

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHESIVE PROTEIN FROM
GREEN MUSSEL (*perna viridis*)
(PENGASINGAN DAN PENCIRIAN PROTEIN PEREKAT DARIPADA KAKI
KUPANG HIJAU (*perna viridis*))**

SYED ANUAR FAUA'AD SYED MUHAMMAD

RESEARCH VOTE NO: 71451

**Bioprocess Engineering Department
Faculty Of Chemical Engineering and Natural Resources Engineering
University Technology of Malaysia**

2003

UNIVERSITI TEKNOLOGI MALAYSIA

BORANG PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PENYELIDIKAN

TAJUK PROJEK : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHESIVE PROTEIN
FROM GREEN MUSSEL (*perna viridis*)

Saya _____

SYED ANUAR FAUA'AD B. SYED MUHAMMAD

(HURUF BESAR)

Mengaku membenarkan **Laporan Akhir Penyelidikan** ini disimpan di Perpustakaan Universiti Teknologi Malaysia dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut :

1. Laporan Akhir Penyelidikan ini adalah hakmilik Universiti Teknologi Malaysia.
2. Perpustakaan Universiti Teknologi Malaysia dibenarkan membuat salinan untuk tujuan rujukan sahaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat penjualan salinan Laporan Akhir Penyelidikan ini bagi kategori TIDAK TERHAD.

4. * Sila tanda (✓)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau Kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972).

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh Organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan).

TIDAK
TERHAD


TANDATANGAN KETUA PENYELIDIK

SYED ANUAR FAUA'AD
B. SYED MUHAMMAD

Nama & Cop Ketua Penyelidik

Tarikh : 2/06/03

CATATAN : * Jika Laporan Akhir Penyelidikan ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh laporan ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

DEDECATIONS

To Department of Bioproses Engineering, Research Management Centre (RMC) and fellow colleagues in Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering ,who gave us encouragement and Valuable support toward the success of this study.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to take this opportunity to express my sincere thanks and appreciation to the following persons and organization who have directly or indirectly given generous contributions toward the success of this research:

First and foremost, I would like to thank members of Department of Bioprocess Engineering for their keen effort and interest throughout the period of this study.

I am grateful to Research Management Centre (RMC) for the consultations and financial support under vot 71451, especially to Administration Manager of RMC, for enabling this work to be successfully completed.

I gratefully express my thanks to my fellow colleagues and friends who have given me a substantial moral support to finish the study.

Above all, I thank God the Almighty for His grace, mercy and guidance throughout my life.

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ADHESIVE PROTEIN
FROM GREEN MUSSEL (*perna viridis*)**

(Keywords : Adhesive protein, L-DOPA, mussel)

Mussel ejaculate threads from phenol gland which is situated at its leg area. These threads are built from adhesive protein, which contain amino aromatic L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) acid. The objective of this study is to isolate and characterize adhesive protein from green mussel (*perna viridis*). First stage of the experiment is to isolate the protein from mussel feet by extraction method by using nitrogen liquid and dissolved in 0.7% perchloric acid followed by sulfuric acid and acetone. Second stage is to purify the protein using Sephadex Gel (G-200) and finally the characterization and identification by using HPLC, TLC, and electrophoresis gel. The protein concentrations after purification were measured using spectrophotometer with wave length 260 nm. Results for the three highest OD value samples showed that L-DOPA have been detected in the samples at R_f 0.15, 0.21, and 0.10. Results from HPLC showed that there are two types of amino acids contained in the samples. The first peak represents alanine while the second peak represents L-DOPA. From the samples amount of 6 gram, HPLC can detect the concentration of L-DOPA between 0.05 to 3 mg/L. However, characterization using electrophoresis gel was unsuccessful to determine the weight of protein in the samples.

Key researcher:

Syed Anuar Faua'ad Syed Muhammad

E-mail : syed@fkkksa.utm.my

Tel. No : 07-5576160

Fax No : 07-5581463

Vote No : 71451

**PENGASINGAN DAN PENCIRIAN PROTEIN PEREKAT DARIPADA KAKI
KUPANG HIJAU (*perna viridis*)**
(Kata Kunci : Protein perekat, L-DOPA, kupang)

Kupang merembeskan bebenang dari kelenjar fenol yang terdapat pada bahagian kakinya. Bebenang ini terbina daripada protein perekat yang mengandungi asid amino aromatik L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). Kajian ini bertujuan untuk mengasingkan dan mencirikan protein perekat yang terdapat pada kaki kupang hijau (*perna viridis*). Peringkat pertama eksperimen ini adalah untuk mengasingkan protein perekat daripada kaki kupang dengan cara pengekstrakan menggunakan cecair nitrogen dan dilarutkan dalam 0.7% asid perklorik diikuti dengan asid sulfuric dan aseton. Peringkat kedua adalah penulenan protein dengan menggunakan gel Sephadex (G-200) dan akhirnya pencirian serta penentuan protein menggunakan HPLC, TLC, dan gel elektroforesis. Kepekatan protein selepas penulenan ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 260 nm. Keputusan daripada tiga sampel yang mempunyai nilai OD yang tertinggi menunjukkan kehadiran L-DOPA pada R_f 0.15, 0.21, dan 0.10. Keputusan daripada HPLC menunjukkan terdapat dua jenis asid amino hadir dalam sampel. Puncak pertama mewakili L-alanin manakala puncak kedua mewakili L-DOPA. Daripada sampel dengan berat 6 gram, HPLC telah berjaya mengesan kepekatan L-DOPA antara 0.05 to 3 mg/L. Walau bagaimanapun, pencirian protein dengan menggunakan gel elektroforesis tidak berjaya menentukan berat protein dalam sampel.

Pengkaji:

Syed Anuar Faua'ad Syed Muhammad

E-mail : syed@fkkksa.utm.my

Tel. No : 07-5576160

Fax No : 07-5581463

Vote No : 71451

ISI KANDUNGAN

BAB	PERKARA	MUKA SURAT
	ABSTRACT	i
	ABSTRAK	ii
	ISI KANDUNGAN	iii
	SENARAI JADUAL	vi
	SENARAI RAJAH	vii
	SENARAI SIMBOL	viii
1	Pengenalan	
	1.1 Pengenalan Umum	1
	1.2 Objektif Kajian	2
	1.3 Skop Kajian	2
2	Kajian Literatur	
	2.1 Morfologi Kupang Hijau (<i>perna viridis</i>)	3
	2.2 Struktur Bysus Kaki Kupang dan Protein Perekat	4
	2.3 Aplikasi Protein Perekat	6
	2.3.1 Kelebihan Protein Perekat pada Kaki Kupang	7
	2.4 Aplikasi L-DOPA	8

3

METODOLOGI

3.1	Bahan-bahan Kimia yang Digunakan	9
3.2	Kaedah	10
3.2.1	Pengumpulan Kaki Kupang	12
3.2.2	Proses Penghomogenan Kaki Kupang	12
3.2.3	Proses Pengekstrakan Sampel Protein	13
3.3	Ujian Protein Piawai – Ujian Bradford	14
3.4	Penulenan Protein yang Diperolehi	14
3.4.1	Penyediaan Turus Kromatografi Gel Tersekat Gerak G-200	14
3.4.2	Kaedha Kromatografi Gel Tersekat Gerak G-200	14
3.5	Teknik Kromatografi Nipis (TLC)	16
3.6	Pengesanan L-DOPA (Kaedah HPLC)	17
3.7	Elektroforesis Gel Poliakrilamida	18
3.7.1	Penyediaan Gel Poliakrilamida	18
3.7.2	Larian Elektroforesis	18

4

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.1	Keputusan Sampel Ekstrak	20
4.1.1	Bacaan OD bagi Sampel Ekstrak	20
4.2	Keputusan Kaedah Gel Tersekat Gerak	20
4.3	Keputusan Kaedah TLC	22
4.4	Keputusan Kaedah SDS-PAGE Urea	23
4.5	Keputusan Pengesanan Protein L-DOPA dengan HPLC	24
4.6	Perbincangan	25

5	KESIMPULAN DAN CADANGAN	
	5.1	Kesimpulan 30
	5.2	Cadangan 30
	RUJUKAN	31
	LAMPIRAN 1-22	34

SENARAI JADUAL

JADUAL	TAJUK	MUKA SURAT
4.1	Nilai OD Larutan protein bagi Jarak Gelombang Berlainan	20
4.2	Nilai R_f bagi Setiap Komponen Selepas Pemisahan TLC	23
4.3	Masa Penahanan untuk Sampel Piawai	24
4.4	Masa Penahanan Sampel yang Diuji	24
4.5	Peratus Perbezaan Jarak Sampel dengan Bahan Piawai	26
4.6	Nilai OD Sampel yang Digunakan untuk Proses Pengesanan	27
4.7	Kepekatan Kandungan L-DOPA di dalam Sampel yang Diuji	29

SENARAI RAJAH

RAJAH	TAJUK	MUKA SURAT
2.1	Struktur Kupang Hijau dan Keduduakn Plak pada Bebenang (Winter, 1998)	4
2.2	Struktur Bebenang daripada Kaki Kupang	6
3.1	Carta Alir Metodologi Penting Kajian yang Dijalankan	11
3.2	Kaedha Penulenan Menggunakan Kaedah Gel Sephadex G-200	15
4.1	Graf Nilai OD Sampel pada Jarak Gelombang 230 nm	21
4.2	Graf Nilai OD Sampel pada Jarak Gelombang 230 nm	21

SENARAI SIMBOL

APS	-	Ammonium Persulfat
Da	-	Dalton
DOPA	-	Dihidroksifenilalanin
Mefp	-	Protein daripada kaki kupang
nm	-	nanometer
PAGE	-	Elektroforesis gel poliakrilamida
SDS	-	Natrium Sodisulfat
TLC	-	Kromatografi lapisan nipis
HPLC	-	Kromatografi cecair prestasi tinggi

BAB 1

PENGENALAN

1.1 Pengenalan Umum

Kupang hijau merupakan sejenis haiwan yang hidup di dalam air masin dan merupakan salah satu daripada hasil penternakan air yang popular. Kupang merembeskan bebenang daripada kelenjar fenol yang terdapat pada bahagian kakinya untuk membantu melekatkan dirinya kepada bahan lain seperti kayu, batu, logam, dan plastik yang terdapat di dasar sungai. Bebenang ini dikenali sebagai 'bysus' dan terbina daripada protein perekat. Bysus ini mempunyai potensi yang perlu diberi perhatian kerana mempunyai potensi yang tinggi (elastik), iaitu berkebolehan bertahan tekanan sehingga 200 MPa, terhasil 5 minit per benang, dan bebenang asalnya tidak rosak dalam jangka masa satu hingga dua tahun. Ia mempunyai keupayaan melekat pada pelbagai jenis permukaan. Menurut kajian yang terbaru, protein perekat pada permukaan kaca, 'slate', 'plexiglass', asetal, dan tendon malahan boleh melekat pada gigi dan tulang.

Kajian terhadap protein perekat telah lama diadakan. Ia bermula sejak tahun 1960an apabila Jabatan Kajian Laut Amerika Syarikat mengadakan program mengenalpasti protein perekat daripada haiwan laut (Taylor & Waite, 1997). Kajian untuk mengaplikasikan protein perekat dalam bidang perubatan telah dilakukan oleh Institut Kebangsaan beberapa tahun selepas itu (Anon, 1968). Kajian yang telah dilakukan terhadap kupang biru (blue mussel) mendapati protein perekat ini mengandungi asid amino L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA). Pelbagai kaedah telah digunakan untuk mengenalpastikan kehadiran L-DOPA dalam kupang biru. Kaedah pemisahan SDS-PAGE telah diterangkan oleh Pardo et. Al (1990)

dan telah diubahsuaikan oleh Rzepecki et. al (1991). Manakala Waite dan Tanzer (1980) telah menggunakan kaedah kromatografi lapisan nipis dua dimensi dan kromatografi penukaran ion. Kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC) dan kaedah gel tersekat gerak sefadak (sephadax) juga digunakan untuk pemisahan protein perekat.

Protein perekat dan L-DOPA mempunyai potensi yang tinggi dalam bidang bioteknologi dan kejuruteraan genetik yang mampu dikomersilkan untuk diaplikasikan di dalam bidang pembuatan dan perubatan.

1.2 Objektif Kajian

Objektif kajian adalah untuk mengesan dan mencirikan L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) daripada protein perekat yang terdapat pada kaki kupang hijau (*perna veridis*).

1.3 Skop Kajian

1. Mendapatkan sampel kaki kupang dari Sungai Danga, Johor Bahru
2. Menyediakan larutan protein piawai dari albumin lembu
3. Menyediakan larutan protein daripada kaki kupang dengan menghancurkan kaki kupang dengan cecair nitrogen
4. Menjalankan kromatografi tersekat gerak
5. Menjalankan TLC
6. Menjalankan kaedah elektroforesis gel poliakrilamida (SDS-PAGE)
7. Mengesan kehadiran L-DOPA dengan menggunakan kaedah HPLC

BAB 2

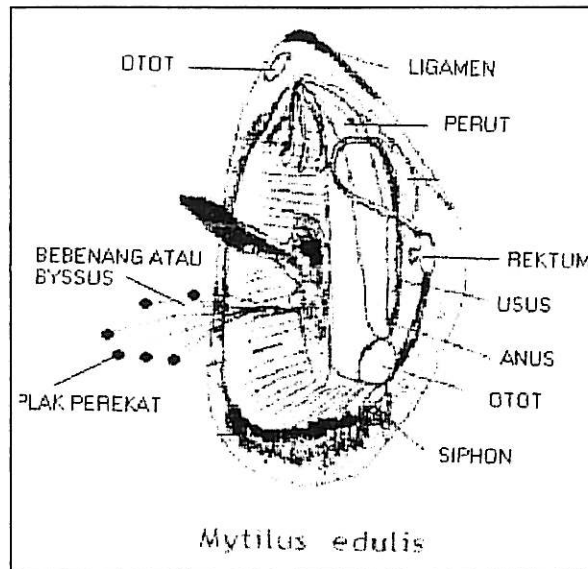
KAJIAN LITERATUR

2.1 Morfologi Kupang Hijau (*perna viridis*)

Kupang merupakan haiwan dwikutub yang mempunyai cangkerang yang keras, badan yang lembut, dan kaki yang berotot. Bahagian yang lembut merupakan organ respirator, pencernaan, dan bahagian penting yang lain. Kawasan yang bersuhu 26-32°C, pH 7.1-8.5, kemasinan air 27-35‰, oksigen terlarut 4-6 mg/L air laut, dan kedalaman air surut terendah adalah pada 3-4 meter merupakan kawasan pembiakan kupang yang baik (Mohd Noor dan Choo, 1985).

