

KAJIAN AWALAN TERHADAP PENULENAN DAN PENGENALPASTIAN ASID AMINO AROMATIK L-DOPA DARIPADA KAKI PEREKAT KUPANG HIJAU AIR TAWAR MALAYSIA

(Preliminary Study on Purification and Identification of Aromatic Acid Amino L-DOPA from
Malaysia Freshwater Green Mussel Byssus)

Saiful Irwan Zubairi^{1*}, Wan Rosmaryana Wan Musa¹, Syed Anuar Faua'ad Syed Mohammad²

¹Pusat Pengajian Sains Kimia & Teknologi Makanan,
Fakulti Sains & Teknologi,

Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Jabatan Kejuruteraan Bioproses,

Fakulti Kejuruteraan Kimia & Kejuruteraan Sumber Asli,

Universiti Teknologi Malaysia, 81310 UTM Skudai, Johor Darul Takzim, Malaysia

*Corresponding author: saiful-z@ukm.edu.my

Abstrak

L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin) adalah sejenis asid amino aromatik yang dapat dikesan melalui kaedah pengekstrakan larutan berasid dan penulenan daripada perekat kaki kupang hijau. Oleh yang demikian, objektif utama kajian ini adalah untuk membuat pencirian dan penulenan asid amino L-DOPA dengan menggunakan kaedah kromatografi penurasan gel Sefadex G-200 melalui penggunaan dua jenis larutan fasa bergerak gel berasid dan beralkali. Penghancuran atau penghomogenan sampel perekat kaki kupang dilakukan dengan menggunakan mortar dan alu beserta penambahan cecair nitrogen bagi memecahkan struktur protein perekat kaki kupang hijau. Sampel yang dihancurkan dicampurkan dengan asid perklorik 0.7%, 1.0%, dan 1.5% (v/v) (pra-rawatan sampel) sebelum proses pengekstrakan dijalankan. Seterusnya, proses pengekstrakan dilakukan dengan mengempar sampel pada 11,000 rpm selama 10 min pada suhu 10 °C. Supernatan S1 diambil dan ditambah dengan aseton dan asid sulfurik pekat, kemudiannya diempar untuk kali kedua untuk pengambilan pellet dan dilarutkan menggunakan larutan fasa bergerak sebelum proses penulenan dijalankan. Proses penulenan dijalankan menggunakan dua jenis fasa bergerak iaitu asid asetik 5% (v/v) dan NaOH 1M. Bacaan nilai penyerapan (abs) untuk fraksi sampel ekstrak berprotein ditulen dianalisa pada jarak gelombang di antara 214 nm ke 400 nm menggunakan UV-spektrofotometer. Bacaan penyerapan (abs) tertinggi akan dipilih bagi proses pengesanan dan pembuktian kewujudan asid amino L-DOPA di dalam fraksi tertulen. Proses verifikasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan kromatografi lapisan nipis (TLC). Keputusan ujikaji menunjukkan penggunaan asid perklorik 0.7% dan asid asetik 5% bagi proses pra-rawatan dan cecair fasa bergerak proses penulenan masing-masing menghasilkan profil abs efluan yang tertinggi (menghampiri nilai 1.0) pada jarak gelombang 260 nm. Analisis TLC membuktikan kewujudan beberapa asid amino penting selain L-DOPA iaitu tirosin dan fenilalanin pada masa (jam) pengumpulan efluan ke-78. Manakala, analisis HPLC menunjukkan kepekatan L-DOPA adalah yang tertinggi (2.94 ± 0.12 mg/l) secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding pada masa pengumpulan efluan yang lain.

Kata kunci: L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), perekat kaki, kupang hijau, gel Sefadex G-200, TLC, HPLC

Abstract

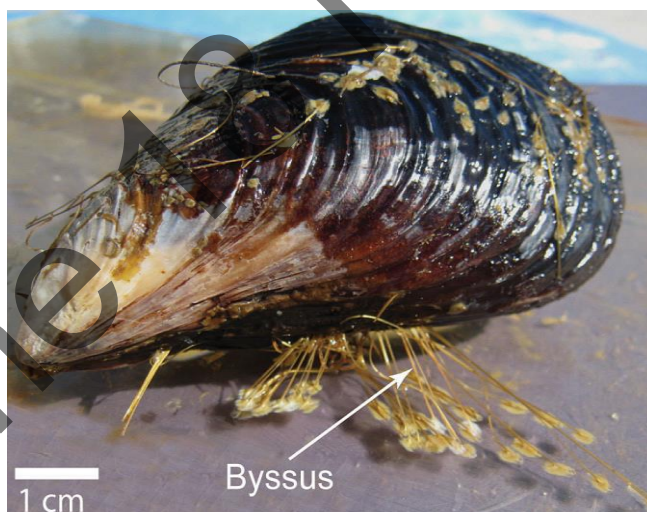
L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) is a type of aromatic amino acid which can be detected by using acidic extraction and purification method involving adhesive byssus green mussel protein. The main objective of this study is to identify and purify the aromatic amino acid L-DOPA via the utilization of gel Sephadex G-200 filtration chromatography based on two types of acidic and basic mobile phase solution. The crushing and homogenizing for adhesive byssus green mussel were conducted using a mortar and a pestle with the aid of liquid nitrogen. The samples that had been crushed were then mixed and dissolved in perchloric acid 0.7%, 1.0% and 1.5% (v/v) (pre-treatment) prior to the extraction process. The extraction was carried out by centrifuging the extracts at 11,000 rpm for about 10 mins and at a temperature of 10 °C to obtain supernatant S1. The supernatant was mixed with acetone and sulphuric acid and centrifuged for the second time to produce a pellet and then it was dissolved in

the respective mobile phase solutions prior to purification process. Purification was later performed using two mobile phase solutions which were acetic acid 5% (v/v) and NaOH 1M. The absorbance (abs) value of each purified protein extract fractions was collected and analysed at 214 nm to 400 nm with the help of UV-spectrophotometer. The highest abs value was selected for identification and verification of amino acid L-DOPA in the purified solution. Verification was carried out by utilizing high performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). The results showed that the use of 0.7% (v/v) perchloric acid and 5% (v/v) acetic acid for pre-treatment process and mobile phase solution of purification process respectively, yielded the highest effluent abs profile at a wavelength of 260 nm. TLC analysis proved the existence of several important amino acids besides L-DOPA which were tyrosine and phenylalanine after 78 hrs of collection of effluents. Meanwhile, the analysis of HPLC revealed the highest concentration of amino acid L-DOPA ($p < 0.05$) as compared to the other collected effluents.

Keywords: L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), adhesive byssus, green mussel, gel Sephadex G-200, TLC, HPLC

Pengenalan

Kupang hijau atau nama saintifiknya adalah *Perna viridis* adalah sejenis haiwan maritim yang diklasifikasikan dalam kumpulan invertebrata yang hidup di dalam air masin. Kupang hijau merupakan haiwan dwikutub yang mempunyai cengkerang yang keras, organ dalaman yang lembut dan kaki yang berotot untuk membantu pergerakannya. Bahagian dalaman lembut terdiri daripada organ respirator, pencernaan dan pembiakan. Pembiakan kupang hijau yang kondusif memerlukan persekitaran air laut yang bersuhu 26 - 32 °C, pH 7.1 - 8.5, kemasinan air 27 - 35‰, oksigen terlarut 4 - 6 mg/l dan kedalaman air surut terendah pada ketinggian 3 - 4 meter [1]. Kupang hijau ini mempunyai ciri-ciri unik untuk hidup iaitu merembeskan bebenang daripada kelenjar fenol yang terdapat pada bahagian kakinya bagi tujuan membantu melekatkan dirinya kepada bahan lain seperti kayu, batu, logam dan plastik yang terdapat di dasar muara sungai [2]. Bebenang yang dihasilkan oleh kupang ini dikenali sebagai 'byssus' yang terbina daripada protein perekat (Rajah 1) [3]. 'Byssus' ini mempunyai kelebihan yang luar biasa di mana ia mempunyai kekuatan elastik yang tinggi sehingga boleh bertahan sehingga 200 MPa. Bebenang ini terhasil setiap 5 min per benang dan bebenang asalnya tidak akan mudah rosak dalam jangka masa satu atau dua tahun.



Rajah 1. Perekat (byssus) kupang hijau yang mengandungi asid amino penting L-DOPA [4].

