



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM FOSFOLIPASE DARI DURI BINTANG
LAUT *Acanthaster planci* MENGGUNAKAN PENGENDAPAN
ETANOL**

SKRIPSI

**DIPANKARA AGUNG PRATAMA JAYAPUTRA
0606076280**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM SARJANA
DEPOK
JANUARI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI ENZIM FOSFOLIPASE DARI DURI BINTANG
LAUT *Acanthaster planci* MENGGUNAKAN PENGENDAPAN
ETANOL**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Teknik Kimia**

**DIPANKARA AGUNG PRATAMA JAYAPUTRA
0606076280**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA
PROGRAM SARJANA
DEPOK
JANUARI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Dipankara Agung Pratama J

NPM : 0606076280

Tanda Tangan :

Tanggal : 6 Januari 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Dipankara Agung Pratama Jayaputra
NPM : 0606076280
Program Studi : Teknik Kimia
Judul Skripsi : Isolasi Enzim Fosfolipase Dari Duri Bintang Laut
Acanthaster planci Menggunakan Pengendapan Etanol

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik Kimia pada Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Ir. Anondho, M.Eng ()
Penguji : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech ()
Penguji : Ir. Tilani, M.Si ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 6 Januari 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan YME yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini ditulis untuk memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik Program Studi Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu dan tenaganya untuk membimbing saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Muhamad Sahlan selaku dosen ahli protein di departemen teknik kimia universitas indonesia yang telah banyak membantu saya dalam penelitian ini;
3. Ayah dan Ibu saya yang senantiasa mendoakan dan mendukung saya baik secara moril maupun materil; Terima kasih atas segala kesabaran dan kasih sayangnya.
4. Imelda dan Ardha selaku teman seperjuangan topik isolasi protein atas segala kerjasama, berbagi informasi dan kebersamaannya
5. Teman-teman seperjuangan di Lab Bioproses atas kebersamaan dan dukungan selama di laboratorium;
6. Teman-teman saya sesama mahasiswa Departemen Teknik Kimia FTUI khususnya angkatan 2006 atas kebersamaan dan persahabatannya selama ini.
7. Pihak-pihak lain yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Saya menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan dikarenakan masih terbatasnya ilmu yang saya miliki. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan makalah ini maupun diri saya sendiri di waktu yang akan datang. Akhir kata, saya berharap skripsi ini mampu memberikan peranan dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan bermanfaat bagi siapapun yang membacanya.

Depok, 06 Januari 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dipankara Agung Pratama Jayaputra

NPM : 0606076280

Program Studi : Teknik Kimia

Departemen : Teknik Kimia

Fakultas : Teknik

Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**Isolasi Enzim Fosfolipase Dari Duri Bintang Laut *Acanthaster planci*
Menggunakan Pengendapan Etanol**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 06 Januari 2011

Yang menyatakan

(Dipankara Agung Pratama Jayaputra)

ABSTRAK

Nama : Dipankara Agung Pratama Jayaputra
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : Isolasi Enzim Fosfolipase Dari Duri Bintang Laut
Acanthaster planci Menggunakan Pengendapan
Etanol

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein enzim fosfolipase dari duri bintang laut *A.planci* menggunakan metode pengendapan etanol. Hasil dari penelitian ini diuji tingkat aktivitas protein enzimnya menggunakan spektrofotometer UV dengan metode Marineti, tingkat kemurnian protein enzim dengan SDS-Page serta kandungan protein yang didapatkan dengan metode lowry. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa enzim fosfolipase dari *A.planci* dapat terisolasi dengan baik dan tidak terdenaturasi pada pelarut etanol.

Kata Kunci : *Acanthaster Planci*, pengendapan etanol, *fosfolipase*



ABSTRACT

Name : Dipankara Agung Pratama Jayaputra
Program Study : Chemical Engineering
Title : Isolation of enzyme phospholipase From Sea Star
Acanthaster planci Using Ethanol Precipitation

The objective of this study is to isolate phospholipase protein enzyme from thorns starfish *A.planci* using ethanol Precipitation method. The results of this study tested levels of enzyme protein activity using UVspectrophotometer method Marinetti, the level of enzyme protein purity by SDS-Page and protein content obtained with the method of Lowry. The results of this study showed that the enzyme phospholipase from *A.planci* not denatured in organic solvents such as ethanol.