Cangkerang kupang yang berbentuk bujur dan cembung ini boleh memberikan beberapa maklumat mengenai umur dan jenis spesies kupang itu. Cangkerang kupang diperbuat daripada protein dan berfungsi sebagai pelindung manakala lapisan tengah pula berfungsi sebagai organ deria sentuh, bau, dan sebagainya.

Kaki kupang terletak di antara dua cangkerang yang berfungsi untuk mengawal pergerakan dan kedudukan kupang pada dasar laut. Kaki kupang berupaya melekat pada permukaan di dasar selat dan tahan terhadap rintangan ombak. Keupayaan ini disebabkan oleh sejenis bebenang yang dirembeskan keluar daripada kakinya yang mempunyai bahan perekat tersendiri. Perekat ini merupakan salah satu bahagian yang terdapat pada kaki kupang yang berdiameter 1.0 mm dan 2-4 cm panjang. Kupang boleh menghasilkan 'bysus' ini berulang kali untuk melekatkan dirinya kepada permukaan batu atau permukaan pepejal yang lain (Xiaoxia Qin, J. Herbert Waite, 1995).



Rajah 2.1 : Struktur kupang hijau dan kedudukan plak perekat pada bebenang (Winter, 1998)

2.2 Struktur 'Byssus' Kaki Kupang dan Protein Perekat

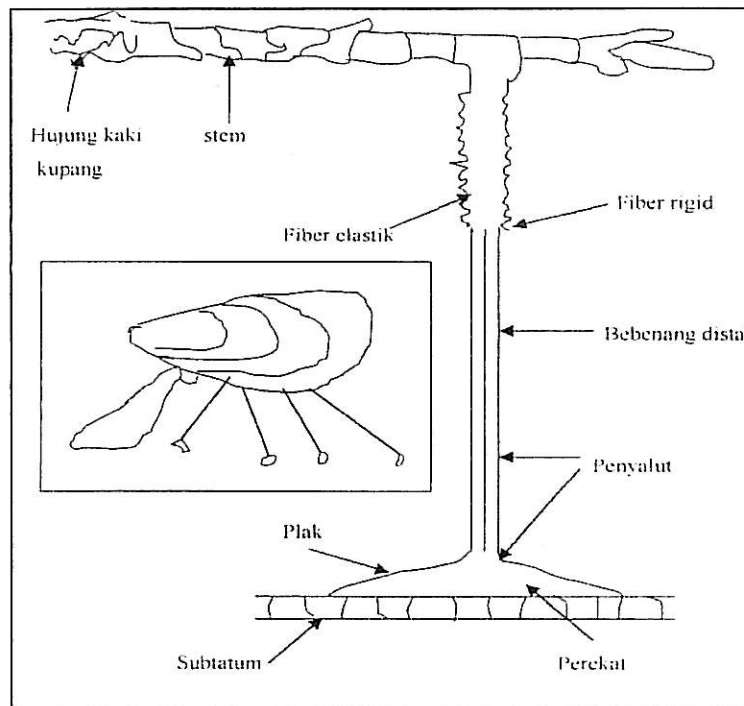
Struktur bebenang yang dikeluarkan daripada kupang adalah suatu struktur yang kompleks. Ia boleh dibahagikan kepada tiga bahagian iaitu bahagian distal, proksimal, dan plak. Bahagian proksimal terbina daripada fiber elastik sepanjang 5-10 mm dan bersambung pada hujungnya dengan bahagian distal yang terbina daripada fiber rigid sepanjang 10-20 mm dan diakhiri dengan plak yang berdiameter 2-3 mm. Kolagen menyebabkan struktur plak dan benang ini kuat apabila berhadapan dengan air pasang surut dan serangan ombak.

Keseluruhan bahagian bebenang yang terdapat pada kaki kupang dilindungi oleh lapisan setebal 5-10 μm yang berfungsi untuk melindungi keseluruhan bahagian dalaman bebenang daripada mengalami serangan mikrobial, geseran, dan hidrolisis.

Lapisan ini dirembeskan oleh kelenjar aksesori yang terdapat pada kaki kupang. Bebenang ini mempunyai pelbagai kelebihan dalam membantu kehidupan kupang di dasar laut. Setiap kupang mempunyai bebenang dalam jumlah yang besar. Plak perekat yang terdapat pada hujung bebenang ini dapat melekatkan kupang pada permukaan lain seperti kayu dan batu dan mengelakkannya daripada hanyut dibawa arus. Bebenang ini mempunyai kekuatan terhadap tekanan sebanyak 200 MPa dan mampu bertahan terhadap pasang surut laut. Kadar pembentukannya amat singkat iaitu pada kadar 5minit/benang. Jangka hayat bagi bebenang ini ialah antara 1-2 tahun.

Bebenang dan plak terhasil daripada beberapa jenis protein seperti protein berkolagen tinggi dan empat protein yang dikenali sebagai MAP (Mussel Adhesive Protein) atau fp (Foot Proteins). Semua protein ini mengandungi dihidroksifenilalanin atau DOPA yang terhasil daripada pengoksidaan tyrosin.

Protein kaki mengandungi fp1, fp2, dan fp3 manakala bebenang kaki kupang hanya mengandungi fp1 sahaja. Jenis fp1 mengandungi decapeptida yang berulang dan kaya dengan dihidroksiprolin dan membentuk kolagen yang terdapat dalam bebenang kaki kupang. Kajian yang dijalankan di Barat terhadap kupang biru mendapati molekul perekat yang terdapat pada plak merupakan protein perekat yang terbina daripada asid amino aromatik iaitu L-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), dityrosine, dan tyrosine.



Rajah 2.2 : Struktur bebenag daripada kaki kupang

2.3 Aplikasi Protein Perekat

Protein perekat dihasilkan oleh haiwan invertebrata seperti labah-labah, ulat sutera, lalat, dan sebagainya. Labah-labah memerlukan protein perekat untuk membina sarangnya dan sebagai perangkap untuk mendapatkan mangsanya. Ulat sutera menghasilkan perekat yang diperlukan untuk pembinaan sarang pupa. Larva lalat memerlukan protein perekat untuk memerangkap makanan yang diperlukan untuk pembesarannya. Menurut kajian yang dibuat, didapati protein perekat pada kupang tidak hanya melekat pada batu dan kayu pada dasar laut malahan berkemampuan melekat pada permukaan lain seperti kaca, asetal, 'slate', 'plexiglass', dan teflon (Young dan Crisp, 1982). Ia juga boleh melekat pada tulang dan gigi (Bowen, 1973). Selain daripada itu, kegunaan protein perekat dalam bidang kimia dan biokimia telah mula dikaji. Pada permukaan logam, pretein

perekat akan membentuk filem yang pasif dan didapati rintang pada hakisan laut (Hansen et. al, 1995).

Dalam pengkulturan sel pula, pertumbuhan sel bergantung pada beberapa faktor seperti permukaan untuk bersentuh. Ketiadaan permukaan untuk bersentuh ini akan menyebabkan sel mati. Preotein perekat daripada kupang biru didapati berfungsi melekatkan sel kepada permukaan polisterin atau kaca tanpa menghasilkan toksik dan telah diaplikasikan dalam teknik pengkulturan sel sihat, tumor, dan sebagainya (Taylor dan Waite, 1997). Berdasarkan kepada keistimewaan ini, jelasnya bahawa protein perekat boleh dieksploitasikan untuk tujuan perubatan dan komersil. Bebenang yang dihasilkan merupakan hasil sampingan yang tidak mempunyai nilai pemakanan (non-edible) dan bisanya akan dibersihkan sebelum kupang dipasarkan. Hasil daripada pengekstrakan protein perekat daripada bebenang merupakan nilai tambahan kepada pengusaha penternakan kupang.

2.3.1 Kelebihan Protein Perekat pada Kaki Kupang

Kebolehan rintangan protein perekat kupang terhadap air oleh plak perekat ini disebabkan oleh banyak kandungan asid amino yang mengalami proses penghidroksian. Kumpulan -OH daripada 1,2-dihidroksibenzen (CATECHOL) diketahui mewujudkan ikatan hidrogen yang kuat berbanding dengan ikatan -OH pada struktur molekul air. Kelebihan ini membolehkan protein perekat pada kaki kupang memainkan peranan penting dalam bidang bioteknologi pada masa depan. Protein polyphenolic yang terdapat padanya adalah tidak toksik dan terbiodegradasi serta mempunyai immunogenesis yang rendah telah menarik perhatian lebih kepada bidang perubatan.

Dalam bidang perubatan, protein perekat ini dapat digunakan sebagai pelekat untuk menyambungkan tulang yang telah patah, tendon yang tidak dapat disambung ke ligamen dan juga tisu yang telah koyak. Di samping itu, ia juga digunakan dalam pergigian sebagai penambal kepada penyakit yang mengalami radang gigi serta untuk gigi yang telah patah.

2.4 Aplikasi L-DOPA

L-DOPA mempunyai nilai perubatan bagi mengubati penyakit Parkinson's. Parkinson's merupakan penyakit neurologi yang disebabkan oleh pengurangan pembentukan neuron iaitu sel saraf di dalam otak yang mengawal pergerakan badan manusia. Pengurangan pembentukan neuron menyebabkan neuro transmitter yang dikenali sebagai dopamine berkurangan dan melemahkan pergerakan. Penyakit ini menyerang golongan yang berumur 70-80 tahun. Dilaporkan di USA lebih daripada sejuta orang diserang penyakit ini dan lebih kurang 50 000 kes baru dilaporkan pada setiap tahun (Somerset Pharmaceutical, 1997).

Dopamine yang menjadi isyarat kimia dalam mengawal badan tidak boleh dibekalkan secara langsung kepada penyakit kerana ia tidak boleh merentasi darah ke otak. Namun, L-DOPA yang menjadi hasil pertengahan sebelum dopamine terhasil digunakan untuk menghasilkan dopamine bagi mencukupkan jumlah dopamine dalam otak. Dalam perubatan, L-DOPA dikenali dengan nama genetik levodopa (Somerset Pharmaceuticals, 1997). Penggunaan L-DOPA didapati sangat berkesan dalam mengubati penyakit Parkinson's dan buat pertama kali pada tahun 1960an dapat melambatkan kemunculan simptom penyakit ini.

BAB 3

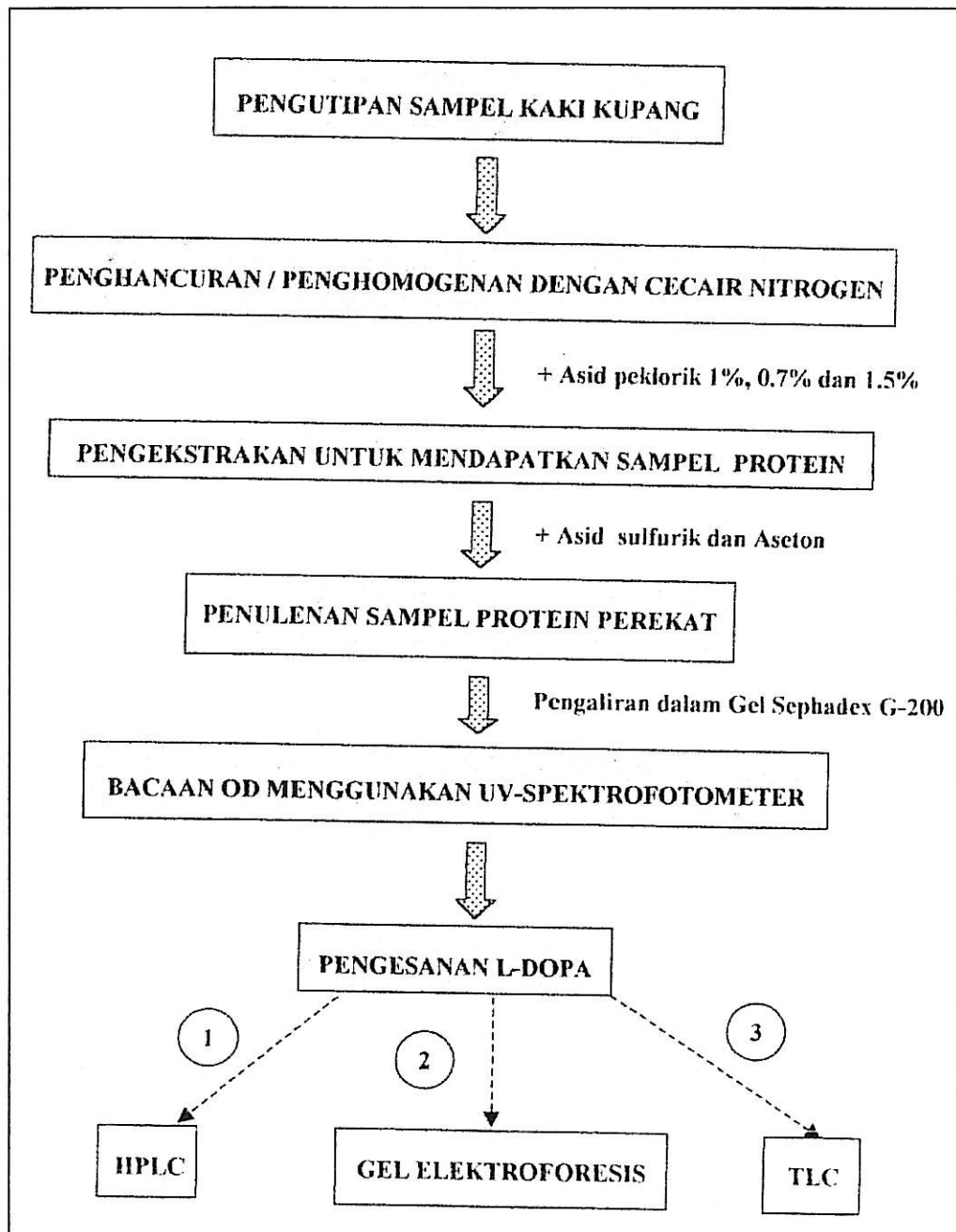
METODOLOGI

3.1 Bahan-bahan Kimia yang digunakan

1. Asid Asetik (R&M Chemical, UK)
2. Ammonium Persulfat (ANALAR, P0032)
3. Akrilamida (Emprotech, SE 141000)
4. Natrium Klorida (Merck, Germany)
5. L-alanin (Gibco Laboratories, USA)
6. Cecair Nitrogen (Sigma, N9256)
7. Asid Hidroklorik (Mallinckrodt, Paris)
8. Etanol (R&M Chemical, UK)
9. Aseton (R&M Chemical, UK)
11. L-tyrosin (GIBCO Laboratories)
12. Bis Akrilamida (Emprotech, G5-006)
13. SDS (Emprotech, SE141037)
14. Tris (Genemate, C-556)
15. TEMED
16. Glisin (R&M Chemical, UK)
17. Coomassie Blue-250 (Sigma, USA)
18. Asid Perklorik (Mallinckrodt, Paris)
19. 3,4-dihidroksifenilalanin (Fluke Chem, Switzerland)
20. Sebuk Gel Sephadex G-200 (ANALAR 10289)
21. Acetonitrile (gred HPLC)
22. L-tyrosin Piawai
23. L-DOPA Piawai

3.2 Kaedah

Kaki kupang yang diambil dari Sungai Danga, Johor Bahru dikumpulkan dan proses penghomogenan menggunakan cecair nitrogen dilakukan. Buffer yang digunakan adalah asid perklorik 1% dan 0.7%. Setelah kaki kupang dihancurkan, proses pengekstrakan dilakukan. Kaedah yang digunakan untuk penulenan dan pencirian protein perekat kaki kupang adalah teknik kromatografi gel tersekat gerak Sephadex G-200, TLC, HPLC dan larian elektroforesis.