Oleh yang demikian, protein yang terdapat di dalam perekat kaki kupang ini dilihat mempunyai potensi yang besar bagi industri komersial bahan pelekat dan juga bidang perubatan. Protein adalah polimer yang mengandungi beberapa jenis ikatan monomer asid amino yang dihubungkan oleh ikatan kovalen yang disebut ikatan peptida. Protein perekat kaki perekat (byssus) kupang hijau terbina daripada tiga asid amino aromatik utama iaitu L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), ditirosin dan tirosin [5]. L-DOPA adalah sebahagian daripada kelas pengantaraan kimia yang dikenali sebagai 'catecholamines' di mana ia adalah hasil daripada proses hidrolisis asid amino tirosin.

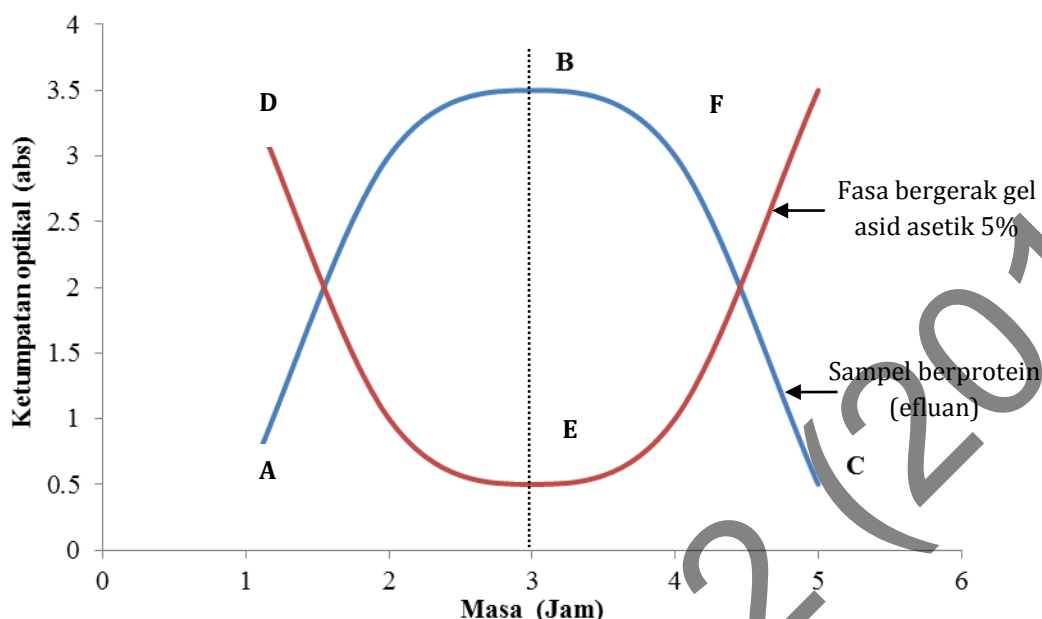
Kajian terhadap protein perekat bermula semenjak tahun 1980 apabila Jabatan Laut Amerika Syarikat mengadakan program mengenalpasti molekul protein perekat daripada hidupan invertabrata marin seperti kupang, tiram dan teritip [5, 6]. Kajian yang dilakukan dikhususkan kepada kupang biru dan hasil daripada kajian tersebut mendapati bahawa terdapatnya kewujudan asid amino L-DOPA pada perekat kupang tersebut dan ianya enam kali lebih besar berbanding kolagen tendon manusia dan keupayaan mekanikalnya setanding dengan *kevlar* dan serat karbon [7]. Asid amino L-DOPA yang wujud di dalam ekstrak protein perekat kaki kupang merupakan asid amino terpenting yang boleh memberi manfaat yang besar dalam bidang perubatan dan industri pembuatan. Dalam bidang perubatan, ia dapat mampu mengubati penyakit Parkinson's iaitu sejenis penyakit yang disebabkan oleh pengurangan pembentukan sel saraf di dalam otak [8]. Protein perekat ini juga berkeupayaan memberikan signal biologi untuk pelekatan sel sihat dan sel tumor di dalam kajian pengkulturan sel mamalia secara dua/tiga dimensi (3-D) tanpa menghasilkan toksin dan kesan [9]. Selain daripada itu, sifat protein perekat ini juga mempunyai keupayaan melekat pada pelbagai jenis permukaan seperti kaca, plastik, asetal, lapisan kayu nipis dan teflon di samping mampu melekat pada tulang dan gigi. Protein ini boleh dikomersilkan menjadi agen pelekat yang baik dan berpotensi untuk digunakan di dalam industri bahan pembuatan dan penggunaan domestik.

Disebabkan oleh potensi kepelbagaian penggunaan ekstrak protein kaki perekat kupang hijau di dalam bidang perubatan dan industri bahan pembuatan, keperluan untuk mengenalpasti dan membuat pengesahan komposisi asid amino yang terkandung di dalam ekstrak protein tersebut adalah penting. Oleh yang demikian, penggunaan teknik kromatografi adalah teknik yang terbaik dalam penghasilan/pengasingan fraksi tulen asid amino samada melalui polariti/cas molekul, pengasingan saiz molekul dan affiniti ikatan kovalen di antara molekul yang dibawa oleh fasa bergerak dan fasa pegun. Di dalam kajian ini, kaedah penurasan kromatografi gel Sefadex G-200 (penjerapan saiz molekul protein 5 - 500 kDa) digunakan bagi mendapatkan protein tulen yang mengandungi asid amino L-DOPA dengan cara pengasingan saiz molekul protein. Kromatografi gel merupakan satu teknik pemisahan komponen dalam sesuatu sebatian yang mana prinsip asas penggunaannya adalah sama dengan penurasan atau penapisan gel [10]. Kromatografi penapisan gel merupakan kaedah yang penting bagi menuliskan sebarang sampel berprotein bagi membuang sebarang bendasing yang tidak dikehendaki [11]. Ia terdiri daripada butiran manik-manik yang disediakan dengan merantaisilang molekul dekstran dengan epiklohirin (*Pharmacia*) dan mempunyai perbezaan daripada segi darjah kebolehanrantai silang serta darjah pengembangan dan julat penceraian [12]. Rajah 2 menunjukkan teori ringkas proses penulenan menggunakan kaedah penurasan kromatografi gel Sefadex G-200. Profil perjalanan efluan bagi proses penulenan adalah seperti berikut:

- 1) Titik A ke B: Bacaan abs mula meningkat apabila sampel mulai turun daripada gel. Larutan fasa bergerak (contoh: asid asetik 5%) mulai berkurangan secara langsung (Titik D ke E).
- 2) Titik puncak B: Titik di mana bacaan abs sampel adalah maksimum atau lapisan terakhir larutan sampel yang akan dituliskan berada lapisan terakhir gel sebelum larutan fasa bergerak baru dituangkan (Titik E).
- 3) Titik B ke C: Bacaan abs sampel mulai menurun disebabkan oleh pertambahan kembali larutan fasa bergerak gel ke dalam buret yang mengandungi gel (pencairan efluan berlaku) (Titik E ke F).

Selain daripada itu, gel Sefadex terbukti sangat stabil daripada segi kimia dan tidak larut dalam semua pelarut. Walaubagaimanapun, ikatan glikosidiknya merupakan satu kelemahan utama, di mana ia mudah terhidrolisis sekiranya terdedah kepada larutan yang berasid. Gel Sefadex adalah lebih stabil di dalam larutan beralkali dan pendedahan yang lama pada agen pengoksidaan akan menyebabkan penambahan kandungan kumpulan karboksil yang kesannya akan merosakkan sifat-sifat Sefadex tersebut [13].

Secara keseluruhan, kajian awalan terhadap protein perekat kaki kupang hijau yang mengandungi asid amino penting L-DOPA mempunyai potensi yang sangat besar dalam bidang bioteknologi dan bio-perubatan. Ia juga mampu dikomersilkan untuk diaplikasikan dalam sektor pembuatan komersial sebagai bahan perekat semulajadi yang mesra alam. Sehubungan dengan itu, pencirian bagi parameter pemprosesan pengekstrakan dan penulenan protein tersebut akan dapat memberikan gambaran awal penggunaan parameter yang terbaik bagi meningkatkan keberhasilan protein tersebut pada skala yang lebih besar (loji pandu).



Rajah 2. Profil efluan dan fasa bergerak bagi proses penulenan menggunakan kaedah penurasan kromatografi gel Sefadac G-200.