Keywords : *Achantaster Planci*, Precipitation method, phospholipase

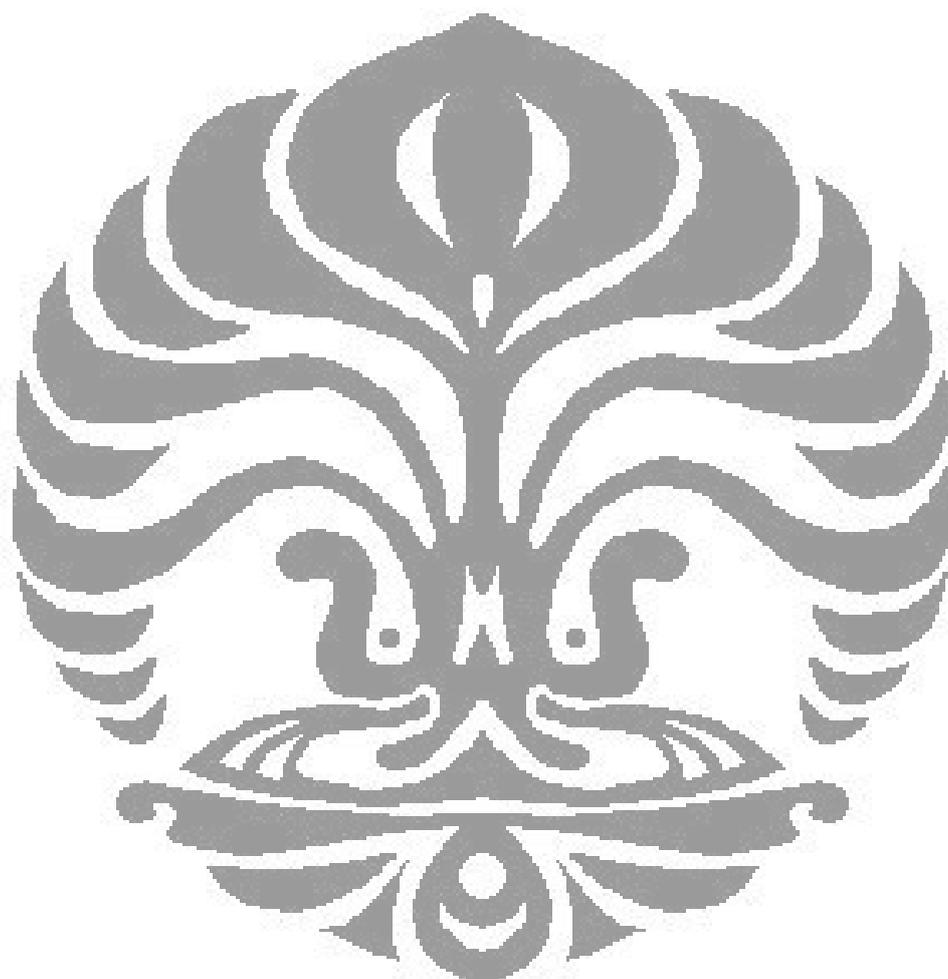


DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.4. Batasan Masalah.....	3
1.5. Sistematika Penulisan.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. <i>Acanthaster Planci</i>	5
2.1.1. Pertumbuhan dan Reproduksi.....	6
2.1.2. Siklus Hidup.....	7
2.1.3. Ekologi.....	7
2.1.4. Peledakan populasi (<i>outbreak</i>).....	8
2.1.5. Dampak Pemangsaan	9
2.2. Racun <i>Acanthaster planci</i>	10
2.3. Teknik – Teknik Isolasi Protein	11
2.3.1. Teknik Pemanasan Protein.....	12
2.3.2. Ion Exchange Chromatography	12
2.3.3. <i>Gel Filtration</i>	13
2.3.4. Dialisis	13
2.3.5. Fraksinasi Ammonium Sulfat	14
2.3.6. Ekstraksi.....	14
2.3.6.1 Ekstraksi Maserasi.....	15

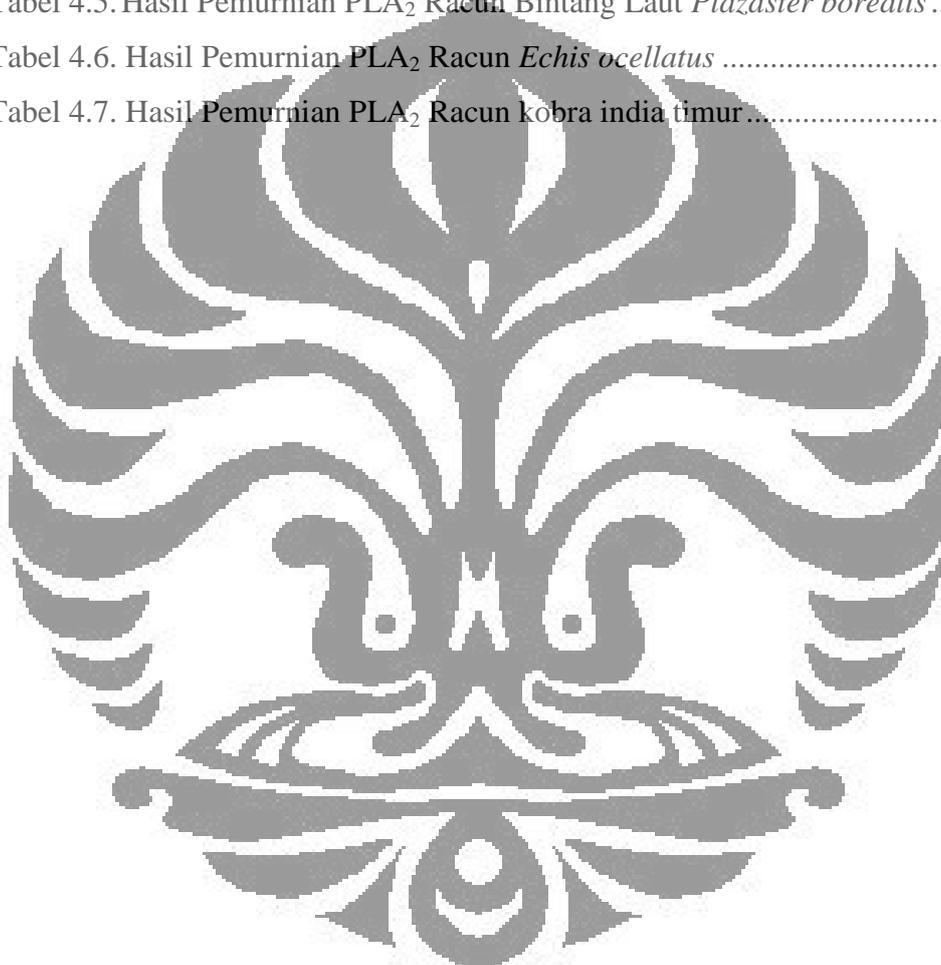
2.3.6.1 Ekstraksi Soxhletasi.....	15
2.3.6.1 Ekstraksi Perkolasi	16
2.3.6.1 Metode Ekstraksi Bertekanan Tinggi	16
2.3.6.1 Metode Ekstraksi Gelombang Mikro	17
2.3.7. Metode Pemisahan dengan Membran.....	17
2.4. <i>State Of The Art</i>	19
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	24
3.1. Rancangan Penelitian.....	24
3.2. Alat dan Bahan	26
3.3. Prosedur Preparasi Sampel.....	29
3.4. Metode Sonikasi.....	29
3.5. Prosedur Uji Aktifitas Fospolipase.....	29
3.6. Prosedur Uji SDS-PAGE.....	30
3.7. Prosedur Uji Lowry	31
3.8. Metode Spektofotometer	32
3.9. Uji Aktivitas Kaseinolitik.....	32
BAB 4. HASIL DAN ANALISIS	34
4.1. Analisis Prosedur Penelitian	34
4.1.1. Tahap Ekstraksi Papain sebagai Kontrol Positif	35
4.1.2. Tahap Uji Kaseinolitik Papain	35
4.1.3. Tahap Preparasi Sampel.....	36
4.1.4. Tahap Sonikasi.....	37
4.1.5. Tahap Filtrasi	37
4.1.6. Uji Aktivitas <i>Anti-Coagulant</i>	38
4.1.7. Tahap Ekstraksi.....	39
4.1.8. Tahap Sentrifugasi.....	39
4.2. Analisis Hasil	40
4.2.1. Tahap Uji Aktifitas Fospolipase	40
4.2.2. Tahap Uji Metode Lowry.....	41
4.2.3. Pengukuran aktivitas enzim per satuan berat protein.....	42
4.2.4. Tahap Uji SDS-PAGE	44