Rajah 3.1 : Carta alir metodologi penting kajian yang dijalankan

3.2.1 Pengumpulan Kaki Kupang

Lebih kurang 150 ekor kupang diceraikan daripada tali sarangnya bersama-sama dengan kakinya. Kaki kupang bersama dengan plak perekat kaki kupang dikikiskan dengan menggunakan pisau cukur dan diletakkan ke dalam botol. Kemudiannya setiap ekor kupang diikat kembali dengan menggunakan gelang getah dan disisipkan kepada tali tangsi yang telah diikat kepada cermin-cermin segiempat.

Setiap keping cermin kaca ini boleh memuatkan lebih kurang 18 ekor kupang dengan menggunakan kedua-dua belah bahagian plat kaca. Cermin-cermin kaca diletakkan di dalam raga besar dan ditenggelamkan ke dalam air. Raga besar yang berisis cermin kaca dibiarkan selama dua atau tiga hari, bergantung kepada cuaca dan air pasang surut lokasi kupang ditenggelamkan.

Selepas beberapa hari, didapati kupang-kupang telah melekatkan kakinya pada permukaan kaca. Untuk memisahkan kupang dengan kakinya, pisau cukur digunakan bagi meninggalkan plak perekat yang hendak dikaji dan diletakkan di dalam bekas plastik khas yang telah disterilkan.

3.2.2 Proses Penghomogenan Kaki Kupang

Sampel kaki kupang yang telah dibersihkan dikeluarkan dari peti penyejukbeku dan dibiarkan seketika pada suhu bilik lebih kurang 25-27°C. Kaki kupang dikeringkan dengan menggunakan kertas turassebelum ditimbang. Setelah ditimbang, lesung khas digunakan untuk menghancurkan kaki kupang, sambil menuangkan cecair nitrogen dengan kerap. Antan lesung tidak ditumbukkan terus ke dalam lesung untuk mengelakkan sampel melantun keluar, maka antan itu diputarkan mengikut arah jam dan melawan arah jam secara bergilir-gilir

mengelilingi lesung. Jangka masa proses penghancuran adalah lebih kurang satu jam.

3.2.3 Proses Pengekstrakan Sampel Protein

Kaki kupang yang dihancurkan dicampurkan dengan 24 ml 0.7% asid perklorik. Asid perklorik sebaik-baiknya dimasukkan ke dalam peti sejuk untuk memastikan suhu larutan asid berada dalam keadaan suhu rendah. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam tiub eppendorf dan diemparkan pada kadar 11, 000 rpm untuk jangka masa 10 minit pada suhu 10°C.

Supernatan, S1 setiap tiub eppendorf dikumpulkan dan disukat kuantitinya. Kuantiti isipadu yang diperolehi adalah mewakili keseluruhan isipadu sebanyak 27.0 ml. Kuantiti isipadu asid sulfurik pekat bergantung kepada kuantiti isipadu keseluruhan.

$$\begin{aligned}\text{Isipadu asid sulfurik} &= \text{isipadu S1} \times 0.0168 \\ &= 16 \text{ ml} \times 0.0168 \\ &= 0.2688 \text{ ml} \\ &= 269 \mu\text{l}\end{aligned}$$

Setelah kuantiti asid sulfurik dimasukkan ke dalam larutan supernatan S1, larutan itu digoncang dengan kuat. Seterusnya aseton ditambah dengan isipaduan dua kali ganda isipadu S1. Campuran larutan dikacau dengan menggunakan pengaduk magnetik di dalam bilik sejuk bersuhu 4°C selama 20 minit sebelum dimasukkan ke dalam tiub eppendorf. Selepas itu, semua tiub eppendorf yang berisi larutan diemparkan sekali lagi pada kadar 11, 000 rpm untuk 10 minit pada suhu 10°C.

Untuk 6 gram sampel asal, 38 ml asid asetik ditambahkan kepada pellet yang terhasil berdasarkan nisbah 1 : 6 daripada berat sampel asal. Pellet itu dimasukkan ke dalam peti sejuk sebelum memulakan proses penulenan. Hasil ekstrak dianalisis secara kromatografi gel tersekat gerak, sebelum menjalani kaedah seterusnya iaitu Kromatografi Lapisan Nipis (TLC) dan Kromatografi Cecair Berprestasi Tinggi (HPLC).

3.3 Ujian Protein Piawai – Ujian Bradford

Kaedah ujian Bradford adalah ujian yang sering digunakan untuk menentukan lengkung piawai protein. Kaedah ini agak cepat dan mudah. Masa yang diambil hanya 10 minit dan hanya menggunakan protein dalam kuantiti kecil. Larutan preotin (maksimum 100 µl) dipipetkan ke dalam tabung uji dan ditambahkan dengan buffer eksperimen supaya isipadu akhir menjadi 100 µl. Kemudian sebanyak 1 ml Bradford Working Buffer (terdiri daripada 425 ml air suling, 15 ml 95% etanol, 30 ml 88% asid fosforik, dan 30 ml larutan stok Bradford) ditambahkan sebelum diaduk menggunakan pengadun Vortex. Setelah itu, nilai OD dibaca dengan menggunakan alat spektrometer pada jarak gelombang 595 selepas 2 minit (Read dan Northcote, 1981) tetapi tidak melebihi 1 jam (Bearden, 1978) selepas semua larutan telah dicampurkan.

3.4 Penulenan sampel Protein yang Diperolehi

3.4.1 Penyediaan Turus Kromatografi Gel Tersekat Gerak G-200

Penyediaan turus kromatografi memerlukan pengukuran daripada segi panjang dan jejari turus. Pengukuran membolehkan pengukuran isipadu gel yang

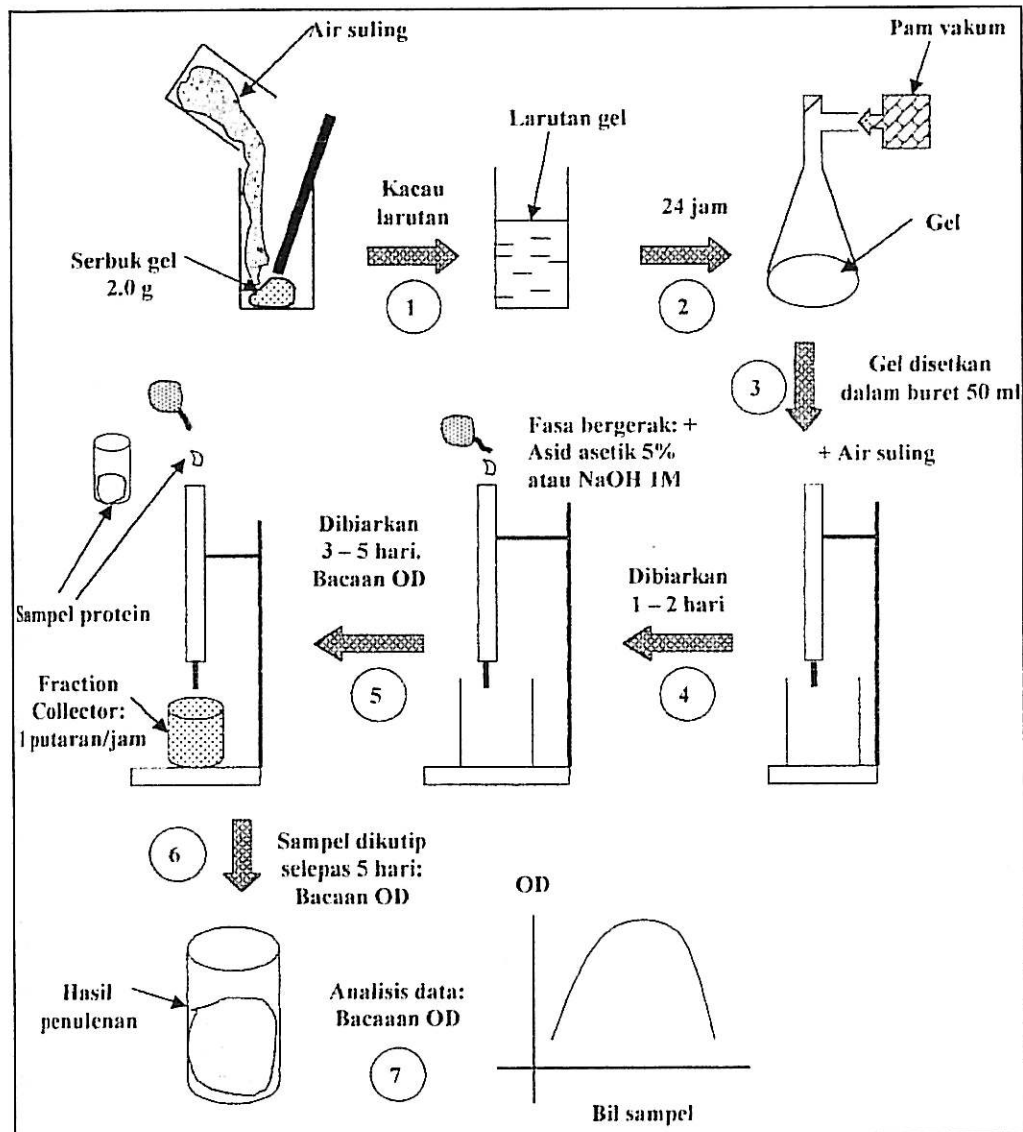
diperlukan untuk ketinggian gel yang bersesuaian. Sebanyak 1 gram gel tersekat gerak G-200 dapat menghasilkan 12 ml isipadu turus. Dalam ujikaji ini, sebanyak 2.0 gram serbuk Gel Sephadex G-200 digunakan. Gel dicampurkan dengan air suling dengan kadar pencampuran yang perlahan-lahan bagi mengelakkan daripada berlakunya ketidaklarutan gel atau gel bergumpal tanpa larut sepenuhnya. Gel itu dibiarkan selama 24 jam untuk memastikan gel telah kembang dan sesuai untuk digunakan sebagai gel tersekat gerak.

Gel yang disediakan divakumkan dengan menggunakan pam vakum bagi memastikan tiada gelembung-gelembung udara yang terperangkap. Proses ini mengambil masa lebih kurang 45 minit. Gel yang dipastikan tiada gelembung udara dituangkan ke dalam buret yang berukuran 50 ml dengan kepanjangan 60 cm. Gelembung udara dipastikan tidak terhasil semasa proses penuangan gel dijalankan dan penuangan air suling dilakukan. Gel itu dibiarkan selama sehari dalam buret penulenan bagi memastikan gel adalah padat sebelum proses penulenan dijalankan.

3.4.2 Kaedah Kromatografi Gel Tersekt Gerak G-200

Setelah diekstrakkan dalam media akueus dan sebahagian diambil untuk larian elektroforesis, isipadu sampel yang diperolehi diambil. Sampel ini dilalukan melalui kolum kromatografi gel tersekat gerak secara berperingkat. Sampel dimasukkan dalam kolum gel dan dibiarkan menuruni gel dengan keluaran dibuka. Bacaan tidak diambil serta-merta untuk memastikan semua larutan penimbal sebanyak isipadu gel mengalir keluar terlebih dahulu. Namun, isipadu larutan penimbal dikumpulkan untuk disukat bagi memastikan jumlah isipadu yang telah keluar. Ini adalah bertujuan untuk memastikan pengambilan hasil adalah tepat. Apabila semua larutan penimbal telah menuruni gel, hasil mula dikutip untuk setiap minit. Setelah semua hasil dikutip, setiap fraksi diambil bacaan OD bagi λ_{230} dan λ_{260} dengan menggunakan alat spektrofotometer. Tiga sampel yang dipilih

berdasarkan nilai OD tertinggi diambil untuk menjalani kaedah TLC dan proses elektroforesis bagi menguji kehadiran protein perekat berdasarkan berat molekul yang diperolehi.



Rajah 3.2 : Kaedah penulenan menggunakan kaedah gel Sephadex G-200

3.5 Teknik Kromatografi Lapisan Nipis (TLC)

Plat yang digunakan dalam ujikaji ini adalah gel silika Whatman KC18F yang bersaiz 20 cm x 20 cm. Manakala fasa gerak terdiri daripada larutan isopropanol, asid asetik, dan air suling dengan nisbah 8:1:1. Sebanyak 100 ml larutan fasa gerak dimasukkan ke dalam tangki TLC dan dibiarkan meruap sehingga keadaan di dalam tangki menjadi tepu. Larutan piawai L-DOPA sebanyak 0.01 mg dilarutkan dalam 10 ml air suling. Begitu juga dengan L-tyrosin dan L-alanin. Larutan piawai dan sampel dititiskan sebanyak 10 μ l ke atas permukaan plat di titik asalan dengan menggunakan tiub kapilari, dengan jarak setiap titik ialah 2 cm. Diameter titikan yang dibuat adalah di antara 3 hingga 6 mm.