Bahan dan Kaedah

Pennyediaan sampel

Sebanyak 150 ekor sampel kupang hijau diambil dari Sungai Danga, Johor Bahru, Malaysia. Kupang hijau diceraikan daripada tali sarangnya bersama-sama dengan kakinya. Kaki kupang bersama plak perekat kaki kupang dikikiskan dengan menggunakan pisau cukur dan diletakkan di dalam botol. Setiap ekor kupang yang diambil diikat kembali dengan menggunakan gelang getah dan disisipkan kepada tali tangsi yang telah diikat kepada cermin-cermin kaca segi empat. Cermin-cermin kaca tersebut diletakkan di dalam raga besar dan ditenggelamkan ke dalam air selama beberapa hari bergantung kepada cuaca dan air pasang surut sebelum kitaran seterusnya dilakukan.

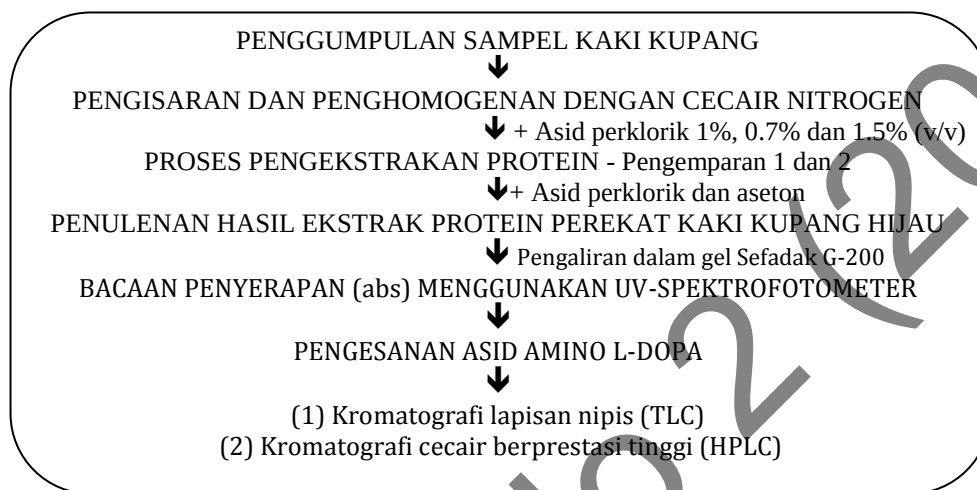
Proses penghomogenan atau penghancuran kaki kupang

Sampel perekat kaki kupang hijau yang telah dibersihkan dikeluarkan dari penyejuk beku (-10°C) dan dibiarkan seketika pada suhu bilik. Sampel kemudiannya dikeringkan dengan menggunakan kertas turas dan ditimbang. Seterusnya, mortar dan alu digunakan bagi menghancurkan kaki kupang kepada serbuk halus dengan menuangkan cecair nitrogen secara kerap. Serbuk halus kaki perekat kupang diletakkan di dalam bekas kaca kedap udara sebelum proses pengeskrakan protein dijalankan.

Proses pengekstrakan sampel protein

Proses pengekstrakan protein daripada perekat kaki kupang hijau adalah berdasarkan kepada protokol Taylor et al. (1994) [14]. Kaki kupang yang telah dihancurkan dicampur dengan 25 ml 0.7%, 1.0% dan 1.5% (v/v) asid perklorik (AP) dan dimasukkan ke dalam 50 ml tiub apendof. Ia kemudiannya diemparkan pada kadar kelajuan 11,000 rpm untuk jangka masa 10 min pada suhu 10°C . Supernatan (S1) bagi setiap tiub apendof dikumpulkan dan disukat kuantitinya. Sebanyak 450 μl asid sulfurik dimasukkan ke dalam larutan supernatan S1 dan digoncang dengan kuat. Kemudian aseton ditambah dengan isipadu dua kali ganda isipadu S1. Campuran larutan tersebut dikacau menggunakan pengaduk magnetik di dalam bilik bersuhu 4°C selama 20 min sebelum dimasukkan semula ke dalam tiub apendof. Kesemua tiub diemparkan sekali lagi pada kadar 11,000 rpm untuk 10 min pada suhu 10°C . Pellet yang terhasil ditimbang sebelum dilarutkan dengan asid asetik. Asid asetik ditambahkan kepada pellet yang terhasil berdasarkan nisbah 1:6 daripada berat pellet yang diperolehi. Pellet terlarut ini kemudiannya dimasukkan ke dalam

peti sejuk sebelum memulakan proses penulenan. Hasil ekstrak protein kaki perekat kupang hijau akan dituliskan dengan kaedah penurasan kromatografi gel Sefadac G-200 sebelum proses pengesanan asid amino utama L-DOPA dijalankan dengan menggunakan kromatografi lapisan nipis (TLC) dan kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC). Carta alir lengkap proses pengekstrakan protein kaki perekat kupang hijau dan analisis kewujudan asid amino L-DOPA ditunjukkan pada Rajah 3.

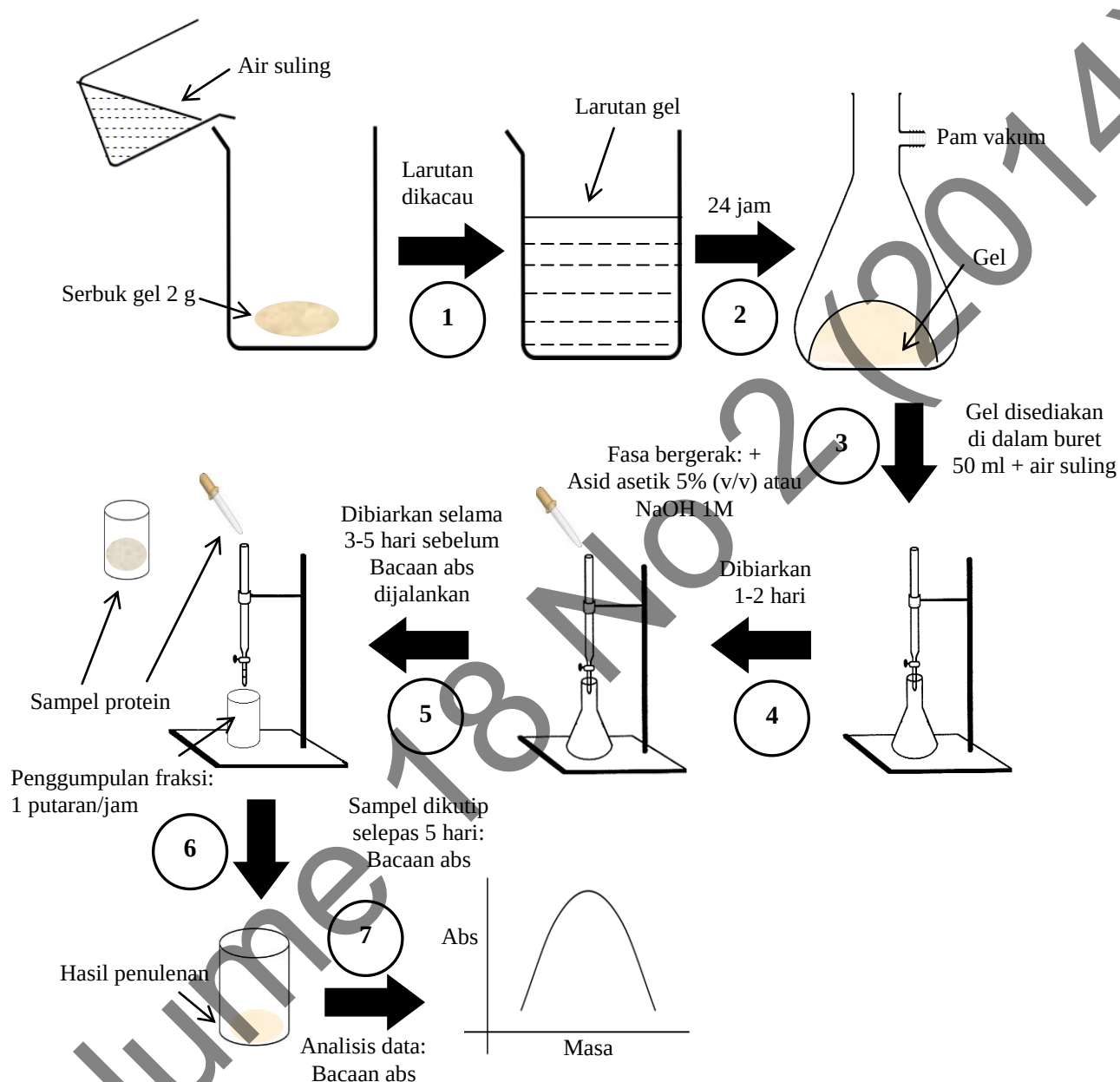


Rajah 3. Carta alir proses pengekstrakan dan pengesanan asid amino L-DOPA daripada ekstrak protein perekat kaki kupang hijau.