BAB 5. KESIMPULAN	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN.....	49



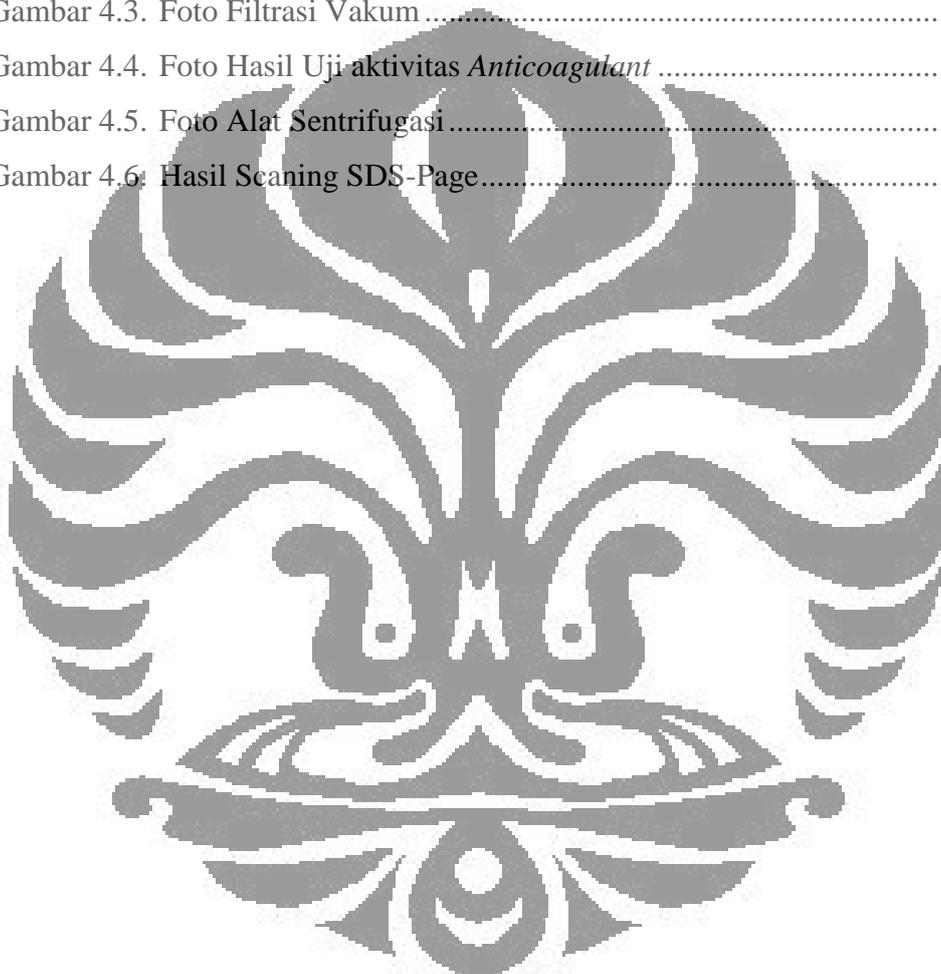
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Properti Fisik Etanol.....	18
Tabel 2.2. Rangkuman state of the art penelitian	19
Tabel 4.1. Penurunan absorbansi uji aktivitas <i>fosfolipase</i>	40
Tabel 4.2. Nilai Kandungan protein dalam setiap percobaan.....	40
Tabel 4.3. Aktivitas Spesifik PLA ₂	41
Tabel 4.4. Hasil Pemurnian PLA ₂ <i>A.planci</i> Kazuo Shiomi	42
Tabel 4.5. Hasil Pemurnian PLA ₂ Racun Bintang Laut <i>Plazaster borealis</i>	42
Tabel 4.6. Hasil Pemurnian PLA ₂ Racun <i>Echis ocellatus</i>	42
Tabel 4.7. Hasil Pemurnian PLA ₂ Racun kobra india timur.....	43