Titikan dibuat dengan berhati-hati untuk memastikan tidak tersebar, erata tempat. Selepas setiap titikan dibuat, titik tersebut dikeringkan dengan menggunakan alat pengering rambut. Setelah kesemua sampel dan piawai telah dititiskan dan dibiarkan keing, barulah plat dimasukkan ke dalam tangki TLC dan dibiarkan sehingga semua fasa gerak mencapai garisan sempadan. Masa yang diambil untuk sampai ke garis sempadan adalah selama 4 jam 30 minit. Plat itu dikeluarkan dari tangki dan dimasukkan ke dalam ketuhar pada suhu 100°C untuk jangka masa 10 minit. Setelah itu, plat dikeluarkan dari ketuhar dan disembur dengan reagen ninhidrin untuk mengesan warna-warna pemisahan yang terhasil untuk tujuan pengesanan komponen. Plat dimasukkan sekli lagi ke dalam ketuhar pada tempoh dan suhu yang sama. Setelah pemanasan, titik akan kelihatan kerana terdapat warna seakan-akan merah jambu yang terbentuk. Plat juga boleh diletakkan di bawah cahaya ultra ungu untuk melihat dengan lebih jelas komponen-komponen tersebut. Jarak jalur (R_f) yang terbentuk bagi setiap komponen diukur dan nilai R_f dibandingkan antara sampel dengan piawai.

3.6 Pengesanan L-DOPA (Kaedah HPLC)

Sistem HPLC yang digunakan di dalam ujikaji ini terdiri daripada :

- a) Sistem kawalan (Waters 600 controller)
- b) Penyuntik sampel (Waters 717 plus autosampler)
- c) Kolum C₁₈ (Nova-Pak)
- d) Pengesan UV (Waters 486 tunable absorbance detector)
- e) Kromatogram (Perisian Millennium Chromatography Manager)

Pelarut yang digunakan sebagai fasa bergerak dalam kajian ini ialah acetronitrile (gred HPLC) yang dilarutkan di dalam larutan asid trifluoroasetik (TFA) 0.1%. Sebanyak 500 ml larutan fasa gerak disediakan untuk dialirkan ke dalam kolum. Nisbah yang digunakan di dalam penyediaan larutan ini ialah 25% acetronitrile dan 75% TFA. Campuran pelarut ini perlu dituras terlebih dahulu dengan menggunakan penuras membran selulosa acetat 0.45 μm sebelum disuntik masuk ke dalam HPLC. Kolum C₁₈ fasa terbalik (reverse phase) berukuran 3.9 x 150 mm digunakan sebagai tempat berlakunya pemisahan. Partikel-partikel di dalam kolum yang bertindak sebagai fasa tetap mempunyai saiz 4 μm dan berbentuk sfera.

Sampel untuk larian HPLC tidak perlu disuntik masuk secara manual kerana autosampler digunakan. Isipadu setiap sampel yang diperlukan ialah lebih kurang 1 mm dan ianya diisikan ke dalam autosampler sebelum disuntik masuk ke dalam HPLC. Sebanyak sampel yang hendak disuntik masuk ke dalam kolum perlu dituras terlebih dahulu menggunakan penuras nilon 0.2 μm . Ia bertujuan untuk mengelakkan sebarang kehadiran bendasing mengalir masuk ke dalam kolum yang boleh menjejaska keputusan HPLC. Kewujudan bendasing boleh menyebabkan kolum yang digunakan tersumbat dan meningkatkan tekanan operasi HPLC.

Kadar alir pelarut ke dalam kolum ialah 1 ml/minit dan profil penyingkiran komponen diukur oleh pengesan UV pada jarak gelombang 214 nm. Pelarut fasa

bergerak perlu dialirkan ke dalam kolum selama 10 minit terlebih dahulu sebelum sampel boleh mula disuntik masuk. Ia bertujuan supaya pelarut-pelarut di dalam kolum yang digunakan sebelum ini dapat disingkirkan dan bacaan kromatogram berada dalam keadaan keseimbangan agar tiada lagi kehadiran puncak-puncak yang tidak berkenaan.

3.7 Elektroforesis Gel Poliakrilamida

3.7.1 Penyediaan Gel Poliakrilamida

Dalam penyediaan gel, komposisi untuk menghasilkan gel seperti larutan akrilamida/Bisakrilamida, larutan SDS, larutan ammonium sulfat, dan Tris-HCl terlebih dahulu. Larutan ini dicampurkan mengikut sukatan sebagaimana lampiran. Selain daripada larutan ini, bahan lain yang digunakan adalah TEMED. Semua barang ini dicampurkan dan dituangkan ke dalam kepingan kaca (sandwich). Selepas larutan ini membeku dan membentuk gel, sesikat dimasukkan untuk menghasilkan perigi muatan sampel.

3.7.2 Larian Elektroforesis

Sampel bagi setiapfraksi untuk setiap peringkat untuk kaedah kromatografi serta sampel daripada setiap peringkat kajian menggunakan pelarut organik akan dimasukkan ke dalam perigi-perigi pada gel poliakrilamida. Untuk setiap perigi, hanya 30 μl sampel yang dicampurkan dengan 10 μl 'tracking dye' dimasukkan. Bagi setiap gel, protein piawai iaitu 'broad range' dan 'kaleidoscope' dimasukkan. Ini bermakna pada setiap larian elektroforesis bagi gel besar (20 perigi) mengandungi 18 perigi yang mengandungi sampel dan 2 perigi yang mengandungi

protein pawai. Protein piawai adalah bertujuan untuk menganggarkan berat molekul bagi protein yang terdapat di dalam sampel.

Larutan penimbal tangki yang disediakan dimasukkan ke dalam tangki alatan elektroforesis, berfungsi sebagai pengalir arus elektrik dalam proses elektroforesis. Bekalan arus elektrik yang digunakan adalah 300 V. Sampel bergerak menuruni gel semasa larian dijalankan. Larian elektroforesis boleh dihentikan apabila sampel telah menuruni 99% atau dalam jangka masa 5 jam. Selepas larian dihentikan, gel poliakrilamida ditanggalkan dari kepingan kaca dan direndamkan ke dalam bekas yang berisi larutan pewarnaan. Jalur-jalur protein yang terbentuk di atas permukaan gel diwarnakan apabila direndam semalaman dengan penggoncangan berterusan atas alatan 'multimix'.

Proses penyahwarnaan dilakukan ke atas gel di mana gel direndamkan ke dalam larutan penyahwarnaan pula. Warna biru hanya terlekat pada jaluran protein sahaja, ini memudahkan untuk memastikan jarak jaluran bagi menganggarkan berat molekul protein yang diperolehi.

BAB 4

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

4.1 Keputusan Sampel Ekstrak

4.1.1 Bacaan OD bagi Sampel Ekstrak

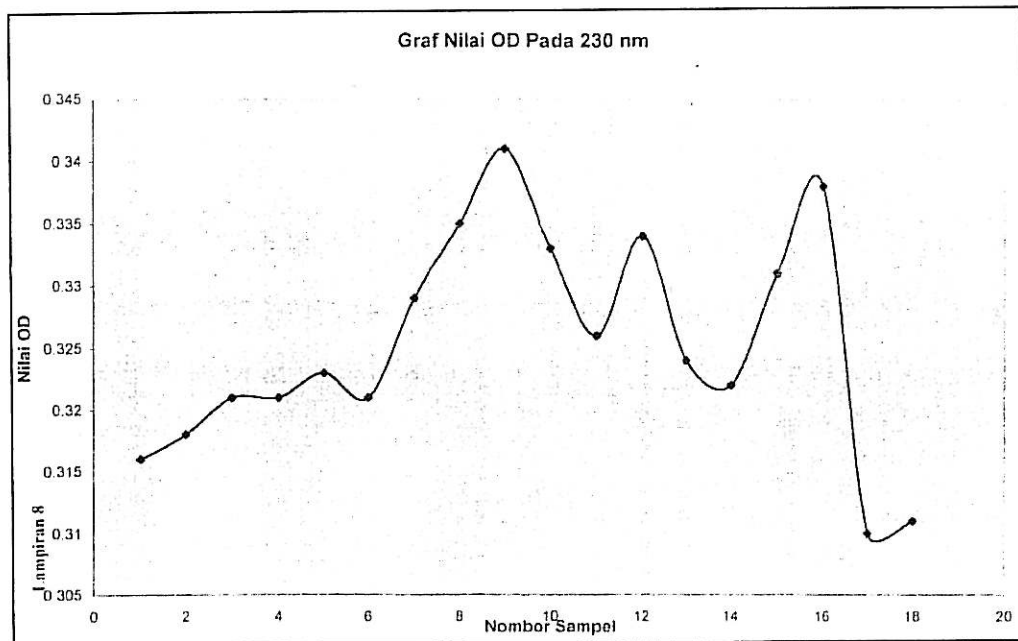
Sampel yang telah diekstrak telah di baca nilai OD dengan menggunakan empat jarak gelombang yang berlainan. Didapati nilai OD bagi sampel protein adalah lebih kurang sama dengan nilai protein piawai yang telah diuji sebelum ini.

Jadual 4.1 : Nilai OD larutan protein bagi jarak gelombang berlainan

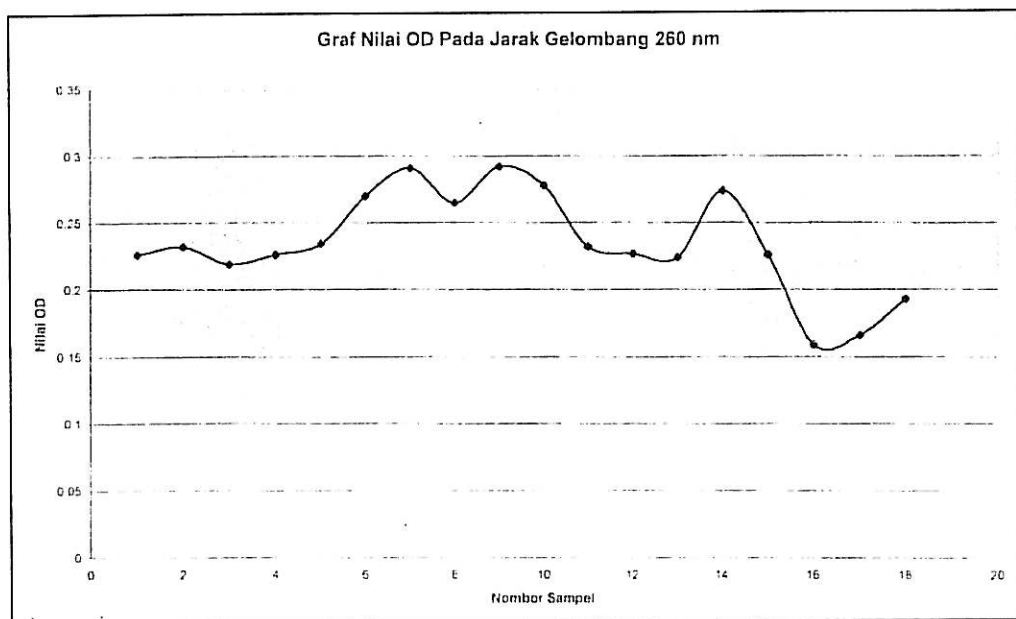
Jarak Gelombang	OD
214	0.418
230	0.272
260	0.192
280	0.199

4.2 Keputusan Kaedah Gel Tersekat Gerak

Selepas kaedah gel tersekat gerak, tiga sampel yang menunjukkan nilai OD tertinggi bagi gelombang diambil untuk menjalankan kaedah TLC.



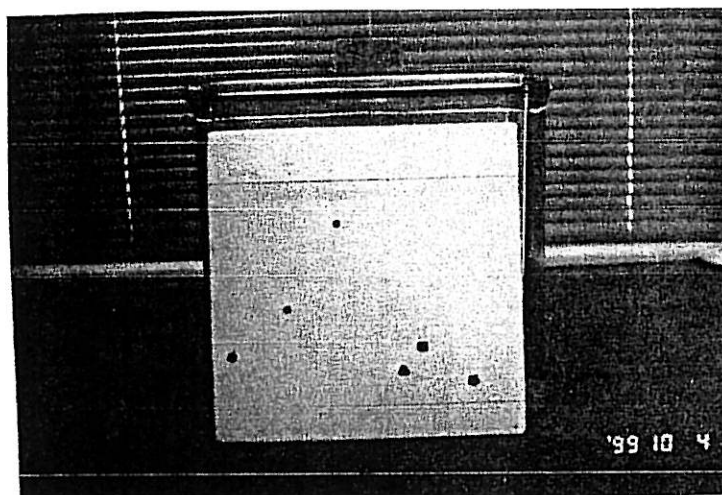
Rajah 4.1 : Graf nilai OD sampel pada jarak gelombang 230 nm



Rajah 4.2 : Graf nilai OD sampel pada jarak gelombang 260 nm

4.3 Keputusan Kaedah TLC

Sampel yang diambil untuk kaedah ini adalah sampel 8, 9, 16 daripada teknik kromatografi gel tersekat gerak. Nili R_f yang diperolehi bagi setiap komponen dalam kaedah TLC ditunjukkan dalam jadual.



Petunjuk :

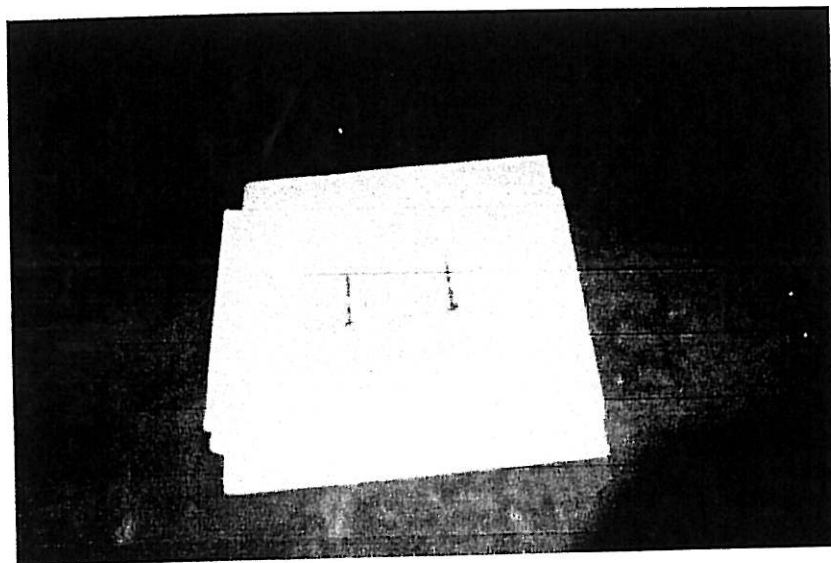
- | | | |
|---------|---|------------------|
| Titik 1 | - | L-DOPA piawai |
| Titik 2 | - | L-alanin piawai |
| Titik 3 | - | L-tyrosin piawai |
| Titik 4 | - | Sampel 1 |
| Titik 5 | - | Sampel 2 |
| Titik 6 | - | Sampel 3 |

Jadual 4.2 : Nilai R_f bagi setiap komponen selepas pemisahan TLC

Komponen	Nilai R_f
Piawai L-DOPA	0.23
Piawai L-alanin	0.57
Piawai L-Tyrosin	0.80
Sampel 1	0.15
Sampel 2	0.21
Sampel 3	0.10

4.4 Keputusan Kaedah SDS-PAGE Urea

Bagi teknik elektroforesis SDS-Urea-PAGE, jaluran yang terhasil dengan sempurna hanya jaluran kawalan, manakala jaluran bagi sampel dan piawai L-DOPA adalah kurang jelas. Kelihatan titik-titik di mana komponen yang disuntuk berhenti selepas elektroforesis ditamatkan.