Penyediaan turus penurasan kromatografi gel Sefadac G-200

Dalam proses penulenan yang dijalankan, aspek penting yang perlu dititikberatkan adalah faktor-faktor yang mempengaruhi keadaan penyediaan gel tersebut. 1) Kewujudan bendasing dalam gel serta gelembung udara banyak memberi kesan dalam proses penulenan sampel berprotein. Gel yang disediakan perlulah bebas daripada sebarang gelembung udara sebelum dan semasa pemindahan gel kedalam turus kromatografi. Gelembung udara yang wujud mungkin disebabkan oleh pengadukan serbuk gel dengan air suling yang tidak sekata dan penuangan larutan gel terlalu pantas boleh menyebabkan kewujudan gelembung-gelembung udara tersebut [15]. Oleh yang demikian, penggunaan pam vakum amat penting dalam penyediaan larutan gel yang bebas daripada gelembung udara. Di samping itu, kadar pengadukan serbuk gel dan air suling hendaklah sekata dan mengikut arah lawan jam atau arah jam secara bertukar ganti. Proses penuangan air suling pada serbuk gel juga perlu dilakukan secara perlahan-lahan agar larutan gel yang terbentuk bebas gelembung udara serta ketulan tidak larut. 2) Suhu persekitaran bagi penyediaan gel kromatografi 15 °C. Keadaan ini diperlukan agar tiada perubahan suhu yang besar di antara sampel ekstrak dan gel semasa proses penulenan berjalan agar protein yang ditulen tidak mengalami sebarang denaturasi [16].

Penyediaan turus kromatografi dimulakan dengan pencampuran gel dan air suling dengan kadar pencampuran yang perlahan-lahan bagi mengelakkan daripada ketidaklarutan atau penggumpalan gel berlaku. Ia dibiarkan selama 24 jam di dalam kelalang kon. Kemudian, gel tersebut divakumkan dengan menggunakan pam vakum bagi memastikan tiada gelembung-gelembung udara yang terperangkap dan dituangkan ke dalam buret 50 ml (60 cm panjang). Gel dibiarkan selama sehari bagi memastikan gel adalah padat sebelum proses penulenan dijalankan [13]. Kadar alir bagi fasa ini ditentukan untuk mengetahui selang masa bagi proses pemungutan larutan fasa bergerak yang diturunkan melalui gel ini. Kadar alir yang dikira adalah 1.5 ml/jam.



Rajah 4. Kaedah penulenan hasil ekstrak protein perekat kupang hijau menggunakan kaedah penurasan kromatografi gel Sefadax G-200.

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses penulenan sampel protein dan bacaan abs

Hasil ekstrak protein yang dituangkan ke dalam turus kromatografi perlu berada pada julat suhu 4 - 10°C bagi mengelakkan sebarang denaturasi protein sepanjang proses penulenan. Selain daripada itu, proses pembacaan abs perlu berada dalam persekitaran sejuk (15 °C) agar tiada ralat di dalam bacaan data akibat denaturasi protein. Penggunaan kuvet kaca adalah di antara kriteria terpenting kerana bacaan abs bagi sampel berprotein yang

mempunyai jisim molekul yang tinggi memerlukan kadar penembusan dan campahan gelombang UV yang tetap dan bebas ralat walaupun replikasi pembacaan dilakukan.

Penulenan hasil ekstrak protein kupang hijau

Sebelum proses penulenan hasil ekstrak protein kupang hijau dijalankan, fasa bergerak dialirkan terlebih dahulu bagi mengeluarkan sebarang bahan-bahan asing yang masih terkandung di dalam gel Sefadac termampat dan memastikan bacaan abs asas kekal stabil (pemeriksaan efluan dilakukan bagi melihat tiada kewujudan sebarang puncak). Proses penulenan yang dijalankan adalah secara berasingan bagi setiap fasa bergerak yang berlainan (Jadual 1) dan fasa bergerak dibiarkan mengalir selama 3 hingga 5 hari. Sampel hasil ekstrak protein dituangkan ke dalam buret penulenan dengan kadar alir tetap pengumpulan fraksi ditulen iaitu 1.5 ml/jam sebelum analisis dijalankan. Bacaan abs bagi jarak gelombang $\lambda_{260\text{nm}}$ dan $\lambda_{280\text{nm}}$ diambil dengan menggunakan UV-spektrofotometer bagi efluan asas (fasa bergerak sahaja) dan hasil penulenan cecair ekstrak protein. Carta alir lengkap proses penulenan hasil ekstrak protein kupang hijau bagi mengesan asid amino L-DOPA ditunjukkan pada Rajah 4.

Jadual 1. Penggunaan pelbagai cecair penampan pada gel Sefadac G-200.

Kepekatan asid perklorik	Fasa bergerak gel Sefadac G-200	Polariti
0.7% (v/v)	Asid asetik 5% (v/v)	6.2
1.0% (v/v)	Asid asetik 5% (v/v)	6.2
1.5% (v/v)	NaOH 1M	Garam alkali

Analisis kromatografi lapisan nipis (TLC) atau kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)

Analisis pengesanan asid amino L-DOPA secara kualitatif bagi hasil penulenan ekstrak protein perekat kaki kupang dijalankan dengan menggunakan instrumen separa automatik TLC (CAMAG Linomat 5). Parameter analisis bagi CAMAG Linomat 5 adalah seperti berikut: Saiz plat (TLC lapisan nipis aluminium yang mengandungi silika; 10 cm $\times$ 10 cm), lebar tompokan: 4 mm, paksi x dan y: 11 mm and 10 mm masing-masing, jarak ujikaji penompokan: 10.0 mm dan isipadu semburan: 4.0 μl . Plat yang telah disemur dimasukkan di dalam tabung pembangunan bagi proses pemisahan asid amino yang terdapat di dalam hasil ekstrak protein tulen dengan menggunakan fasa bergerak berkomposisi 0.05M asid sitrik, sodium EDTA 50 μM , sodium oktilsulphonat 0.4 nM pada pH 2.9 dan 8% metanol (v/v). Penanda bagi setiap asid amino yang tercerap pada plat diperlihatkan, ditanda dan direkod menggunakan lampu UV pada jarak gelombang (λ) 260 nm dan 360 nm. Faktor terencat, R_f bagi setiap cerapan asid amino piawai dan sampel ekstrak protein tulen dikira dan ditunjukkan pada Jadual 3. Lima replikasi dilakukan bagi setiap sampel dan asid amino piawai ($n = 5$).

Parameter analisis HPLC bagi pengenalpastian keberhasilan asid amino L-DOPA hasil penulenan ekstrak protein perekat kaki kupang adalah seperti berikut: (1) Fasa bergerak disediakan dengan komposisi yang terdiri daripada 0.05M asid sitrik, sodium EDTA 50 μM , sodium oktilsulphonat 0.4 nM pada nilai pH 2.9 and 8% (v/v) metanol. (2) Kadar alir fasa bergerak adalah 1 ml/min pada suhu kolum 25 $^{\circ}\text{C}$. (3) Kolum Chromolith RP-18 (Inertsil 7 ODS-3 4.6 mm ID, 250 mm, Merck[®]) digunakan mengikut prosedur Cannazza et al. (2010) [17]. (4) Jarak gelombang pengesanan cahaya UV ditetapkan pada 220 nm [14]. Fasa bergerak dibiarkan mengalir di dalam kolum selama 30 min sehingga garisan asas yang stabil diperolehi. Sebanyak 20 μl sampel disuntikkan dan bacaan kromatografi dijalankan sehingga semua puncak terhasil pada masa operasi yang ditetapkan (45 min).