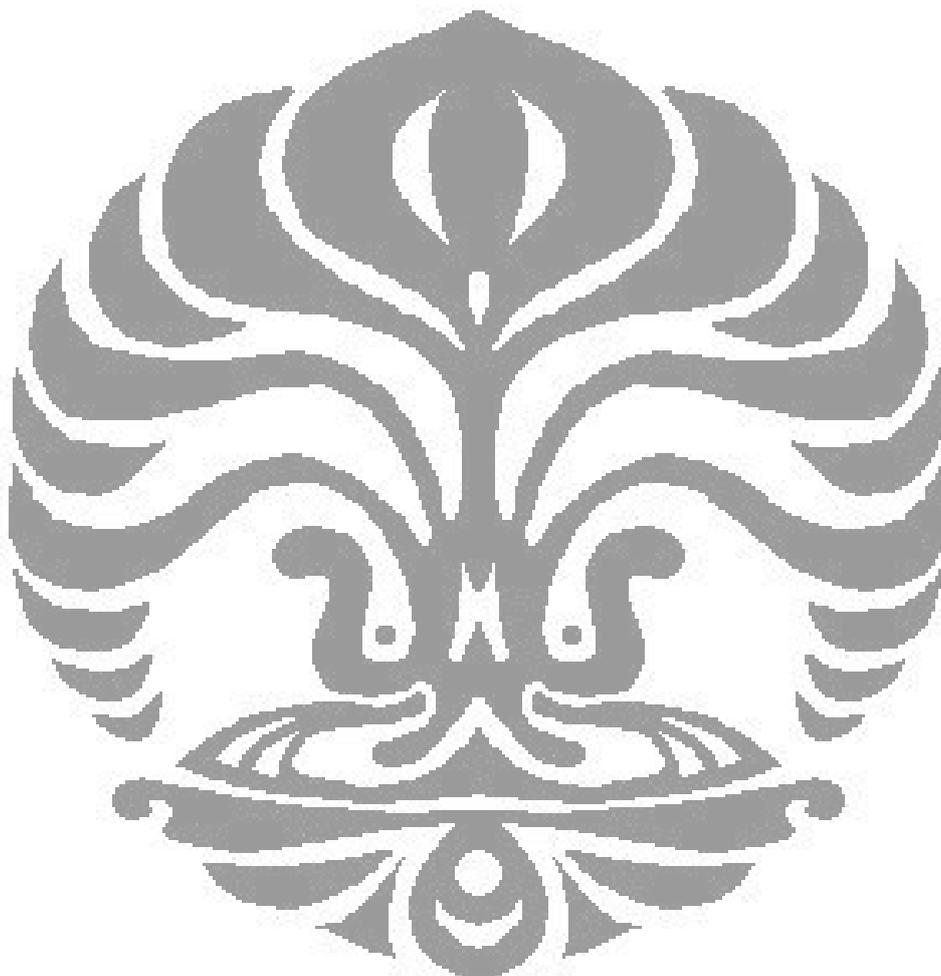
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Ikatan yang diputuskan oleh fosfolipase.....	11
Gambar 2.2. Mekanisme kerja pada proses fraksinasi ammonium sulfat	14
Gambar 2.3. Skema Alat Metode Ekstraksi Tekanan Tinggi	16
Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian	25
Gambar 4.1. Foto Hasil Uji aktivitas kaseinolitik	35
Gambar 4.2. Foto Sonikator.....	36
Gambar 4.3. Foto Filtrasi Vakum	37
Gambar 4.4. Foto Hasil Uji aktivitas <i>Anticoagulant</i>	38
Gambar 4.5. Foto Alat Sentrifugasi	39
Gambar 4.6. Hasil Scaning SDS-Page.....	44



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penentuan Kadar Protein Sampel	46
Lampiran 2. Penurunan Absorbansi Uji Aktivitas <i>Fosfolipase</i>	48
Lampiran 3. Perhitungan aktivitas Spesifik <i>Fosfolipase</i>	49



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bintang laut merupakan masalah besar yang sedang dihadapi oleh proses konservasi terumbu karang. Salah satu bintang laut yang terkenal sebagai perusak terumbu karang adalah *Acanthaster planci*. *A. planci* adalah pemangsa karang yang paling berbahaya ketika terjadi peledakan populasi (outbreak), sehingga hampir seluruh karang yang hidup dimangsa oleh *A. planci*.

Kerusakan terumbu karang yang dapat ditimbulkan oleh *A. planci* sangat besar sehingga penanggulangannya membutuhkan dana yang besar pula. Di Rukyu Islands, Jepang, kehadiran *A. planci* telah menelan biaya JPY 600 juta untuk memusnahkan 13 juta bintang laut antara tahun 1970-1983 (Yamaguchi 1986). Di perairan sekitar Cairns-Whitsunday, GBR, peledakan populasi *A. planci* telah menelan biaya 3 juta AUD untuk pengendalian populasi selama setahun pada tahun 2001. Disamping itu, jutaan dollar dana juga telah dihabiskan untuk penelitian *A. planci* selama 17 tahun di GBR (CRC 2003).

Publikasi ilmiah tentang kerusakan terumbu karang Indonesia akibat *A. planci* baru dilakukan pada saat terjadi peledakan populasi di Kepulauan Banggai oleh Lane (1996). Pada tahun 1996 juga dijumpai adanya pemangsaan karang oleh *A. planci* yang menghabiskan hampir seluruh karang di Pulau Menjangan, Taman Nasional Bali Barat, dan Pantai Bama, Taman Nasional Baluran (Bachtiar, unpublished data). Pada tahun 2005, peledakan populasi (outbreak) bintang-laut *A. planci* dilaporkan terjadi di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan (Yusuf 2008).

Disisi lain ternyata *A. Planci* juga mengandung racun yang berbahaya bagi manusia. Ketika disengat oleh duri *A.planci*, variasi gejala patologikal seperti perih, memar, bengkak dan muntah dapat terjadi. Racun kasar yang diekstrak dari duri memperlihatkan aktivitas biologis yang beragam: kematian pada tikus, aktivitas hemolitik, aktivitas myonecrotic, aktivitas hemorrhagic, peningkatan aktivitas permeabilitas kapiler, aktivitas pembentukan edema, aktivitas fosfolipase A2 (PLA2) (Shiomi et al., 1985), aktivitas pelepasan histamin dari sel (Shiomi et al., 1989), dan aktivitas antikoagulan (Karasudani et al., 1996).

Aktivitas fosfolipase (PLA2) dan antikoagulan menjadi ciri khas racun *A. planci*, jika dikaitkan dalam dunia kedokteran berhubungan dengan penyakit jantung koroner,

aterosklerosis, zamtomatosis, dan pankreatitis dikarenakan peningkatan metabolisme lipid, peningkatan kadar lipid atau hiperlipidemia. Kolesterol, ester kolesterol, trigliserida dan *fosfolipid* merupakan lipid utama yang terdapat dalam darah dan khususnya *fosfolipid* sebagai bahan penyusun membran sel.

Dengan melihat potensi yang begitu besar dari *A. planci* maka penelitian kali ini bertujuan untuk mengisolasi protein enzim *fosfolipase-A2* dari duri *A. planci* menggunakan metode pengendapan etanol. Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melarutkan Crude venom hasil sonikasi dan filtrasi kedalam larutan etanol hingga konsentrasinya menjadi 80% dan menunggunya selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Kemudian endapan itu di sentrifugasi untuk mendapatkan isolate yang lebih baik lagi.