4.5 Keputusan Pengesanan Protein L-DOPA dengan HPLC

Jadual 4.3 : Masa penahanan untuk sampel piawai

Sampel Piawai	Masa Penahanan
L-DOPA	2.367
Alanin	1.700
Tyrosin	3.000

Jadual 4.4 : Masa penahanan sampel yang diuji

No. Sampel	Masa Penahanan (t_R), min	
	Puncak 1	Puncak 2
1	1.917	2.367
2	1.917	2.367
3	1.917	2.367
4	1.917	2.367
5	1.917	2.367
6	1.917	-
7	1.917	-
8	1.917	2.367
9	1.917	2.367
10	1.933	
11	1.933	

4.6 Perbincangan

Daripada graf ketumpatan optik melawan fraksi sampel, terdapat tiga puncak yang jelas iaitu sampel 9, 12, dan 16. Berdasarkan bacaan OD bagi sampel ekstrak sampel yang dibaca pada empat jarak gelombang yang berlainan, iaitu 140 nm, 230 nm, 260 nm, dan 280 nm, didapati nilai OD bagi sampel hampir sama bagi semua jarak gelombang kecuali 140 nm. Ini mungkin disebabkan oleh jarak gelombang 140 nm terlalu jauh berbeza dengan 230 nm sedangkan jarak gelombang yang lain adalah hampir sama. Nilai OD bagi jarak gelombang 230 nm adalah 0.272 manakala nilai OD yang didapati daripada kaedah gel tersekat gerak adalah menghampiri nilai ini. Nilai OD sampel ekstrak agak rendah mungkin disebabkan terdapatnya campuran asid asetik dan aseton di dalam larutan. Nilai OD selepas kaedah gel tersekat lebih tinggi kerana sampel yang diuji telah ditulenkan dan kandungan protein dalam fraksi yang tertentu adalah lebih banyak dan tulen.

Sampel 9, 12, dan 16 menunjukkan nilai OD yang tinggi menggambarkan kehadiran protein yang banyak di dalam larutan sampel. Dalam kaedah TLC, tiga sampel ini telah dilarikan bersama tiga jenis sampel. Berdasarkan nilai yang diperolehi daripada kaedah TLC, didapati nilai R_f bagi komponen yang dipisahkan dalam kajian ini memberikan nilai 0.15, 0.21, dan 0.10.

Berdasarkan rajah plat yang ditandakan, didapati kedudukan piawai L-DOPA adalah lebih rendah jika berbanding dengan nilai piawai L-tyrosin dan L-alanin. Hanya satu titik sahaja yang dapat dikesan bagi pemisahan setiap komponen sampel dan kedudukan titik ini adalah berhampiran dengan piawai L-DOPA. Titik komponen yang berhampiran dengan kedua-dua piawai yang lain tidak dapat dikesan. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh kepekatan kedua-dua asid amino di dalam sampel adalah terlalu kecil berbanding dengan kepekatan L-DOPA atau langsung tidak mempunyai kedua-dua kandungan di dalam sampel. Hal ini menyebabkan tiada titik kelihatan mewakili kehadiran L-tyrosin dan L-alanin di dalam sampel. Terdapat titik yang berwarna pelbagai pada sampel protein

yang tergambar selepas proses pemisahan. Walau bagaimanapun, titik ini diabaikan kerana tidak memberikan warna yang serupa dengan warna protein piawai dan tidak menghampiri kedudukan titik komponen piawai. Nilai R_f yang diperolehi daripada kajian ini memberikan perbezaan antara piawai protein dan komponen sampel seperti yang ditunjukkan dalam jadual di bawah :

Jadual 4.5 : Peratus perbezaan jarak sampel dengan bahan piawai

No. Sampel	L-DOPA (%)	L-tyrosin (%)	L-alanin (%)
1	35	81	74
2	9	73	63
3	57	88	82

Didapati peratusan perbezaan ketiga-tiga sampel dengan piawai L-DOPA adalah sangat kecil berbanding dengan dua piawai yang lain. Melalui kaedah TLC, dapat disimpulkan bahawa L-DOPA telah dapat dikesan daripada sampel yang diambil daripada kaki kupang pada R_f 0.15, 0.21, dan 0.10. Ini menunjukkan bahawa salah satu daripada asid amino yang terdapat pada protein perekat daripada kaki kupang adalah menandungi L-DOPA.

Sebanyak 11 sampel diambil untuk tujuan pengesanan asid amino aromatik L-DOPA dengan kaedah HPLC. Jadual di bawah menunjukkan nilai OD untuk semua 11 sampel yang diambil daripada proses penulenan untuk proses pengesanan.

Jadual 4.6 : Nilai OD sampel yang digunakan untuk proses pengesanan

No. Sampel	Masa penurunan (jam)	Bacaan OD
1	78	0.767
2	90	0.706
3	96	0.759
4	106	0.769
5	126	0.807
6	132	0.769
7	138	0.901
8	144	0.725
9	150	0.722
10	156	0.683
11	162	0.716

Dalam proses pengesanan menggunakan HPLC, analisis kualitatif melibatkan prosedur bagi mengenalpastikan analit yang terkandung di dalam sesuatu sampel. Prosedur pengenalpastian L-DOPA dalam analisis HPLC adalah dengan menggunakan kaedah perbandingan masa penahanan. Identiti L-DOPA di dalam sampel yang diuji boleh dikenal pasti dengan membandingkan masa penahanan dengan masa penahanan sampel piawai L-DOPA. Sebanyak 3 sampel piawai asid amino, L-DOPA, L-tyrosin, dan L-alanin disediakan pada kepekatan 1% untuk mengetahui masa penahanannya. Masa penahanan merupakan masa dari suntikan sampel sehingga puncak analit tiba di pengesan. Daripada profil, masa penahanan sampel piawai L-DOPA ialah 2.367 minit, masa penahanan untuk sampel piawai L-alanin adalah 1.700 minit manakala masa penahanan untuk L-tyrosin ialah 3.000 minit.

Daripada profil kromatografi sampel-sampel yang diuji, hampir semua daripada 11 sampel tersebut menunjukkan 2 jenis puncak utama yang ketara kecuali

untuk sampel 6, 7, dan 11 yang hanya mempunyai 1 puncak sahaja. Jadual menunjukkan jadual masa penahanan untuk kedua-dua puncak utama yang hadir dalam setiap sampel dan dipercayai adalah puncak alanin kerana mempunyai masa penahanan yang hampir sama dengan masa penahanan piawai. Masa penahanan, untuk puncak pertama sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, dan 9 ialah 1.917 minit. Perbezaan masa penahanan berbanding sampel piawai ialah 0.217 minit. Untuk sampel 10 dan 11 pula, masa penahanan puncak pertama adalah 0.233 minit. Puncak kedua yang hadir dalam sampel yang diuji dikenalpasti sebagai puncak L-DOPA kerana masa penahanan sama atau hampir sama dengan sampel piawai iaitu 2.367 minit. Untuk sampel 1, 2, 8, dan 10, masa penahanan puncak yang kedua menyamai masa penahanan piawai L-DOPA. Untuk sampel 3, 4, dan 9, masa penahanan ialah 2.350 dan perbezaannya dengan piawai hanya 0.017 minit. Puncak kedua sampel 5 mempunyai masa penahanan 2.333 minit dan perbezaan dengan piawai ialah 0.034 minit. Profil kromatografi untuk sampel 6, 7, dan 11 tidak menunjukkan sebarang kehadiran puncak L-DOPA yang ketara.

Untuk mengetahui kepekatan kandungan L-DOPA dalam sampel yang diuji, analisis kuantitatif dilakukan. Satu lengkung piawai L-DOPA disediakan untuk mengetahui peratusan kepekatan L-DOPA di dalam sampel. Daripada profil kromatografi yang diperolehi, luas puncak setiap sampel piawai dapat diketahui secara automatik.

Merujuk kepada lengkung piawai, satu persamaan telah diperolehi iaitu $y = 1 \times 10^8 x$ yang mana y mewakili luas puncak dan x mewakili kepekatan L-DOPA. Berdasarkan persamaan ini, kepekatan L-DOPA untuk sampel yang diuji dapat diketahui.

Jadual 4.7 : Kepekatan kandungan L-DOPA di dalam sampel yang diuji

Sampel	Luas Puncak	Kepekatan L-DOPA (%)	Kepekatan L-DOPA (g/L)
1	2944085	0.029	0.00029
2	1761832	0.018	0.0018
3	820258	0.008	0.0008
4	761372	0.008	0.0008
5	459500	0.005	0.0005
6	0	0	0
7	0	0	0
8	704928	0.007	0.0007
9	520150	0.005	0.0005
10	704776	0.007	0.0007
11	0	0	00

BAB 5

KESIMPULAN DAN CADANGAN

5.1 Kesimpulan

Protein perekat (L-DOPA) daripada kaki kupang dapat dikesan melalui pengekstrakan dan pengesanan kewujudan L-DOPA dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapisan nipis (TLC) dan kromatografi cecair prestasi tinggi (HPLC). Kandungan utama sampel busus kaki kupang yang digunakan dalam ujikaji ini terdiri daripada L-DOPA dan alanin.

5.2 Cadangan

Dalam ujikaji ini, larian elektroforesis bagi sampel selepas penulenan melalui gel tersekat gerak G-200 tidak menunjukkan jalur yang menggambarkan kehadiran protein. Ini mungkin disebabkan kepekatan protein dalam sampel terlalu rendah dan tidak dapat dikesan. Kaedah ini boleh dibaiki dengan menggunakan pewarnaan perak yang dapat mengesan kehadiran protein serendah 2 ng.

Untuk meningkatkan kualiti pemisahan kromatografi, komposisi fasa gerak boleh digantikan dengan larutan yang berlainan untuk mendapatkan hasil yang lebih baik kerana pelarut yang sesuai dapat menahan zat terlarut dengan lebih berkesan. Kepekatan pelarut yang disediakan perlu tepat dan pelarut yang disediakan harus dituras dengan menggunakan penuras membran yang bersesuaian. Kadar alir sepanjang operasi juga perlu dikekalkan.

RUJUKAN

Allen R.C., Savaris C.A and Maurer H.R, *Gel electrophoresis And Isoelectric Focusing of Proteins*; Selected Techniques, de Gruyter, Berlin, 1984.

Alvert L.Lehninger, *Principle of Biochemistry*, Worth Publisher Inc. New York, 1982.

Asia Marine Biology 2, Hong Kong University Press, Hong Kong, 1985.

A.T Andrew, *Electrophoresis-Theory, Techniques, And Biochemical And Clinical Applications*, 2nd Edition, Clarendon Press, Oxford, 1986.

Barry Robson and Jean Garnier, *Introduction To Protein And Protein Engineering*, Elsevier Publishing Company, New York, 1986.

Biochemical and Biophysical Research Communication. Vol. 96 (4), *The Bioadhesive Of Mytilus Byssus: A Protein Containing L-DOPA*, 1980.

Biology Bull 183, *Characterization Of A Cystine-Rich Polyphenolic Protein Family From The Blue Mussel Mytilus edulis L.*, 1992.

Conn E.E and Stumpf P.K, *Outline Of Biochemistry*, 4th Edition, Elsevier Publishing Company, New York, 1976.

Donavan J.W, *Physical Principals And Techniques Of Protein In Chemistry*, Academic Press, New York, 1969.

- Ian M. Rosenberg, *Protein Analysis And Purification Benchtop Techniques*, Birkhauser, Boston, 1996.
- James W. Jorgenson, Marshall Phillips, *New Directions In Electrophoretic Methods*, American Chemical Society, Washington, 1987.
- Jensen R.A., *The Bioadhesive Of Phragmatopoma California Tubes: a Silk Like Cement Containing L-DOPA*, J. Comp Physiol, 1992.
- Jones J.H., *Amino Acids And Peptides*, Vol.21, Royal Society Of Chemistry, Oxford, 1990.
- Kevin McGrath and David Kaplan, *Protein Based Material*, Birkhauser, Boston, 1997.
- Kirschenbaum D.M., *Handbook Of Biochemistry And Molecular Biology*, 3rd Edition, vol.2, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1976.
- McDonald T.L., Hao W. and Joshi S.S, *Isolation Of A Membrane Bound Immunoregulatory Molecule From Merastatic Lymphoma Cells*, US/EG Bulletin 1514, 1992.
- McNanara P.J., Songer J.G. and Egen N.B, *Isolation Of A Toxic Phospholipase D From Corynebacterium Pseudotuberculosis*, US/EG Bulletin 1508, 1992.
- Mohd. Noor Nordin and Choo Poh Sze, *Ternakan Siput Sudu/Kupang Di Malaysia*, Jabatan Perikanan Kementerian Pertanian Malaysia, 1985.
- Righetti P.G., *Electrokinetic Separation Methods*, P.G. Righetti, C.J. Van Oss, and J.W. Vanderhoff, eds. P.389. Elsevier, Amsterdam, 1979.

Rockey K.Scopes, *Protein Purification – Principles And Practice*, 3rd Edition,
Springer – Verlag Inc, New York, 1989.

Rockey D.D., Gilkey L.L and Kaattari S.L., *Separation of Secreted
Immunosuppressive Proteins Of The Fish Pathogen, Renibacterium
Salmoninarum, From Culture Medium And Infected Fish Tissues*, US/EG
Bulletin 1516, 1992.

The Journal of Experiment Biology 198, *Exotic Collagen Gradients In The Byssus
Of The Mussel Mytilus Edulis*, 1995.

William A.R., *Handbook Of Experimental Immunology*, 3rd Edition, p.9.1.
Blackwell, Oxford, 1978.

