang ATP sebanyak 0,00125 gram, dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7, diencerkan dengan aquades steril dalam labu ukur 10 mL.

#### L.9.5 Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS)

Tahap yang dilakukan untuk membuat larutan Phosphate Buffer Saline (PBS) yaitu menimbang KCL sebanyak 0,05 gram,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 gram, NaCl 2,0 gram dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,525 gram. Selanjutnya semua bahan tersebut dimasukkan dalam gelas kimia 50 mL dan ditambah dengan aquades steril diaduk menggunakan pengaduk magnetik stirer. Setelah itu larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 250mL dan diencerkan dengan penambahan aquades sampai tanda batas.

#### L.9.6 Larutan Histon 70 ppm

Ditimbang histon sebanyak 0,007 gram, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dalam gelas kimia. Diencerkan dengan penambahan aquades steril dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas.

### **L.9.7 Larutan TCA 8%**

Ditimbang TCA sebanyak 0,8 gram. Dilarutkan dengan buffer fosfat pH 7 dalam gelas kimia, kemudian diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan penambahan aquades steril sampai tanda batas.

### **L.9.8 Larutan Buffer Tris-Cl Ph 6,5**

Tahap pembuatan Buffer Tris-Cl 0,02 M pH 6,5 (BM Buffer Tris-HCl = 157,56 g/mol), maka:

$$\begin{aligned} \text{BM Tris-Cl} &= 157,56 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ mol/L} \\ &= 3,1512 \text{ g/L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Untuk 200 mL} &= 3,1512 \text{ g/L} \times 0,2 \text{ L} \\ &= 0,63024 \text{ g} \end{aligned}$$

Jadi Tris-Cl ditimbang sebanyak 0,6324 g dilarutkan dalam 100mL aquades steril dan diatur pH hingga 6,5, kemudian diencerka dengan ditambah aquades dalam labu ukur 200 mL hingga tanda batas.

### **L.9.9 Larutan APS 10%**

Ammonium persulphate ditimbang sebanyak 0,5 gram dan dilarutkan dengan 5,0 mL aquades steril. Dihomogenkan dan disimpan dalam suhu 4°C.

### **L.9.10 Larutan Poliakrilamida (T-Akriil)**

Akriilamida diambil sebanyak 2,92 gram dan bisakriilamida 0,08 gram. Dilarutkan dengan 7,0 mL aquades steril dengan menggunakan pengaduk magnetik. Diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan ditambah aquades sampai tanda batas.

### **L.9.11 Larutan Upper Gel Buffer**

Tris-base ditimbang sebanyak 0,75 gram dan SDS sebanyak 0,04 gram. Dilarutkan dengan 5,0 mL aquades steril. Ditambah HCL 1M sampai pH 6,8 dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan ditambah aquades steril sampai tanda batas.

### **L.9.12 Larutan Lower Gel Buffer**

Tris-base ditimbang sebanyak 1,82 gram dan SDS sebanyak 0,04 gram. Dilarutkan dengan 5,0 mL aquades steril. Ditambah HCL 1M sampai pH 8,8 dan diencerkan dalam labu ukur 10 mL dengan ditambah aquades steril sampai tanda batas.



### L.9.13 Running Buffer

Pembuatan *Running Buffer*, dibuat dengan Tris-Base sebanyak 3,03 gram, glisin 14,40 gram dan SDS sebanyak 1,00 gram. Kemudian dilarutkan dalam 1L aquades steril.

### L.9.14 Larutan Reducing Sampel Buffer (RSB)

Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 diambil dengan mikropipet sebanyak 1,0 mL, gliserol 10% ( $\frac{v}{v}$ ) 1,6 mL, SDS 10% ( $\frac{v}{v}$ ) 1,6 mL, 2-merkaptotanol 5% 0,4 mL, dan Bromofenol 0,1% ( $\frac{v}{v}$ ) 0,2 mL, kemudian diencerkan dalam 8,0 mL aquades steril.

**Tabel L.9.1 Komposisi Separating Gel 12% (1 plate)**

Komposisi pembuatan larutan *Separating Gel* 12%

Bahan	Volume ( $\mu$ L)
LGB	1300
T-akril	2000
dd H <sub>2</sub> O	1700
APS 10%	80
TEMED	8

**Tabel L.9.2 Komposisi Separating Gel 3% (1 plate)**

Komposisi pembuatan larutan *Separating Gel* 3%

Bahan	Volume ( $\mu$ L)
LGB	415
T-akril	267
dd H <sub>2</sub> O	975
APS 10%	20
TEMED	2

### L.9.15 Larutan Staining

Comassie Brilliant Blue ditimbang R-250 sebanyak 0,25 gram, kemudian dilarutkan dengan metanol absolut 45,4 mL dan 9,2 mL asam asetat glasial dalam gelas kimia 100 mL. Diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan ditambah aquades steril sampai tanda batas.

### **L.9.16 Larutan Destaining**

Dipipet 7,0 mL asam asetat glasial dan 7,0 mL metanol absolut, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL dan ditambah aquades steril sampai tanda batas.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## Lampiran 10. Keterangan Kelaikan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

### **KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"**

**No: 165-KEP-UB**

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : ISOLASI DAN KARAKTERISASI TIROSIN KINASE HASIL  
ISOLASI SPERMATOZOA (*Rattus norvegicus*) JANTAN

**PENELITI** : RARA ANGGUN MEI NIRBAYA

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

Malang, 01 juli 2013  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001