Pada penelitian yang diajukan ini, organisme yang digunakan sebagai objek penelitian adalah *A. planci* yang dikumpulkan dari perairan Ambon bagian selatan. Isolasi dan purifikasi senyawa bioaktif duri – duri *A. planci* dilakukan untuk menghasilkan produk isolat enzim sebagai bahan farmakologi. Evaluasi produk isolat enzim yang dihasilkan dilakukan untuk mengetahui kualitas dan aktivitas produk enzim.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan sebelumnya, maka dapat dijabarkan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Seberapa besar kandungan protein yang didapatkan dari isolasi duri *A. planci* ?
2. Seberapa murnikan protein enzim *fosfolipase* yang terisolasi dengan metode ini ?.
3. Apakah *isolate venom* yang dihasilkan masih mempunyai aktivitas enzim *fosfolipase-A2* ?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi protein dari *A. planci*. Untuk memperoleh hasil yang berkualitas dan ekonomis, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut :

1. Menghasilkan *isolate* enzim (*phopholipase-A2*) dari duri beracun *A. planci*.

2. Mengetahui aktivitas enzim yang dihasilkan, menentukan kandungan proteinnya dengan metode lowry dan melihat tingkat kemurnian dari *fosfolipase-A2* dengan SDS-Page.

1.4. Batasan Masalah

Adapun batasan masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sampel yang akan diuji adalah duri dari bintang laut *A. planci* yang diambil dari perairan Ambon.
2. Sampel akan diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi pelarut
3. Pelarut yang digunakan adalah etanol
4. Uji kandungan protein dengan metode lowry
5. Uji aktivitas *fosfolipase-A2* dengan menggunakan metode Marinetti (1965)
6. Uji kemurnian *fosfolipase-A2* menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan skripsi ini adalah:

BAB I : PENDAHULUAN

Terdiri dari latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

BAB II : TINJAUAN PUSTAKA

Berisi tinjauan mengenai hal-hal yang terkait dalam penelitian ini. Penjelasan terdiri dari penjelasan umum mengenai bintang laut *A. planci*: asal dan penyebarannya, taksonomi dan morfologi, pertumbuhan dan reproduksi, siklus hidup, serta ekologi. Penjelasan tentang teknik-teknik isolasi protein yang meliputi: penjelasan umum, jenis, dan mekanisme kerjanya. Penjelasan tentang metode ekstraksi pelarut yang meliputi : penjelasan umum, pelarut yang digunakan, parameter yang mempengaruhi, serta perolehan protein dengan menggunakan metode ekstraksi pelarut. Penjelasan tentang uji kandungan protein dengan metode lowry, uji aktivitas *fosfolipase* dengan metode metode Marinetti dan uji tingkat

kemurnian dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

BAB III : METODE PENELITIAN

Menjelaskan langkah kerja yang akan dilakukan guna mengaplikasikan metode ekstraksi pelarut untuk perolehan protein dari *A.planci* dan uji kandungan proteinnya dengan metode lowry serta uji aktivitas enzim *fosfolipase-A2* yang diperoleh dengan metode Marinetti dan menguji tingkat kemurniannya dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam bab ini akan dibahas tentang hasil dari penelitian yang dilakukan beserta analisis dari hasil yang diperoleh.

BAB V : KESIMPULAN

Bab ini memberi kesimpulan akhir dari hasil penelitian dan hasil analisis yang dilakukan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Acanthaster Planci*

Klasifikasi ilmiah dari *Acanthaster planci* adalah :

Kingdom : Animalia
Filum : Echinodermata
Kelas : Stelleroidea
Orde : Valvatida
Family : Acanthasteridae
Genus : *Acanthaster*
Spesies : *Acanthaster planci* (Linnaeus 1758)

Bintang laut *A. planci* dilaporkan pertama kali dari contoh hewan di Indonesia oleh George Rumphius pada tahun 1705, yang 50 tahun kemudian dideskripsikan Linnaeus pada tahun 1758 (Moran 1990, Lane 1996), sehingga diperkirakan *A. planci* memang merupakan biota asli Indonesia. Genus terdiri atas tiga spesies, dua spesies lainnya adalah *A. ellisi* dan *A. brevipinnus*. *A. ellisi* merupakan bintang laut pemakan karang yang populasinya sangat jarang, hanya dilaporkan di Filipina. *A. brevipinnus* adalah bintang laut pemakan detritus (sampah organik). Ketiga spesies tersebut mempunyai genetik yang sangat mirip sehingga kadang terjadi hibrid di antara mereka. Di dalam evolusi, *A. planci* berasal dari *A. brevipinnus* yang mendapatkan kemampuan untuk memakan karang.

Bintang laut *A. planci* memiliki nama Indonesia sebagai terjemahan dari nama Inggrisnya 'mahkota duri' atau 'mahkota berduri'. Didalam komunikasi ilmiah berbahasa Inggris, para peneliti menggunakan nama 'COT' kependekan dari 'crown of thorns', sebagai pengganti *A. planci*. Di luar Indonesia, *A. planci* mempunyai nama lokal 'alamea' (Tonga, Samoa), 'bula' (Fiji) dan 'rusech' (Palau).

Warna tubuh *A. planci* dapat bervariasi antar lokasi. Di perairan Thailand dan Maladewa (*Maldives*) warna tubuh biru keunguan, di GBR berwarna merah dan kelabu, sedangkan di

Hawaii berwarna hijau dan merah (Moran 1990). Di Indonesia, warna tubuh *A. planci* merah dan kelabu pada perairan Laut Jawa dan Laut Flores. Di Cocos Island dan Christmas Island (barat daya Jawa), Australia, terdapat dua macam warna *A. planci* yang menunjukkan tipe Samudra Pasifik dan Samudra Hindia (Hobbs and Salmond 2008).