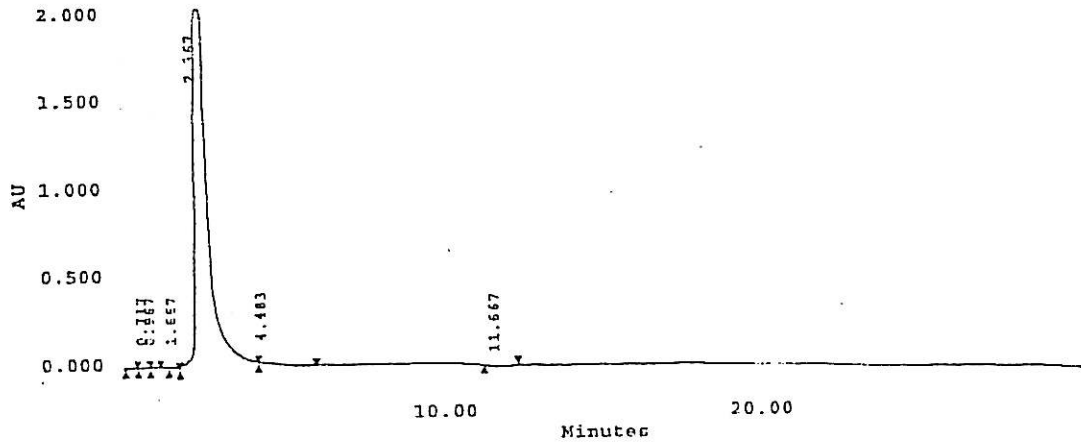
LAMPIRAN

Lampiran 1

Profil kromatografi sampel piawai L-DOPA 1%

Millennium Sample Information

Project Name: Defaults
Sample Name: std Dopa
Vial: 1
Injection: 1
Channel: 486
Date Acquired: 08/28/01 12:21:07 PM
Sample Weight: 1.00000
Acq Meth Set: Kupang
Processing Method: Default
Sample Type: Standard
Volume: 10.00
Run Time: 30.0 min
Date Processed: 08/28/01 12:55:36 PM
Dilution: 1.00000



Peak Results

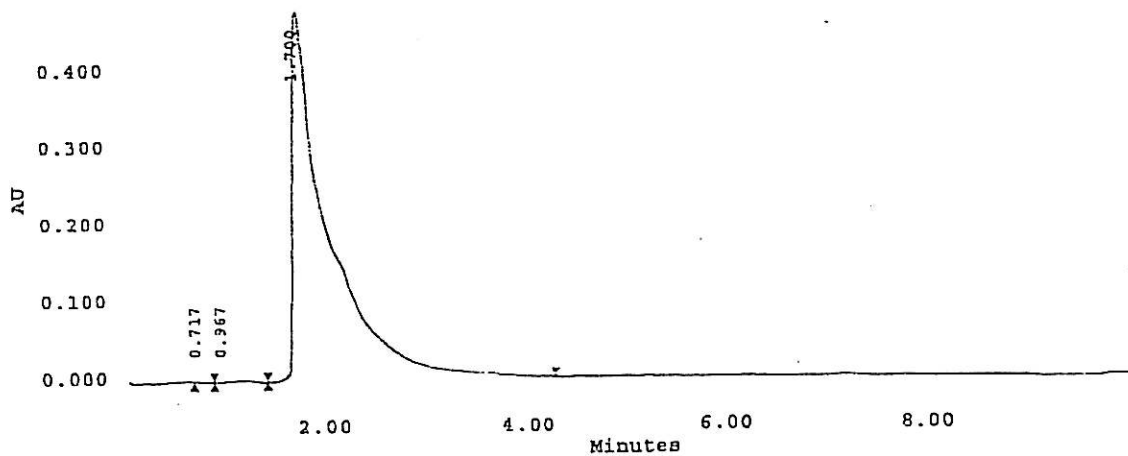
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		0.167	3149	384		BB
2		0.717	19252	2007		BV
3		0.957	6401	606		VB
4		1.667	84832	7927		BB
5		2.367	61985292	2015643		BV
6		4.403	1066536	26757		VB
7		11.667	66625	2059		BB

Lampiran 2

Profil Kromatografi Sampel Piawai Alanin 1%

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std Alanin	Volume:	10.00
Vial:	1	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	08/28/01 03:02:37 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	08/28/01 12:55:35 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Default		



Peak Results

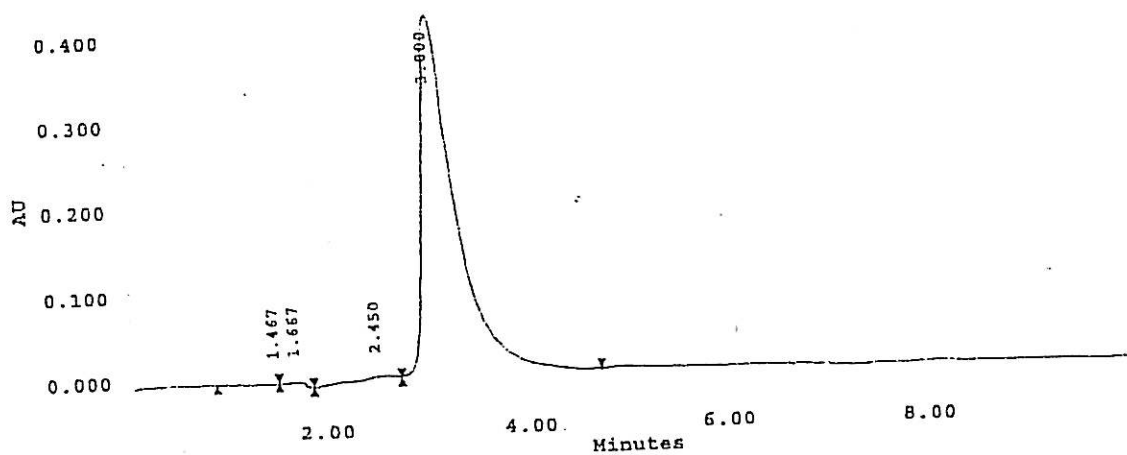
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		0.717	1344	303		BB
2		0.967	7448	363		BB
3		1.700	11199645	479797		BB

Lampiran 3

Profil Kromatografi Sampel Piawai Tyrosin 1%

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std tyrosin	Volume:	10.00
Vial:	2	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	08/28/01 03:04:33 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	08/28/01 01:06:47 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Default		



Peak Results

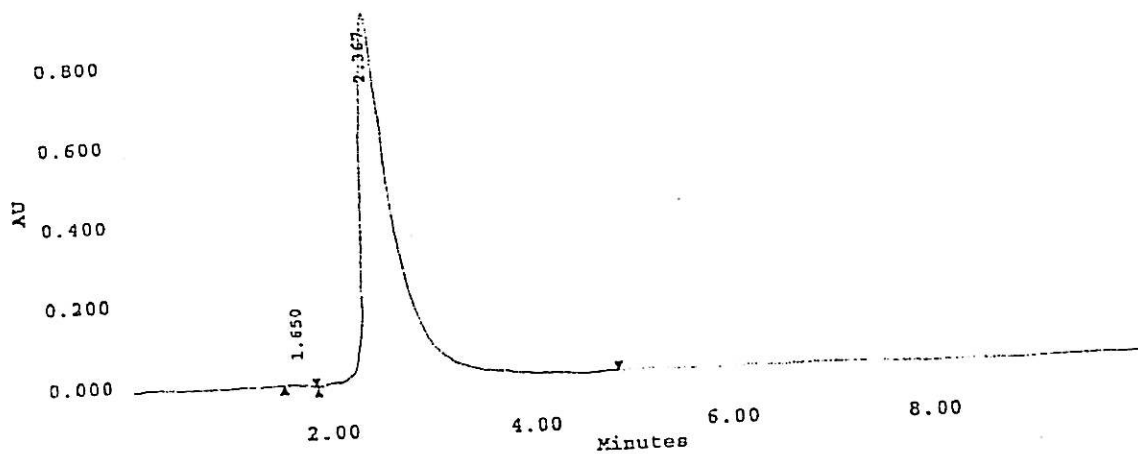
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.467	79578	3949		BV
2		1.667	86095	6459		VB
3		2.450	244792	7583		BV
4		3.000	10315304	429844		VB

Lampiran 4

Profil Kromatografi Sampel Piawai L-DOPA 0.2%

M i l l e n n i u m s a m p l e i n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std dopa 0.2%	Volume:	10.00
Vial:	1	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 10:40:51 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 10:30:33 AM		
Sample Weight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

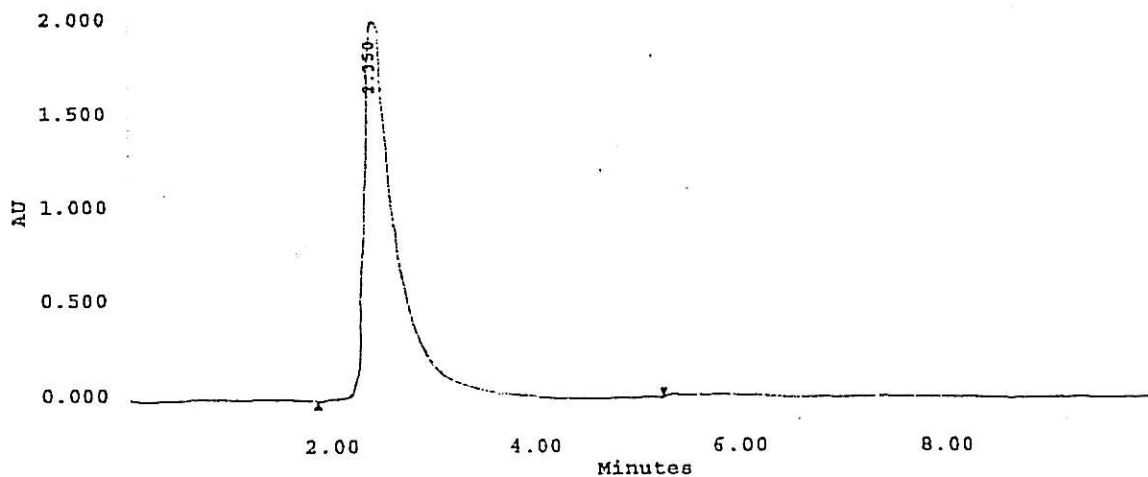
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	44270	4549		BB
2		2.367	21005817	931752		BB

Lampiran 5

Profil Kromatografi Sampel Piawai L-DOPA 0.4%

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std dopa 0.4%	Volume:	10.00
Vial:	2	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 10:52:09 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 10:41:47 AM		
Sampleweight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

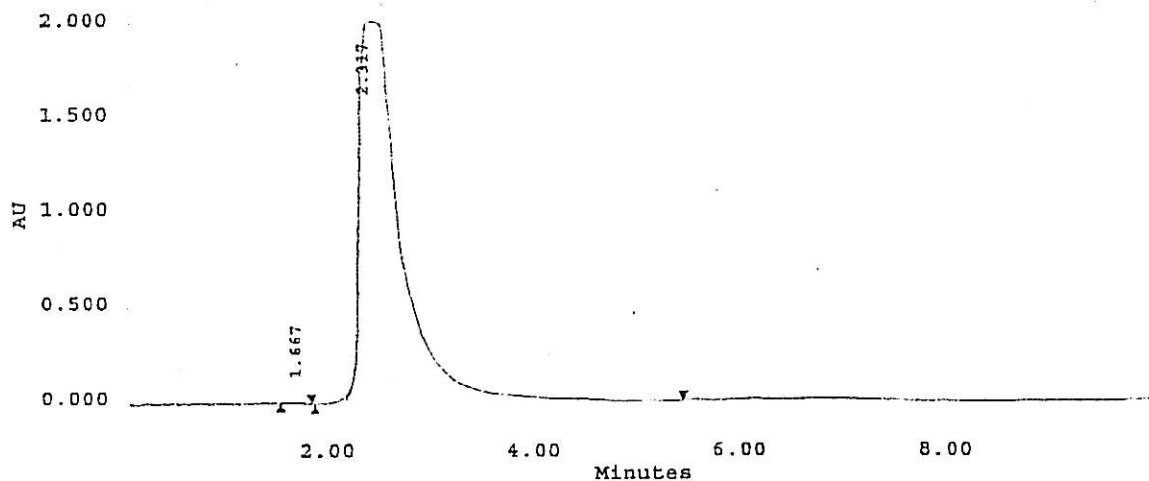
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		2.350	44561220	2010770		BB

Lampiran 6

Profil Kromatografi Sampel Piawai L-DOPA 0.6%

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std dopa 0.6%	Volume:	10.00
Vial:	3	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 11:03:16 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 10:53:00 AM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

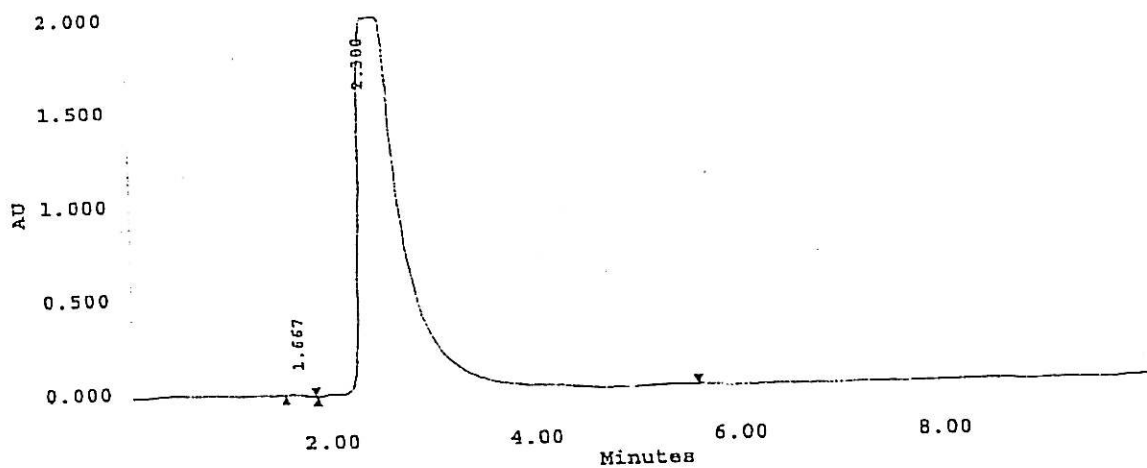
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.667	57770	5914		BB
2		2.317	55716174	2010426		BB

Lampiran 7

Profil Kromatografi Sampel Piawai L-DOPA 0.8%

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Standard
Sample Name:	std dopa 0.8%	Volume:	10.00
Vial:	4	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 11:14:35 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 11:04:13 AM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