Analisis statistik

Kesemua data hasil ujikaji dianalisa dengan menggunakan perisian SPSS (IBM) versi 17.0. Ujian-t sampel tidak bersandar atau 'Student t-test' dijalankan untuk pada aras kebarangkalian signifikan 95% ($p < 0.05$) bagi penentuan perbezaan signifikan di antara sampel.

Hasil dan Perbincangan

Pengekstrakan protein perekat kaki kupang hijau

Nilai bacaan abs bagi julat jarak gelombang di antara 200 nm hingga 400 nm bagi hasil ekstrak protein yang diekstrak menggunakan tiga kepekatan asid perklorik (AP) berbeza ditunjukkan pada Jadual 2. Pencirian and pemeriksaan jarak gelombang yang paling stabil dan sesuai bagi sampel ekstrak protein (tanpa pencairan) dijalankan dengan menggunakan instrumen analisis UV-spektrofotometer agar nilai bacaan yang terhampir dengan 1.0 dapat diperolehi (bacaan maksimum abs) diletakkan pada nilai 1.0 = 100%). Pada jarak gelombang 214 nm, ketiga-tiga kepekatan larutan AP menunjukkan nilai bacaan yang tinggi iaitu melebihi 2.0. Bacaan abs yang tinggi menunjukkan hasil ekstrak tersebut mempunyai kepekatan protein yang tinggi. Manakala pada jarak gelombang cahaya UV tampak (400 nm), bacaan abs adalah sangat rendah iaitu dibawah 0.3. Oleh yang demikian, jarak gelombang yang sesuai bagi cerapan kepekatan hasil ekstrak protein adalah pada jarak gelombang di antara 260 dan 280 nm. Pemilihan dibuat berdasarkan kepada dua daripada tiga kepekatan AP yang digunakan (iaitu 0.7% dan 1.0%) menghasilkan nilai abs yang menghampiri nilai 1.0 (100%). Penetapan nilai abs 1.0 dilakukan agar proses normalisasi kepada 100% tidak dilakukan.

Jadual 2. Bacaan abs pada julat jarak gelombang (λ) 200 nm - 400 nm bagi hasil ekstrak protein melalui penggunaan tiga kepekatan asid perklorik berbeza (0.7% (v/v), 1.0% (v/v) dan 1.5% (v/v)).

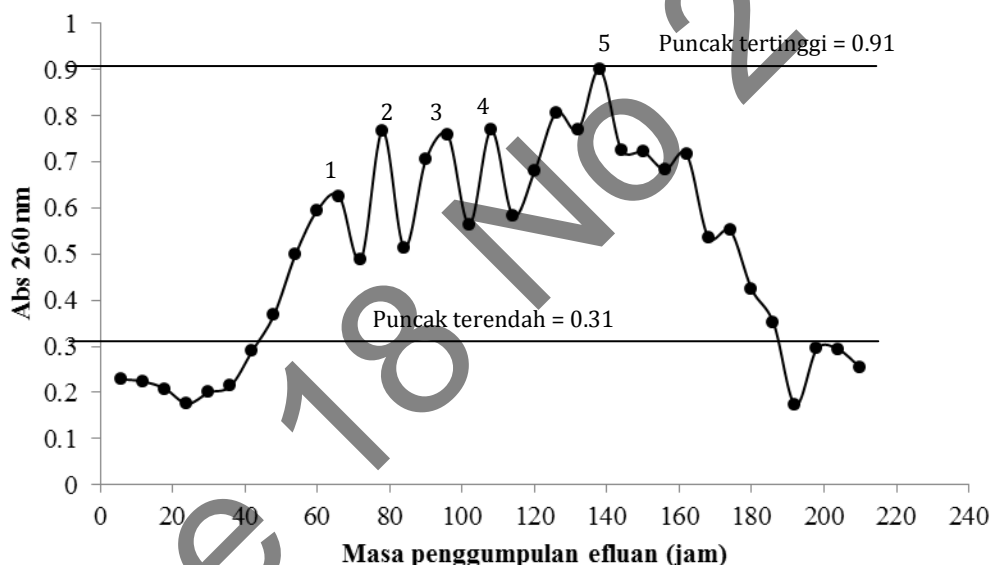
λ (nm)	0.7% AP	1.0% AP	1.5% AP
214	2.00 $\pm$ 0.15	2.13 $\pm$ 0.11	2.34 $\pm$ 0.16*
230	1.77 $\pm$ 0.12	1.25 $\pm$ 0.15	1.18 $\pm$ 0.08
260	0.97 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.01	1.70 $\pm$ 0.10*
280	0.90 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.09	1.38 $\pm$ 0.15
360	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.10
400	0.10 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.07

Penulenan hasil ekstrak melalui penggunaan fasa bergerak berlainan

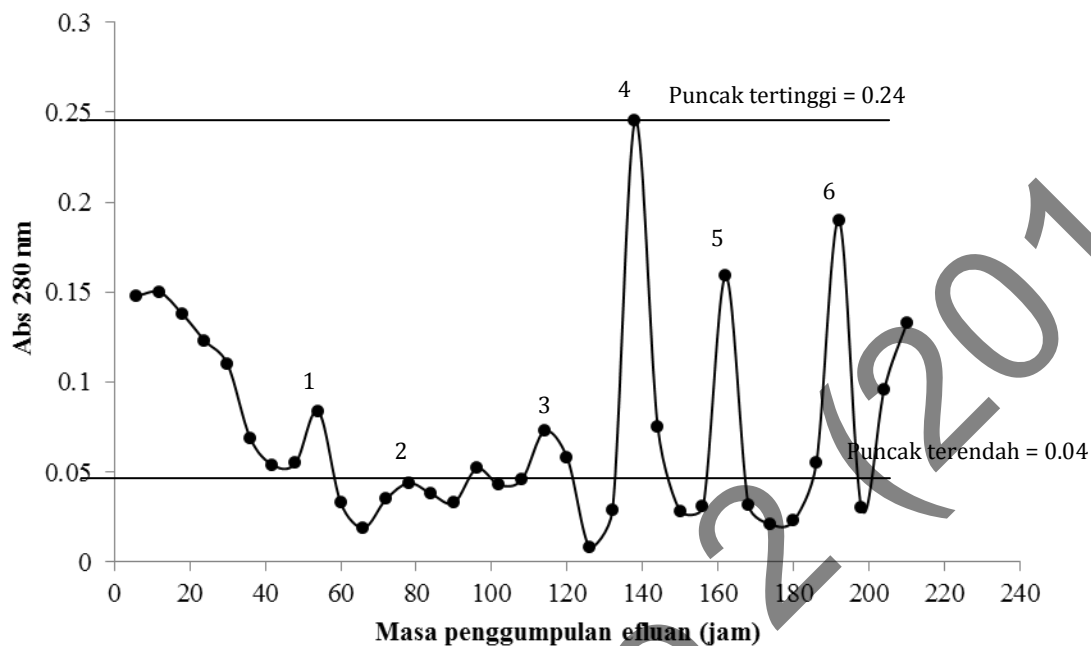
Keputusan analisa sampel penulenan bagi hasil ekstrak protein 0.7%, 1.0% dan 1.5% (v/v) asid perklorik ditunjukkan pada Jadual 2. Suhu persekitaran bagi proses penulenan ketiga-tiga set penurutan kromatografi gel adalah pada suhu 15 °C dan set tersebut dibiarkan dengan menggunakan alat pengumpul sampel automatik dan disetkan pada masa maksimum 1 jam. Fraksi yang dikumpulkan dianalisa dan graf abs melawan masa pengumpulan fraksi diplotkan bagi mengenalpasti parameter-parameter pomprosesan (kepekatan AP, jarak gelombang dan fasa bergerak) yang terbaik sebelum analisis kualitatif dan kuantitatif komponen penting protein seperti asid amino L-DOPA dijalankan. Secara teori, konsep utama proses penulenan protein melalui gel kromatografi adalah pengasingan saiz molekul (kDa) iaitu molekul protein yang bersaiz besar akan keluar daripada turus kromatografi lebih awal berbanding molekul protein bersaiz kecil. Molekul protein bersaiz kecil atau molekul protein yang terhidrolisis menjadi komponen asid amino oleh fasa bergerak bersifat asid/alkali akan mudah masuk ke dalam liang-liang halus gel dan terjerap di permukaan gel. Manakala, saiz molekul yang besar akan terus diefluan disebabkan oleh ketidakupayaan saiz molekul tersebut masuk ke liang-liang halus gel Sefadac [18].