2.1.1 Pertumbuhan dan Reproduksi

Pertumbuhan *A. planci* sangat dipengaruhi oleh makanannya. Anakan *A. planci* yang makan algae mempunyai pertumbuhan sekitar 2,6 mm/bulan, sedangkan yang makan karang mempunyai pertumbuhan sekitar 16,7 mm/bulan (review in Moran 1990). Ketika dewasa, pertumbuhan melambat kembali menjadi sekitar 4,5 mm/bulan. Anakan *A. planci* yang berukuran kurang dari 10 mm memakan algae, sedangkan yang berukuran 10-160 mm sudah mulai memakan jaringan karang (Moran 1990). Individu dewasa berukuran sekitar 250-400 mm, dengan rekor terbesar adalah 800 mm.

Bintang laut *A. planci* mempunyai kelamin yang terpisah (berkelamin tunggal), dengan pembuahan eksternal. Rasio kelamin biasanya 1:1 (Moran 1990). Pemijahan terjadi pada musim panas. Di belahan bumi (hemisfer) utara, misalnya Jepang, pemijahan terjadi pada bulan Mei-Agustus. Di belahan bumi selatan, misalnya Australia, pemijahan terjadi pada bulan Nopember-Januari (Moran 1990), atau Desember-April (CRC 2003). Pemijahan berlangsung sekitar 30 menit (Moran 1990). Individu dewasa biasanya bergerombol sebelum pemijahan, dan memijah secara bersama pada saatnya. Ketika seekor betina memijah, maka suatu feromon yang keluar bersama telur akan memicu pemijahan betina lain dan bintang laut jantan yang ada di sekitarnya. Efektivitas feromon dalam memicu pemijahan tetangganya diperkirakan seluas radius 1-2 meter. Pemijahan berjamaah ini sangat penting bagi invertebrata laut untuk meningkatkan peluang terjadinya pembuahan.

Fekunditas atau jumlah telur yang dihasilkan betina tergantung pada ukuran atau berat tubuh betina. Betina pemijah biasanya berumur 2-3 tahun, atau ukuran diameter tubuhnya lebih dari 25 cm (CRC 2003). Betina yang dewasa mempunyai ukuran tubuh 500-4000 gram, yang memiliki fekunditas sekitar 4-65 juta telur (Moran 1990). Jumlah telur yang sangat besar memang diperlukan oleh kebanyakan invertebrata laut. Kelulushidupan yang rendah harus diimbangi dengan jumlah telur yang sangat besar, sehingga larva yang selamat menjadi dewasa dapat dipertahankan. Telur *A. planci* berukuran 200 mikron, sedangkan sperma

berukuran sekitar 1-2 mikron (Moran 1990). Ukuran telur dan sperma ini tidak banyak berbeda dengan ukuran umum gamet invertebrata laut.

2.1.2 Siklus Hidup

Siklus hidup *A. planci* pada prinsipnya sama persis dengan pola siklus hidup hewan Asteroidea (bintang laut) yang lainnya. Zigot yang terjadi pada saat pemijahan berkembang melalui proses-proses blastulasi dan gastrulasi yang kemudian memasuki tahapan dua fase larva secara berurutan, yaitu bipinnaria dan brachiolaria. Kedua larva tersebut hidup sebagai plankton sehingga pergerakannya mengikuti arah arus. Larva brachiolaria yang matang mempunyai daya apung negatif sehingga turun ke dasar laut yang biasanya di kawasan terumbu karang. Diduga larva brachiolaria menggunakan 'aroma' alga berkapur sebagai tanda-tanda untuk turun menempel pada terumbu karang. Setelah menempel di dasar terumbu, dimulailah kehidupan sebagai bentuk bagi *A. planci*. Penempelan larva *A. planci* kemungkinan terjadi di tempat yang dalam karena pemangsaan karang oleh *A. planci* biasanya dimulai dari karang di tempat yang dalam.

Periode planktonis dari *A. planci* berlangsung sekitar dua atau tiga minggu. Makanan larva planktonis *A. planci* terdiri dari fitoplanton (khususnya pikoplankton), bakteri dan bahan organik terlarut (Okaji et al. 1997). Periode planktonis larva *brachiolaria* diakhiri dengan berkembangnya lima lengan melalui metamorfosis dan menempel di dasar terumbu. Metamorfosis tersebut terjadi setelah hari ke-12 (Olson 1985). Ukuran diameter *A. planci* pada saat terjadi penempelan sekitar 0,5-1 mm atau 500-1000 mikron. Anakan *A. planci* yang sudah menempel di terumbu mendapatkan makanan dari alga berkapur. Pada umur sekitar 4-6 bulan, ketika ukuran tubuhnya mencapai 10 mm, *A. planci* merubah makanannya menjadi pemangsa karang dan mampu tumbuh jauh lebih cepat (review in Keesing and Halford 1992).

2.1.3 Ekologi

Bintang laut *A. planci* merupakan penghuni terumbu karang yang alami. Anakan *A. planci* yang masih kecil hidup di antara pecahan karang di dasar terumbu. Mereka memakan alga berkapur yang tumbuh pada pecahan karang tersebut. Bintang laut *A. planci* yang berukuran kecil (40 cm) mencari makan pada siang hari (CRC 2003). Pada siang hari, *A. planci* kecil bersembunyi dari pemangsa di bawah karang meja atau di celah-celah terumbu, sehingga survey populasi *A. planci* tidak menemukan individu berukuran kecil. Separuh dari waktu

hidup *A. planici* digunakan untuk makan, sehingga dampaknya terhadap terumbu karang dapat sangat besar ketika populasinya besar.

2.1.4 Peledakan populasi (outbreak)

Kepadatan populasi *A. planici* pada terumbu karang yang normal sekitar 6-20 individu per km^2 (Moran 1990). Kepadatan tersebut setara dengan 0,06-0,2 individu dewasa per hektar. Terumbu karang yang sehat, dengan tutupan karang 40-50%, dianggap dapat menampung *A. planici* 20-30 ekor per hektar tanpa kerusakan yang berarti (CRC 2003). Pada saat terjadi peledakan populasi kepadatan *A. planici* sekitar 20,6 individu kecil per m^2 , atau 158 individu dewasa per 314 m^2 , atau 1150 individu dewasa per 20 menit renang orang dewasa (Moran 1990). Kepadatan saat peledakan populasi tersebut setara dengan 0,5 individu dewasa per m^2 atau 5032 individu dewasa per hektar.