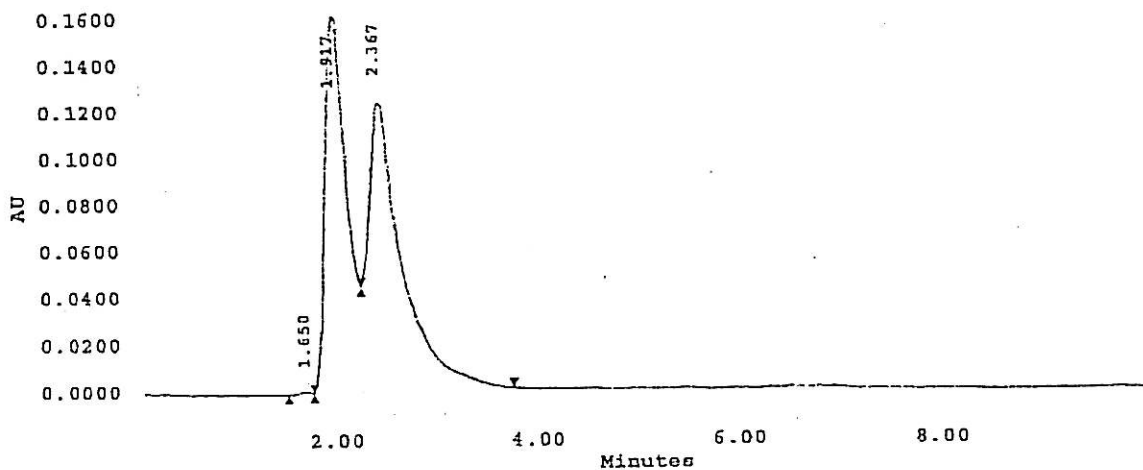
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.667	52924	5732		BB
2		2.300	59120374	2010582		BB

Lampiran 8

Profil Kromatografi Sampel I

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 1	Volume:	10.00
Vial:	6	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 11:36:54 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 11:26:37 AM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

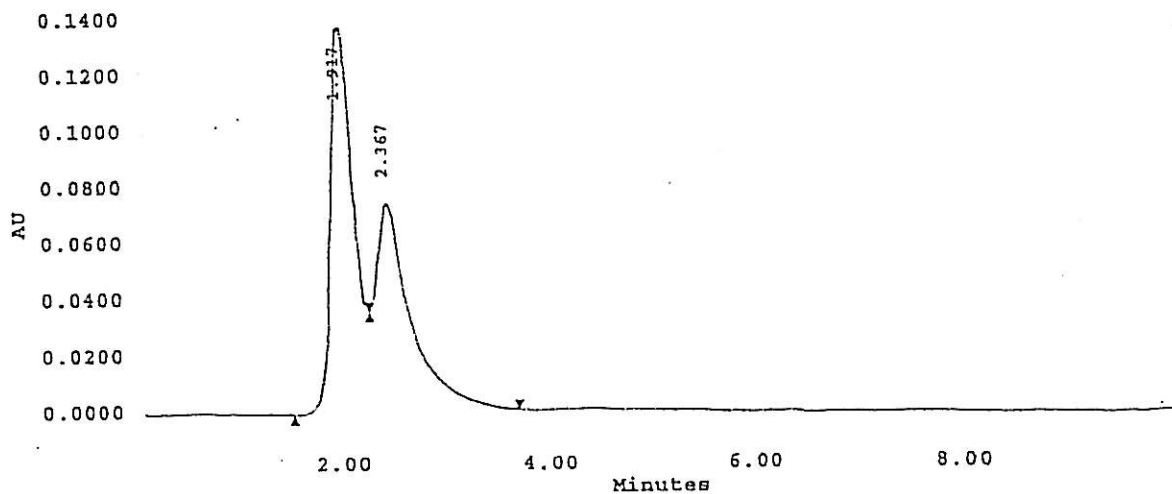
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	6498	865		BV
2		1.917	2420230	161859		VV
3		2.367	2944085	125167		VB

Lampiran 9

Profil Kromatografi Sampel 2

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 2	Volume:	10.00
Vial:	7	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 11:48:08 AM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 11:37:49 AM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

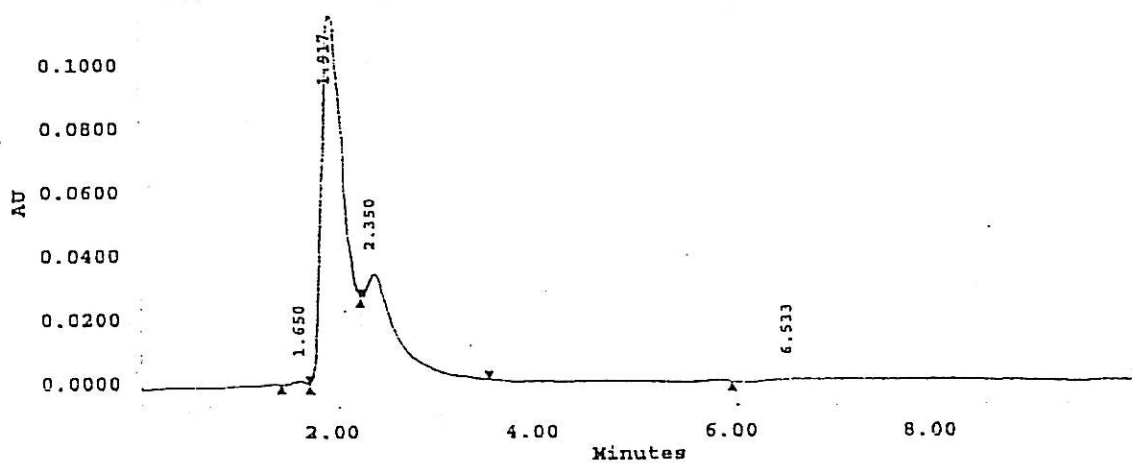
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.917	2113723	138265		EV
2		2.367	1761832	74834		VB

Lampiran 10

Profil Kromatografi Sampel 3

Millennium Sample Information

Project Name: Defaults
 Sample Name: sample 3
 Vial: 8
 Injection: 1
 Channel: 486
 Date Acquired: 09/07/01 11:49:02 AM
 SampleWeight: 1.00000
 Acq Meth Set: Kupang
 Processing Method: Kupang
 Sample Type: Unknown
 Volume: 10.00
 Run Time: 10.0 min
 Date Processed: 09/07/01 11:59:22 AM
 Dilution: 1.00000



Peak Results

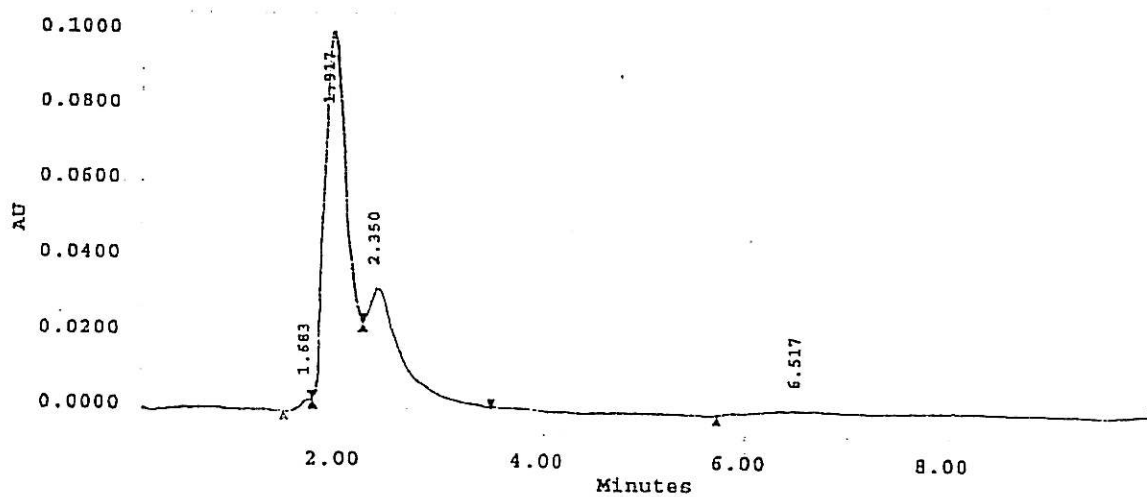
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	10728	1365		BB
2		1.917	1775651	116454		BV
3		2.350	820258	34245		VB
4		6.533	99482	746		BB

Lampiran 11

Profil Kromatografi Sampel 4

Millennium Sample Information

Project Name: Defaults
 Sample Name: sample 4
 Vial: 9
 Injection: 1
 Channel: 486
 Date Acquired: 09/07/01 12:00:14 PM
 Sample Weight: 1.00300
 Acq Meth Set: Kupang
 Processing Method: Kupang
 Sample Type: Unknown
 Volume: 10.00
 Run Time: 10.0 min
 Date Processed: 09/07/01 12:10:35 PM
 Dilution: 1.00000



Peak Results

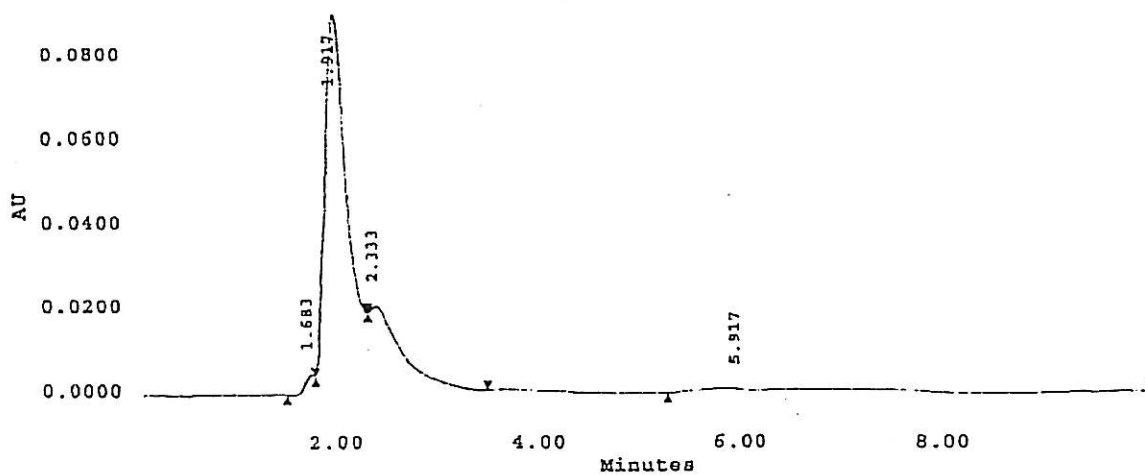
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.683	19072	2897		BV
2		1.917	1538902	100354		VV
3		2.350	761372	31987		VB
4		6.517	105928	797		BB

Lampiran 12

Profil Kromatografi Sampel 5

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 5	Volume:	10.00
Vial:	10	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 12:21:48 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 12:11:27 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

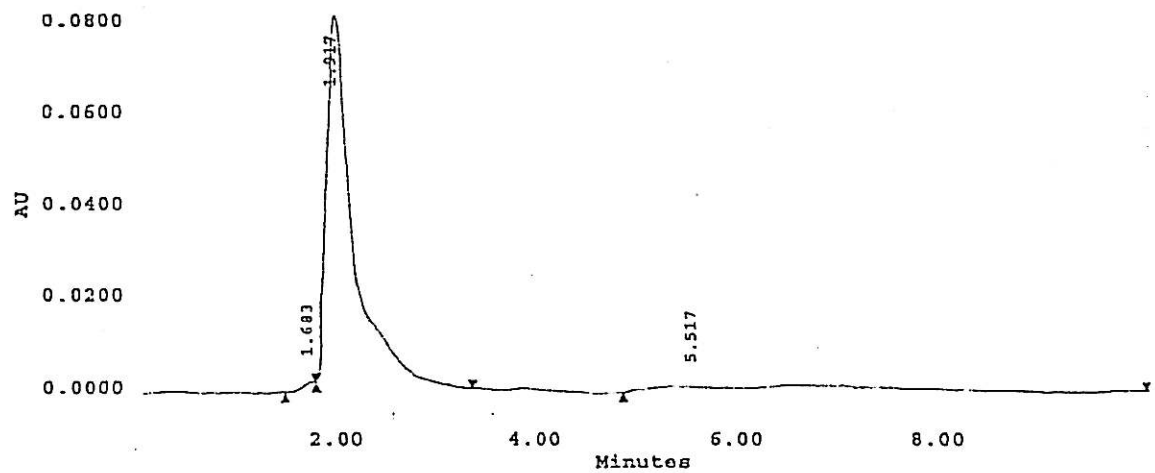
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.683	29538	4695		BV
2		1.917	1423628	90173		VV
3		2.333	459500	20503		VB
4		5.917	147512	965		BB

Lampiran 13

Profil Kromatografi Sampel 6

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 6	Volume:	10.00
Vial:	11	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 12:33:01 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 12:22:39 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

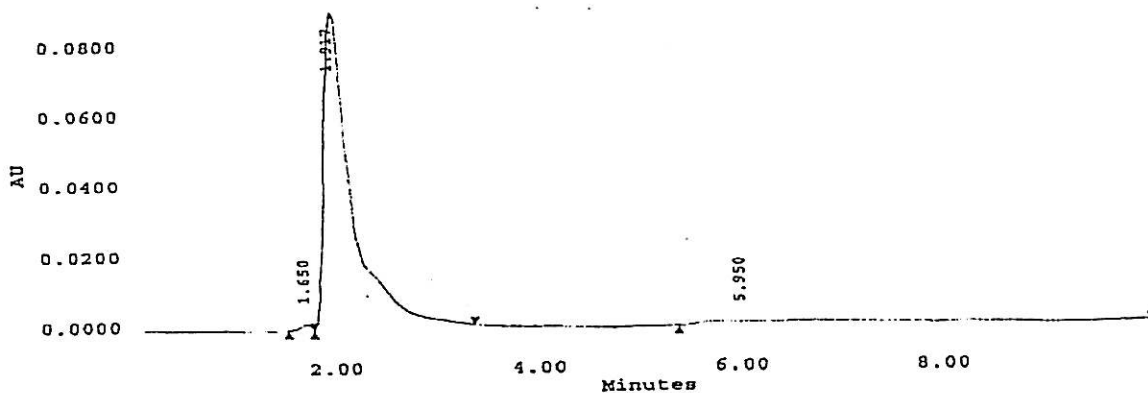
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.683	17178	2477		BV
2		1.917	1564083	81917		VB
3		5.517	168866	1031		BB