Rajah 4 menunjukkan profil abs efluan hasil ekstrak protein yang terbaik pada jarak gelombang 260 nm dengan penggunaan 0.7% (v/v) asid perklorik (larutan pengekstrakan berasid) dan 0.7% (v/v) asid asetik sebagai fasa bergerak kromatografi. Julat abs yang tinggi (0.31 - 0.91) dengan kewujudan 5 puncak nyata jerapan molekul-molekul protein diperolehi berbanding nilai julat yang dihasilkan bagi profil efluan yang lain (Rajah 5, 6, 7, 8 dan 9). Walaubagaimanapun, profil puncak efluan dilihat lebih baik bagi Rajah 5, 6, 7, 8 dan 9 di mana jarak pemisahan di antara komponen adalah lebih besar dan lengkung kitarannya menghampiri ke garisan asas berbanding pada Rajah 4. Penggunaan turus buret yang lebih panjang atau sistem kawalan kadar alir fasa bergerak dilihat perlu agar jarak puncak pemisahan efluan bagi Rajah 4 menjadi lebih besar. Selain daripada itu, komposisi molekul-molekul protein dan bendasing yang mempunyai polariti yang tinggi dan bersaiz kecil dilihat terjerap lebih awal di

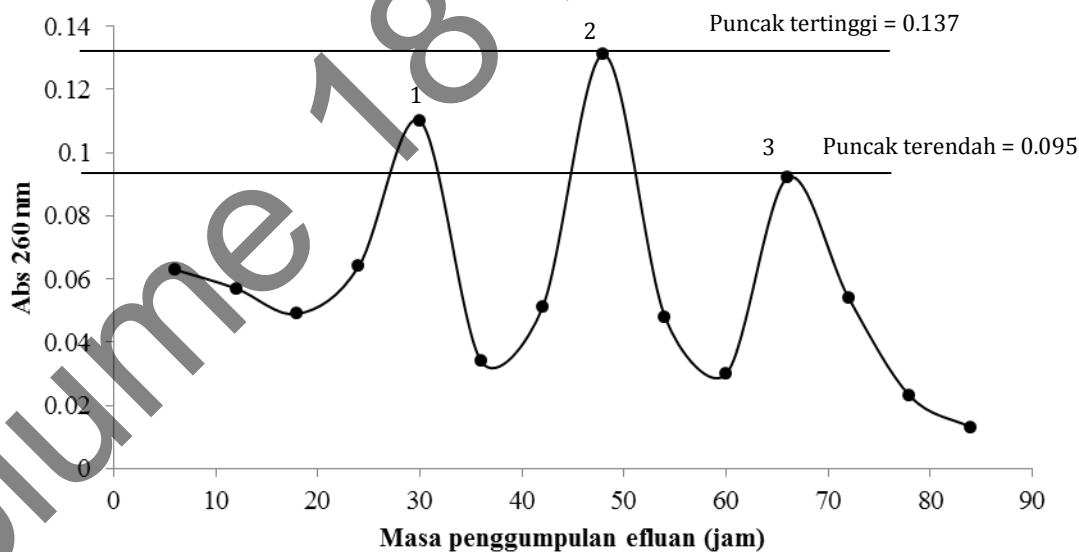
permukaan liang-liang halus gel Sefadac G-200 bagi penggunaan fasa bergerak asid asetik yang berkepekatan tinggi dan NaOH (alkali kuat) berbanding penggunaan kepekatan asid asetik yang rendah. Fenomena ini dilihat berpunca daripada sifat kimia larutan alkali kuat NaOH dan asid asetik berkepekatan tinggi yang turut membantu memecahkan lebih banyak ikatan peptida di dalam ekstrak protein kepada beberapa molekul-molekul protein yang bersaiz lebih kecil. Akan tetapi, kewujudan molekul-molekul protein yang sedikit bagi kondisi di atas (Rajah 6, 7, 8 dan 9) memperlihatkan ia amat bergantung kepada kesesuaian kepekatan asid perklorik yang digunakan semasa proses pengeskrakan. Walaupun penggunaan kepekatan AP yang tinggi (1.5%) menghasilkan bacaan abs hasil ekstrak protein yang tinggi, hanya beberapa puncak penahanan sahaja yang muncul dengan bacaan abs yang rendah apabila proses penulenan dijalankan. Secara teori, kepekatan sesuatu larutan yang tinggi tidak semestinya mengandungi berat molekul yang tinggi (MW). Ini dapat dijelaskan dengan kewujudan fenomena indeks polidispersiti yang tinggi iaitu kewujudan kepelbagaian saiz molekul protein di dalam hasil ekstrak tersebut (kewujudan saiz molekul yang lebih besar berbanding saiz kecil). Oleh yang demikian, nilai abs yang besar berkemungkinan berlakunya pemecahan ikatan peptida kepada molekul-molekul yang lebih kecil (banyak penyerapan berlaku di dalam liang-liang halus gel Sefadac G-200) berbanding nilai abs yang rendah tetapi berkemungkinan mengandungi saiz molekul protein yang amat besar. Lima fraksi efluan abs yang tinggi pada Rajah 4 (puncak 1 - 5) digunakan untuk pencirian kandungan asid amino penting L-DOPA dengan menjalani analisis kualitatif TLC dan kuantitatif HPLC.



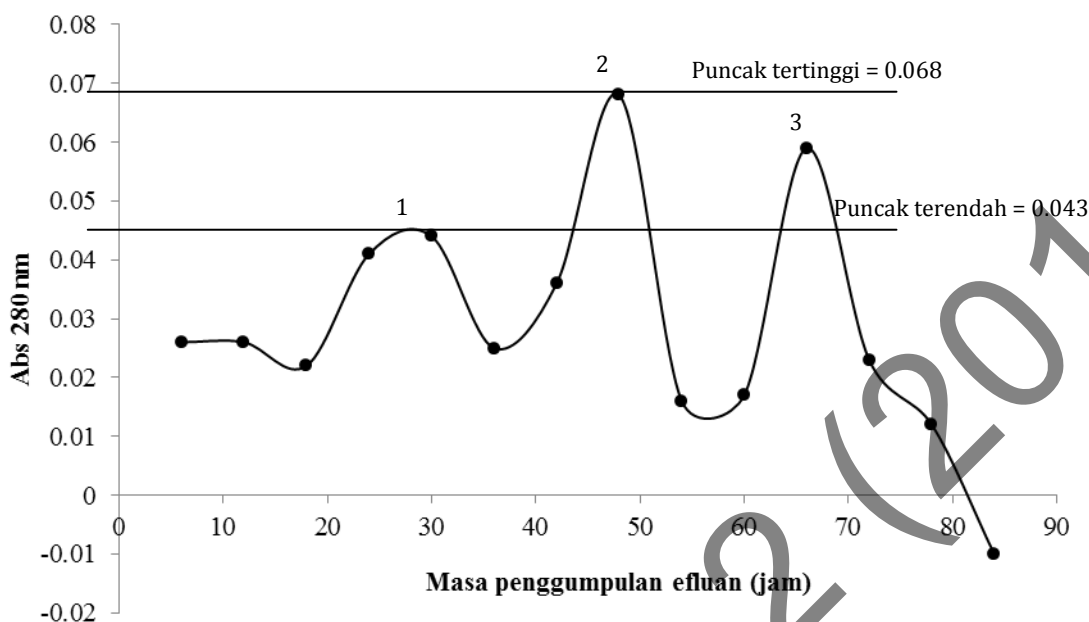
Rajah 4. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 0.7% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v) pada suhu 15 °C dan jarak gelombang λ_{260nm} . Nombor puncak 1- 5: Hanya lengkung kitaran lengkap sahaja diambil untuk analisis asid amino L-DOPA.