Jumlah bintang laut *A. planici* yang dapat ditemukan pada saat terjadi peledakan populasi mencapai ratusan ribu atau bahkan jutaan pada satu terumbu karang. Di Rukyu Island, misalnya, 13 juta bintang laut *A. planici* dibunuh ketika terjadi peledakan populasi tahun 1970-1983. Di Green Island, kelimpahan populasi diperkirakan tiga juta individu ketika peledakan populasi tahun 1979/80. Peledakan populasi *A. planici* di Bootless Bay, Papua New Guinea, dilaporkan mempunyai kepadatan populasi sekitar satu individu per m^2 (Baine 2006). Ukuran diameter tubuh populasi *A. planici* tersebut bervariasi antara 3-46 cm, dengan didominasi anggota populasi ukuran diameter 15-20 cm dan 20-25 cm. Di Pulau Kapoposang, kepadatan saat terjadi peledakan populasi mencapai 120 individu per 100 m^2 , atau setara dengan 1,2 individu per m^2 (Yusuf 2008).

Berdasarkan jejak duri *A. planici* pada sedimen, diperkirakan bahwa *A. planici* sudah ada di terumbu karang the Great Barrier Reefs (GBR) sejak 3000-6000 tahun yang lalu. Dari 223 terumbu karang yang disurvei pada tahun 1985-1986 di GBR, peledakan populasi *A. planici* terjadi pada 62 terumbu atau 27% (Moran et al. 1988). Terumbu di paparan tengah mempunyai proporsi peledakan populasi lebih tinggi daripada paparan luar, sedangkan terumbu paparan dalam hanya sedikit yang menjadi sampel penelitian sehingga kurang terwakili. Peledakan populasi sebagian besar terjadi di antara Townsville dengan Lizard Island. Besarnya ukuran GBR (sekitar 2900 buah terumbu) membuat peledakan populasi *A. planici* dapat terjadi setiap tahun, dengan lokasi terumbu yang berbeda atau berulang kembali.

Setelah terjadinya peledakan populasi dan komunitas karang habis termakan, populasi *A. planci* menurun secara drastis. Penurunan populasi secara drastis biasanya terjadi dalam kurun waktu 1-5 tahun (reviewed in Pratchett 2005). Penurunan populasi tersebut diduga disebabkan karena penyakit (Pratchett 1999), kekurangan makanan atau penuaan. Moran (1992) mengamati pembusukan bintang laut *A. planci* dewasa, yang telah dibuat lapar selama dua bulan dan dimatikan dengan perendaman dalam air tawar, di habitatnya. Pada hari pertama, beberapa jam setelah penempatan *A. planci* mati, bangkai tersebut segera dimakan oleh ikan atau benthos pemakan bangkai. Pembusukan bangkai terjadi pada tiga hari pertama. Pada hari keempat pembusukan oleh bakteri baru terlihat jelas. Hewan-hewan yang paling banyak aktivitas (> 10 kali) memakan bangkai *A. planci* adalah ikan-ikan *Chaetodon auriga* dan *Arotron nigropunctatus*, dan *Cryptocentrus* sp. Bintang laut *A. planci* juga tercatat sebagai pemakan bangkai kawannya, walaupun hanya sekali saja.

Berdasarkan hasil percobaan tersebut, (Moran 1992) berspekulasi bahwa ketika karang yang menjadi makanan utamanya telah habis dikonsumsi, *A. planci* yang kelaparan diduga akan mencari terumbu karang yang baru dengan mengandalkan tanda-tanda 'aroma' karang dari air laut. Individu *A. planci* dewasa mampu bergerak dengan kecepatan 20 m per jam. Karena mereka tidak mampu bergerak cukup cepat untuk menyeberangi selat antar terumbu, maka mereka banyak mati dan membusuk dalam perjalanan. Hal ini diperkuat dengan ditemukannya banyak *A. planci* berserakan pada dasar laut berpasir di kedalaman 30-50 meter.

2.1.5 Dampak Pemangsaan

Dampak dari peledakan populasi *A. planci* terhadap pemangsaan komunitas karang sangat besar. Mortalitas karang akibat *A. planci* sekitar 55%, 70% dan 90% di Rib, John Brewer dan Loadstone Reefs, GBR (Williams 1986); dan 90% di Guam Island (review in Sorokin 1995). Di GBR, rata-rata mortalitas karang akibat serangan *A. planci* berkisar antara 60-90% (CRC 2003). Berubahnya habitat terumbu karang tersebut dapat mempengaruhi ikan-ikan terumbu. Laju pertumbuhan dan fekunditas ikan dewasa diperkirakan akan menurun, disamping penurunan laju rekrutmen dan kelulushidupan ikan-ikan kecil (Williams 1986).

Di GBR, Australia, pola munculnya peledakan populasi *A. planci* seperti berjalannya gelombang. Peledakan populasi dimulai dari terumbu di utara, Green Island dan sekitarnya, kemudian secara perlahan bergerak ke selatan (CRC 2003). Pola gerakan gelombang tersebut bertepatan dengan pola arus air laut pada musim panas (Reichelt et al. 1990), yaitu pada musim pemijahan *A. planci*. Larva diperkirakan hanyut oleh arus tersebut ke terumbu karang yang berjarak dua minggu dari terumbu asalnya, atau sekitar 180 km. Dua atau tiga tahun berikutnya, larva yang menempel di terumbu kedua sudah menjadi dewasa dan memangsa karang. Populasi yang baru tersebut dapat sangat besar jika berasal dari pemijahan di terumbu yang mengalami peledakan populasi.