Lampiran 14

Profil Kromatografi Sampel 7

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 7	Volume:	10.00
Vial:	12	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 12:44:14 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 12:33:51 PM		
Sample Weight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

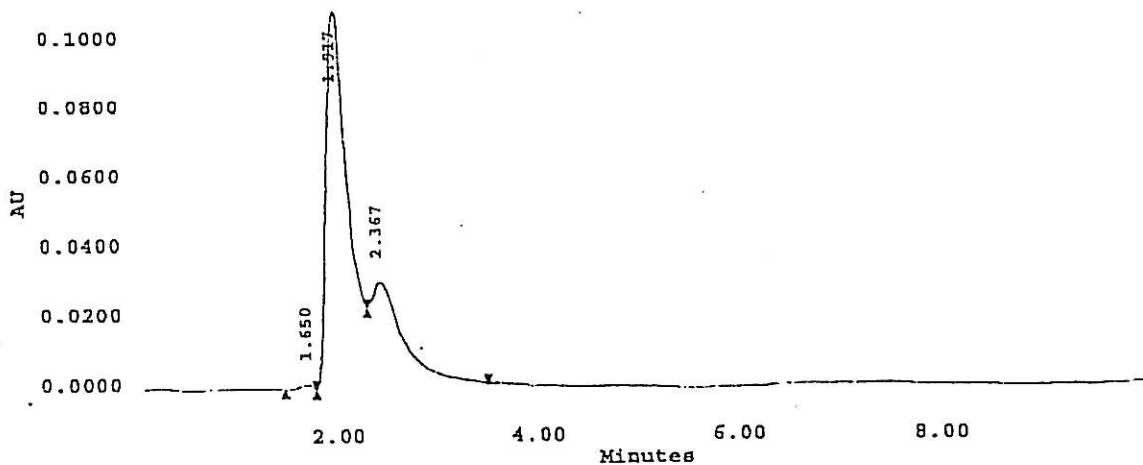
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	13336	1750		BB
2		1.917	1707904	90528		BB
3		5.950	134354	877		BB

Lampiran 15

Profil Kromatografi Sampel 8

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 8	Volume:	10.00
Vial:	13	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 12:55:20 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 12:45:03 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

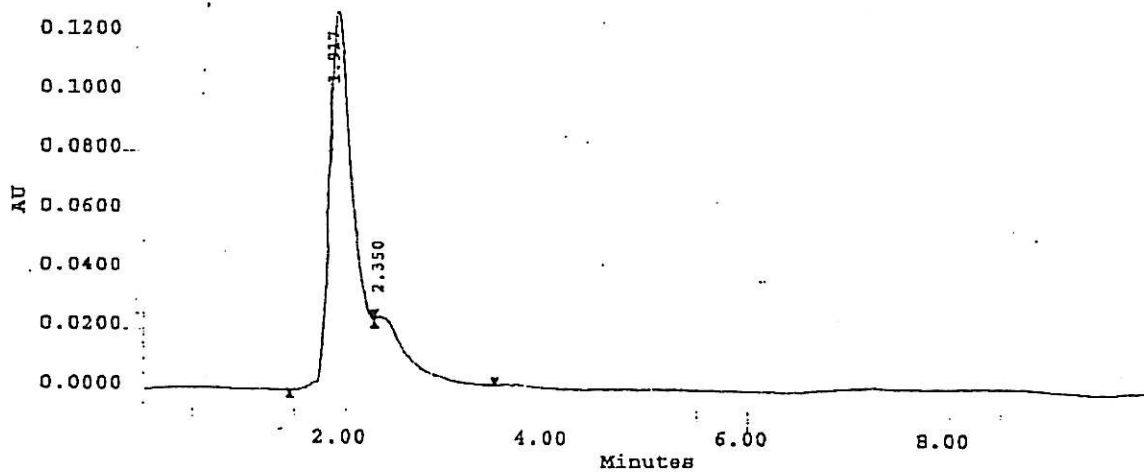
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	12139	1476		BB
2		1.917	1679953	109097		BV
3		2.367	704928	30294		VB

Lampiran 16

Profil Kromatografi Sampel 9

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 9	Volume:	10.00
Vial:	14	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 01:06:32 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 12:56:15 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

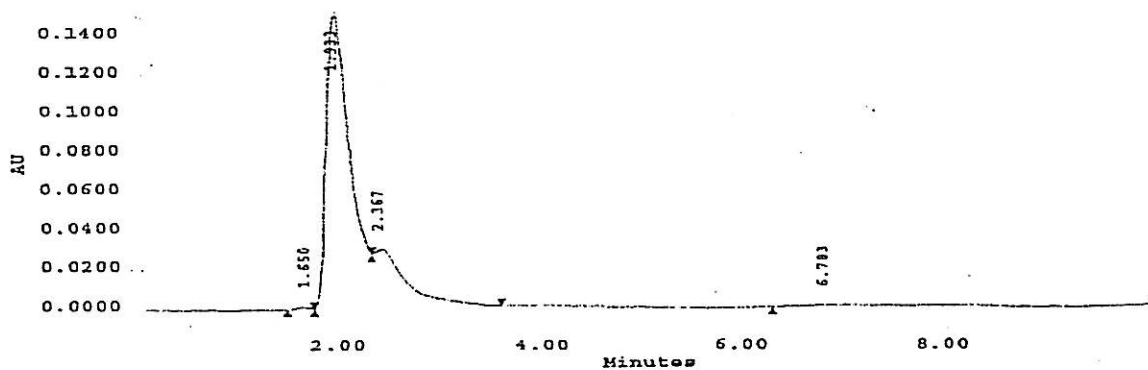
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.917	2068542	127446		BV
2		2.350	520150	23893		VB

Lampiran 17

Profil Kromatografi Sampel 10

M i l l e n n i u m S a m p l e I n f o r m a t i o n

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 10	Volume:	10.00
Vial:	15	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 01:17:45 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 01:07:27 PM		
Sample Weight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



Peak Results

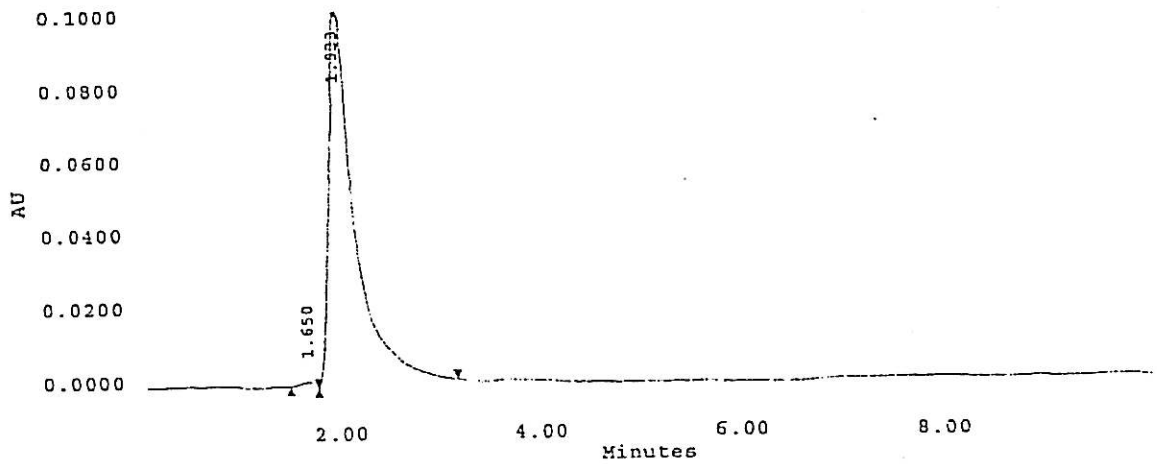
#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	9172	1204		BB
2		1.913	2391398	150562		BV
3		2.367	704776	30065		VB
4		6.783	88076	738		BB

Lampiran 18

Profil Kromatografi Sampel 11

Millennium Sample Information

Project Name:	Defaults	Sample Type:	Unknown
Sample Name:	sample 11	Volume:	10.00
Vial:	16	Run Time:	10.0 min
Injection:	1	Date Processed:	09/07/01 01:28:59 PM
Channel:	486	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	09/07/01 01:18:39 PM		
SampleWeight:	1.00000		
Acq Meth Set:	Kupang		
Processing Method:	Kupang		



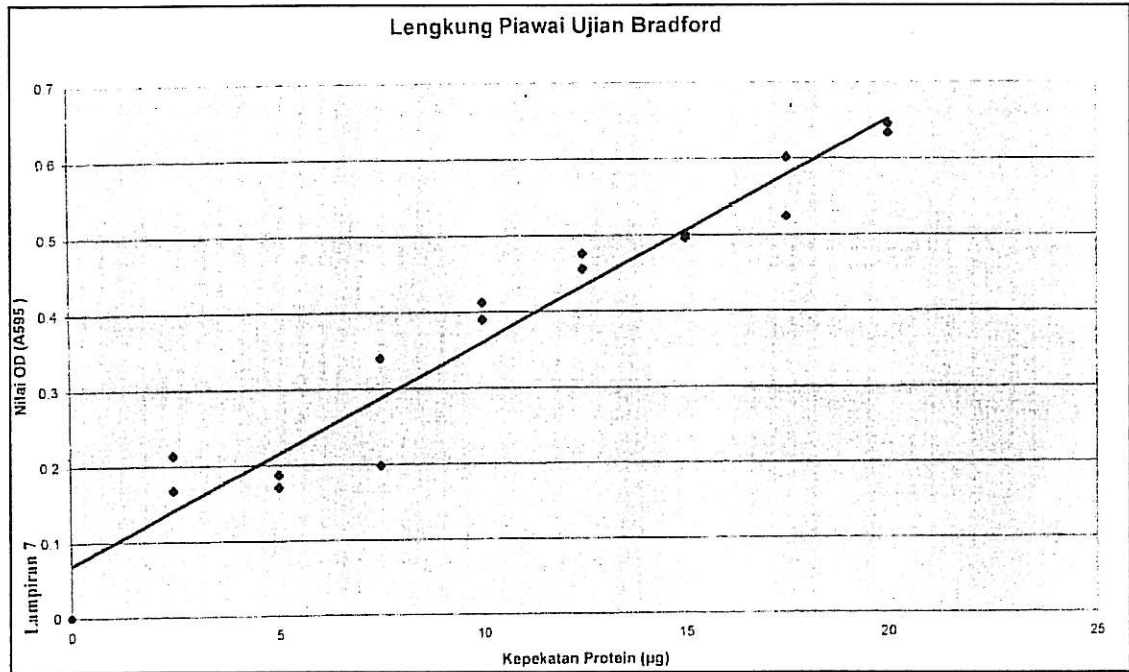
Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	Height (uV)	Amount	Int Type
1		1.650	11752	1406		BB
2		1.933	1858115	102799		BB

Lampiran 19

Jadual L-1 : Isipadu larutan tertentu bagi ujian Bradford

Sampel	Protein (μg)	Larutan piawai (μl BSA)	Larutan Penimbang (μl)	Reagen Bradford (ml)
1	0	0	100	1
2	2.5	2.5	97.5	1
3	2.5	2.5	97.5	1
4	5	5	95	1
5	5	5	95	1
6	7.5	7.5	92.5	1
7	7.5	7.5	92.5	1
8	10	10	90	1
9	10	10	90	1
10	12.5	12.5	87.5	1
11	12.5	12.5	87.5	1
12	15	15	85	1
13	15	15	85	1
14	17.5	17.5	82.5	1
15	17.5	17.5	82.5	1
16	20	20	80	1
17	20	20	80	1



Rajah L 1 : Graf piawai ujian Bradford

Jadual L-2 : Nilai OD sampel bagi teknik gel tersekat gerak menggunakan dua jarak gelombang berbeza

Sampel	OD pada 230 nm	OD pada 260 nm
1	0.316	0.226
2	0.318	0.232
3	0.321	0.219
4	0.321	0.226
5	0.323	0.234
6	0.321	0.270
7	0.329	0.291
8	0.335	0.265
9	0.341	0.292
10	0.333	0.278
11	0.326	0.232
12	0.334	0.227
13	0.324	0.224
14	0.322	0.274
15	0.331	0.226
16	0.338	0.159
17	0.310	0.166
18	0.311	0.193

Lampiran 20

Kromatografi Lapisan Nipis (TLC)

a) Penyediaan fasa bergerak

80ml isopropanol

20ml air suling

20ml asid asetik

ketiga-tiga bahan bercampur dan dikacau supaya percampuran antara bahan menjadi seragam sebelum dimasukkan ke dalam tangki TLC.

b) Penyediaan reagen ninhidrin

0.1% ninhidrin dalam aseton

0.1g ninhidrin dilarutkan di dalam 100ml aseton

Lampiran 21

Elektroforesis Larutan Stok

- a) Larutan monomer akrilamida-bis-akrilamida
Sebanyak 58.4g akrilamida dan 1.6g bis-akrilamida dilarutkan di dalam air suling membentuk 200ml larutan dan disimpan pada suhu 400⁰C.
- b) 1.5 M Tris-HCL, Ph 8.8 (penimbal larian gel)
Sebanyak 36.3g Tris ditetapkan pada pH 8.8 dengan larutan HCl, lalu ditambahkan air suling sehingga larutan menjadi sebanyak 200ml dan disimpan pada 4⁰C.
- c) SDS 10%
10 g SDS dilarutkan dalam 100ml air suling dan disimpan pada suhu bilik.
- d) Ammonium Persulfat 10%
0.5 g Ammonium persulfat dilarutkan dengan air suling hingga larutan mencecah 5.0 ml dan disimpan pada keadaan gelap. Larutan ini tidak boleh disimpan untuk jangkamasa yang lama, jika tidak berkemungkinan akan mengganggu pembentukan gel.
- e) TEMED
Diperolehi secara kormesil, tetapi jika TEMED yang digunakan adalah telah terlalu lama atau telah tamat tempoh penggunaannya, ia juga akan turut menjejaskan proses pembentukan gel.
- f) Penimbal Tangki
Sebanyak 12 g Tris, 57.6 g gylsin dan 40ml larutan c dilarutkan di dalam 4.0 liter air suling.

g) Pewarna Pengesan

2ml gliserol, 0.1% Bromophenol Blue (0.1ml) dan dicampurkan dengan 3.2 ml air suling.

Lampiran 22

Jadual L-3 : Keluasan puncak sampel piawai L-DOPA pada kepekatan berlainan

Kepekatan Sampel Piawai (%)	Luas Puncak HPLC
0.2	21005817
0.4	44561220
0.6	55716174
0.8	59120374
1.0	59505568