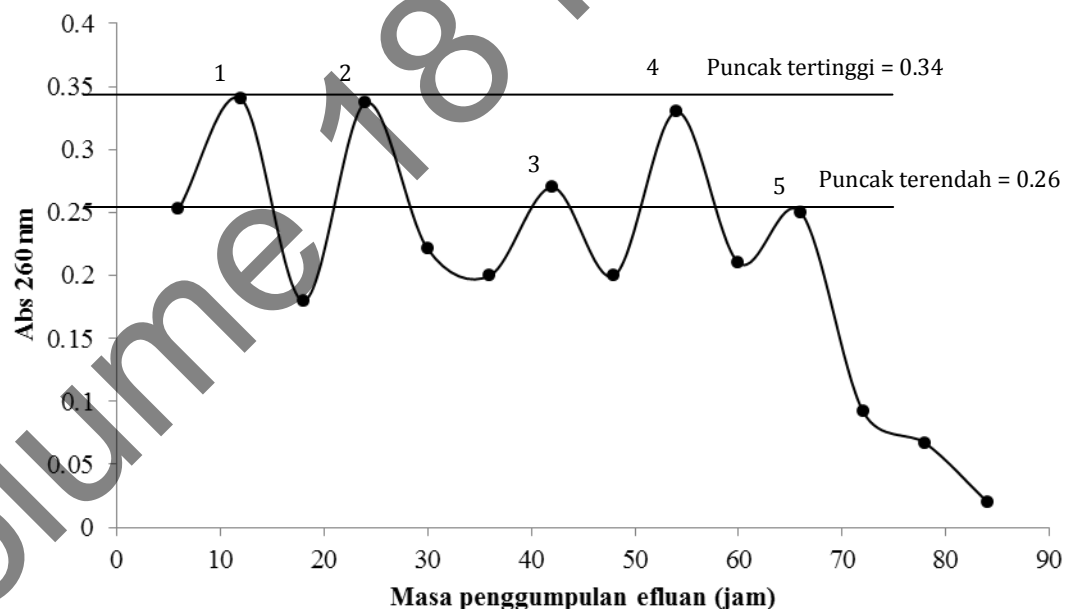
Rajah 5. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 0.7% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v) pada suhu 15 °C dan jarak gelombang $\lambda_{280\text{nm}}$. Nombor puncak 1- 6: Lengkung kitaran lengkap.



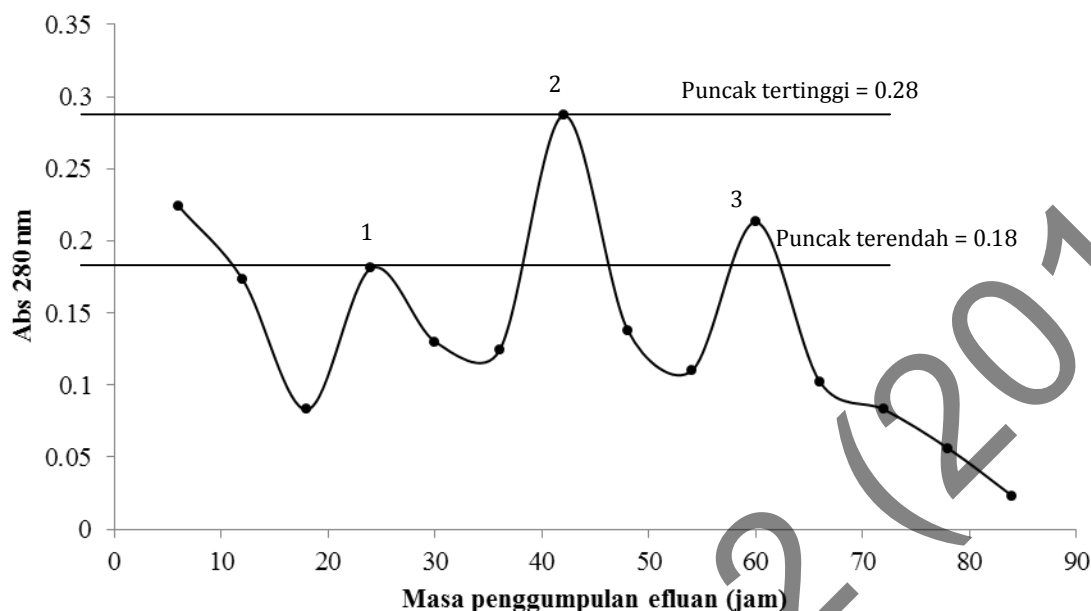
Rajah 6. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 1.0% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v) pada suhu 15 °C dan jarak gelombang $\lambda_{260\text{nm}}$. Nombor puncak 1- 3: Lengkung kitaran lengkap.



Rajah 7. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 1.0% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v) pada suhu 15 °C dan jarak gelombang $\lambda_{280\text{nm}}$. Nombor puncak 1- 3: Lengkung kitaran lengkap.



Rajah 8. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 1.5% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak NaOH 1M pada suhu 15 °C dan jarak gelombang $\lambda_{260\text{nm}}$. Nombor puncak 1- 5: Lengkung kitaran lengkap.



Rajah 9. Profil abs efluan hasil ekstrak protein bagi sampel 1.5% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak NaOH 1M pada suhu 15 °C dan jarak gelombang λ_{280nm} . Nombor puncak 1- 3: Lengkung kitaran lengkap.

Analisis kromatografi lapisan nipis (TLC)

Jadual 3 menunjukkan bacaan jarak jaluran R_f bagi 3 jenis asid amino (L-DOPA, L-fenilalanin dan L-tirosin) penting yang terdapat di dalam hasil ekstrak protein perekat kaki kupang menggunakan 0.7% (v/v) asid perklorik (proses pengeskrakan) dan 5% (v/v) asid asetik (fasa bergerak proses penulenan). Keputusan bagi penggumpulan fraksi tulen pada jam ke-78 memberikan petanda positif yang terbaik dengan kewujudan ketiga-tiga komponen asid amino penting tersebut dengan nilai R_f yang sama dengan nilai piawaian asid amino. Walaubagaimanapun, kesemua efluan terkumpul dilihat mempunyai petanda positif asid amino L-DOPA penting. Oleh yang demikian, semua sampel efluan dari jam ke-69 sehingga ke-138 dipilih bagi mengetahui kepekatan (mg/l) asid amino penting L-DOPA yang terkandung di dalam hasil penulenan ekstrak protein tersebut menggunakan analisis HPLC.

Jadual 3. Nilai R_f asid amino piawai L-DOPA, L-fenilalanin dan L-tirosin dan sampel ekstrak protein ditulen pada 4 puncak efluan bagi masa pengumpulan pada jam ke-78, 90, 108 dan 138 (0.7% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v)).

Komponen	Nilai R _f		
Asid amino piawai			
L-DOPA	0.68 ± 0.01		
L-fenilalanin	0.70 ± 0.05		
L-tirosin	0.80 ± 0.02		
Sampel ekstrak protein ditulen*			
Efluan hasil tulen	L-DOPA	L-fenilalanin	L-tirosin
0.7% (v/v) Asid perklorik (69 jam)	0.66 ± 0.01	ND	ND
0.7% (v/v) Asid perklorik (78 jam)	0.67 ± 0.01	0.69 ± 0.02	0.77 ± 0.02
0.7% (v/v) Asid perklorik (90 jam)	0.66 ± 0.02	ND	0.76 ± 0.03
0.7% (v/v) Asid perklorik (108 jam)	0.67 ± 0.01	ND	ND
0.7% (v/v) Asid perklorik (138 jam)	ND	0.68 ± 0.03	0.75 ± 0.01

* $p > 0.05$: Tiada perbezaan signifikan di antara nilai R_f sampel ekstrak protein efluan dan asid amino piawai ($n = 5$).
ND: Not detected - Tiada kewujudan plot warna asid amino dikesan di atas plat TLC.

Analisis kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC)

Jadual 4 menunjukkan komposisi kepekatan (mg/l) bagi 4 efluan penggumpulan hasil penulenan ekstrak protein kaki perekat kupang hijau. Daripada keputusan yang diperolehi, pada masa penggumpulan jam ke-78, kepekatan asid amino L-DOPA adalah yang tertinggi secara signifikan berbanding dengan masa penggumpulan efluan yang lain ($p < 0.05$).

Jadual 4. Analisis HPLC bagi 4 puncak efluan penurasan kromatografi gel Sefadac G-200 bagi sampel ekstrak protein 0.7% (v/v) asid perklorik dengan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v).

Masa penggumpulan (jam)	Kepekatan L-DOPA (mg/l)
69	0.33 ± 0.05
78	$2.94 \pm 0.21^*$
90	0.82 ± 0.13
108	0.46 ± 0.18
138	ND

* $p < 0.05$: Perbezaan signifikan di antara masa penggumpulan puncak efluan gel Sefadac G-200 (jam) $t = 90$ dan 108 ($n = 3$).

ND: Not detected - Tiada kewujudan asid amino L-DOPA.

Oleh yang demikian, parameter pemprosesan dan analisis yang terbaik bagi mendapat kepekatan asid amino penting L-DOPA yang tinggi di dalam hasil penulenan ekstrak protein kaki kupang adalah seperti di Jadual 5.

Jadual 5. Parameter pemprosesan dan analisis terbaik dalam memberikan nilai bacaan kepekatan (mg/l) asid amino L-DOPA yang tinggi.

Proses pengekstrakan berasid	
Kepekatan larutan berasid	0.7% (v/v) asid perklorik
Proses penulenan gel Sefadac G-200	
Kepekatan fasa bergerak	5% (v/v) asid asetik
Jarak gelombang ^a	260 nm
Masa penggumpulan (jam)	78

^aBacaan abs bagi penggunaan instrumen UV-spektrofotometer.

Kesimpulan

Penulenan hasil ekstrak protein kaki perekat kupang hijau yang mengandungi asid amino aromatik penting L-DOPA dilihat banyak dipengaruhi oleh pelbagai faktor penggunaan parameter pemprosesan dan analisis pencirian komponen. Di antaranya adalah pemilihan jenis fasa bergerak gel kromatografi, keadaan penyediaan gel dan sampel ekstrak berprotein tersebut. Fasa bergerak larutan berasid seperti asid asetik 5% memberikan kehadiran beberapa puncak efluan nyata dan pemisahan di antara komponen-komponen ditulen tersebut yang ketara kecuali bagi hasil ekstrak 0.7% asid perklorik. Akan tetapi, bacaan abs adalah rendah walaupun puncak pemisahan yang ketara berlaku. Manakala bagi fasa bergerak beralkali seperti NaOH 1M pula memberikan kehadiran puncak efluan dan pemisahan yang ketara tetapi mempunyai nilai abs yang agak rendah sama dengan beberapa set fasa bergerak larutan berasid pada dua jarak gelombang yang berbeza (260 nm dan 280 nm). Kadar pergerakan sampel di dalam fasa bergerak bergantung kepada jenis pelarut yang digunakan. Pemilihan pelarut yang sesuai penting untuk menghasilkan pemisahan yang baik antara komponen di dalam sampel. Setiap pelarut mempunyai kuasa pemisahan yang berbeza. Oleh yang demikian, larutan asid asetik berkepekatan 5% (v/v) dilihat sesuai bagi mendapatkan lebih banyak pemisahan komponen-komponen penting di dalam ekstrak berprotein perekat kaki kupang hijau. Di samping itu, faktor penyediaan gel juga turut mempengaruhi proses penulenan yang dijalankan. Kewujudan gelembung udara boleh menyebabkan hasil penulenan ekstrak berprotein terperangkap di dalam gelembung yang terbentuk dan memberi kesan yang besar terhadap nilai bacaan abs. Penggunaan pam vakum serta pengaliran air suling beberapa

kali sebelum pengaliran larutan fasa bergerak gel sangat penting dalam mengelakkan ralat dalam pembacaan abs. Sampel yang disediakan juga perlulah dalam keadaan yang sentiasa sejuk lebih kurang pada suhu 15 °C dan keadaan gel yang disediakan juga perlu kekal pada suhu tersebut. Ia bertujuan untuk memastikan sampel ekstrak berprotein tidak mengalami sebarang denaturasi. Denaturasi protein boleh berlaku sekiranya berlakunya perubahan suhu bilik yang ketara di mana jenis protein yang berlainan mempunyai sensitiviti terhadap suhu yang berlainan. Selain daripada itu, dalam memberikan bacaan abs yang tepat dan kurang ralat, pemilihan jarak gelombang bagi instrument UV-spektrofotometer turut memainkan peranan yang penting dalam mengenalpastian parameter pemprosesan yang terbaik. Dalam kajian ini, julat jarak gelombang daripada 214 nm sehingga 400 nm (cahaya tampak UV) digunakan bagi mendapatkan nilai bacaan yang menghampiri bacaan 1.0. Bacaan abs <1.0 pada jarak gelombang 260 dan 280 nm dipilih agar tiada normalisasi dilakukan. Secara kesimpulan, daripada kajian keseluruhan yang dijalankan, dapat dibuktikan bahawa hasil penulenan sampel ekstrak berprotein perekat kaki kupang hijau yang mengandungi asid amino penting L-DOPA banyak terkandung di dalam hasil ekstrak yang menggunakan larutan 0.7% (v/v) asid perklorik (proses pengekstrakan) dengan penggunaan larutan fasa bergerak asid asetik 5% (v/v) pada suhu bilik sejuk 15°C bagi proses penulenan penurasan kromatografi gel Sefadax G-200.

Rujukan

1. Nishida, A., Ohkawa, K., Ueda, I. & Yamamoto, H. (2003). Green mussel *Perna viridis* L.: attachment behaviour and preparation of antifouling surfaces. *Biomolecular Engineering*. 20(4-6): 381-387.
2. Troncoso, O.P., Torres F.G. & Grande, C.J. (2008). Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of *Aulacomys ater*. *Acta biomaterialia*, 2008. 4(4):1114-7.
3. Marin, C., Bonastre, M., Mengod, G., Cortes, R., Giralt, A. Obeso, J.A. & Schapira, A.H. (2014). Early L-dopa, but not pramipexole, restores basal ganglia activity in partially 6-OHDA-lesioned rats. *Neurobiology of disease*. 64: 36-47.
4. Greenfieldboyce, N. (2010). Mighty Mussels Have Industrial Strength. *NPR Research News*. Washington DC.
5. Waite, J.H. & Tanzer, M.L. (1980). The Bioadhesive of mytilus byssus: A protein containing L-DOPA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 96: 1554-1561.
6. DeMoor, S., Waite, J.H., Jangoux, M. & Flammang, P. (2003). Characterization of the adhesive from cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Marine biotechnology*. 5(1): 45-57.
7. Suhre, M.H. & Scheibel, T. (2014). Structural diversity of a collagen-binding matrix protein from the byssus of blue mussels upon refolding. *Journal of structural biology*. 186(1): 75 – 85
8. Kwak, Y., Bohnen, N.I., Muller, M.L., Dayalu, P., Burke, D.T. & Seidler, R.D. (2013). Task-dependent interactions between dopamine D2 receptor polymorphisms and L-DOPA in patients with Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 245: 128-36.
9. Xiaoxia, Q. & Herbert, W.J. (1995). Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis*. *The Journal of Experimental Biology*. 198: 633-644.
10. Morris, C.J.O.R. (1964). Thin-layer chromatography of proteins on sephadex G-100 and G-200. *Journal of Chromatography*. 1964: 167-176.
11. Chen, L.-G. & Wang, C.-C. (2009). Preparative separation of oligostilbenes from *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* by centrifugal partition chromatography followed by Sephadex LH-20 column chromatography. *Separation and Purification Technology*. 66(1): 65-70.
12. Buyel, J.F., Bautista, J.A., Fischer, R. & Yusibov, V.M. (2012). Extraction, purification and characterization of the plant-produced HPV16 subunit vaccine candidate E7 GGG. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 880(1): 19-26.
13. Joustra, M., Soderqvist, B. & L. Fisher (1967). Gel filtration in organic solvents. *Journal of Chromatography*. 28(1967): 21-25.
14. Taylor, S.W., Waite, J.H., Ross, M.M., Shabanowitz, J.H. & Donald F. (1994). Trans-2,3-cis-3,4-Dihydroxyproline, a new naturally occurring amino acid, is the sixth residue in the tandemly repeated consensus decapeptides of an adhesive protein from *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society*. 116(23): 10803-10804.
15. Hine, P.T. & Bursill, D.B. (1983). Gel permeation chromatography of humic acid Problems associated with sephadex gel. *Journal of Water Resources*. 18(1983): 1561-1465.

16. Tantanasarit, C., Babel, S., Englande, A.J. & Meksumpun, S. (2013). Influence of size and density on filtration rate modeling and nutrient uptake by green mussel (*Perna viridis*). *Marine pollution bulletin*. 68(1-2): 38-45.
17. Cannazza, G., Di Stefano, A., Mosciatti, B., Braghiroli, D., Baraldi, M., Pinnen, F., Sozio, P., Benatti, C. & Parenti, C. (2005). Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-DOPA prodrugs by mean of HPLC-EC. *J Pharm Biomed Anal*. 36(5): 1079-84.
18. Rosenberg, I.M. (2004). Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques. 2 edn., Munich Birkhäuser.

Volume 18 No 2 (2014)