Terumbu yang sama dapat mendapat serangan *A. planci* secara berulang, dengan jeda waktu sekitar 15 tahun. Di Green Island, terumbu karang telah mengalami serangan *A. planci* yang serius pada tahun 1962, 1979 dan 1999/2000 (CRC 2003). Di Lizard Island, GBR, pemangsaan karang oleh *A. planci* yang terjadi pada tahun 1982 berulang kembali pada tahun 1996 (Wakeford et al. 2008). Di Rukyu Islands, Jepang, peledakan populasi terjadi pada tahun 1969, 1982/83, 1996 (Kato and Kashimoto 2003) dan 2004. Terumbu karang di Pulau Menjangan, Bali, mengalami serangan *A. planci* pada tahun 1996 (I Bachtiar, unpublished data) dan mengalami serangan lagi pada tahun 2008 (H Prawira, personal communication).

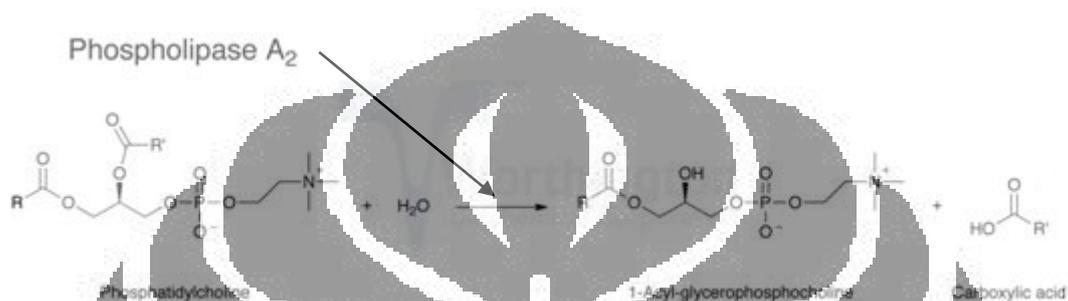
Pemulihan terumbu karang dari serangan *A. planci* sangat bervariasi. Pada umumnya terumbu karang sudah pulih kembali persen tutupannya dalam waktu 10-15 tahun, atau lebih (CRC 2003). Berdasarkan data yang tersedia dari tahun 1985 hingga 1996 di GBR, Seymour and Bradbury (1999) membuat sebuah model yang memprediksi bahwa waktu pemulihan terumbu karang dari pemangsaan *A. planci* pada masa sekarang semakin lama dibandingkan dengan pada masa sebelumnya, walaupun kondisi yang lain tetap sama. Hasil ini menunjukkan telah terjadinya kerusakan pada ciri kunci-struktur komunitas karang akibat peledakan populasi *A. planci*.

2.2. Racun *Acanthaster planci*

planci adalah satu-satunya bintang laut beracun, racun *A. planci* terdapat pada durinya. Penusukan oleh duri *A. planci* menyebabkan gejala menyakitkan pada manusia seperti luka yang sangat perih, kulit merah dan pembengkakan serta berpotensi untuk *hepatotoxic*. Racun diperkirakan diproduksi oleh sel asidofili pada epidermis duri. Telah diketahui bahwa racun

dari *A. planci* itu tersebut adalah protein *phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 2* atau sering disebut *phospholipase-A2* dan *Dnase II (Phospholipase A2 AP-PLA2 II Precursor Acanthaster planci 2010 ; Available from: www.uniprot.org/uniprot/Q3C2C1)*

Fosfolipase A2 termasuk ke dalam kelas enzim stabil terhadap panas dan mengandalkan kalsium sebagai katalisnya untuk menghidrolisis 2-asil dari ikatan 3-n-fosfogliserida. *Fosfolipase A2* diaktivasi oleh Ca^{2+} , diinhibisi oleh zink, barium, dan ion mangan.



Gambar 2.1. Ikatan yang diputuskan oleh *fosfolipase*

fosfolipase A2 memainkan peran penting pada hemolisis sekunder untuk efek eritrolisis pada membran sel darah merah dan menyebabkan nekrosis otot. *Fosfolipase A2* merupakan enzim yang stabil terhadap panas hingga 75°C dan mempunyai berat 15.000 dalton dengan pengujian menggunakan SDS-Page (Kazuo Shinomi *et al* 1997). Sedangkan enzim lain yang juga terkandung dalam duri *A. Planci* adalah *Deoxyribonuclease II (DNase II)* yang merupakan enzim yang digunakan untuk mengatasi sel tumor. Dengan hanya sejumlah kecil enzim yang ditargetkan pada sel tumor agar dapat masuk ke dalam nukleus dan mendegradasi DNA dalam kromosom, yang mengakibatkan sel tidak dapat melakukan replikasi. Penggunaan *bovine pancreatic DNase II* sangat kecil efek racunnya dibandingkan dengan penggunaan bahan *immunotoxin* dengan demikian dapat mengatasi masalah dalam penerapan terapi *immunotoxin* (Linardou *et al.*, 1994)

2.3 Teknik – Teknik Isolasi Protein

Protein merupakan kelompok biomakromolekul yang sangat heterogen. Ketika berada di luar makhluk hidup atau sel, protein sangat tidak stabil. Untuk mempertahankan fungsi dan

strukturnya, setiap jenis protein membutuhkan kondisi tertentu ketika diekstraksi dari *normal biological milieu*. Protein yang diekstraksi hendaknya dihindarkan dari *proteolisis* atau dipertahankan aktivitas enzimatisnya. Untuk menganalisa protein yang ada di dalam sel tersebut, diperlukan prosedur diantaranya (1) memisahkan sel dari jaringannya, (2) menghancurkan membran sel untuk mengambil kandungan sitoplasma dan organelnya serta (3) memisahkan organel-organel dan molekul penyusunnya. Prosedur (1) dan (2) dinamakan homogenasi dapat dilakukan dengan menggunakan alat yang paling sederhana seperti homogeniser atau mortal sampai alat yang paling mutakhir seperti pemakaian vibrasi dan sonikasi tergantung pada bahan yang akan dihomogenasi. Prosedur (3) dilakukan dengan menggunakan penyaringan atau bahkan sentrifus dengan kecepatan dan lama sentrifugasi tertentu

Suatu teknik isolasi dan identifikasi protein harus mempertimbangkan sifat-sifat fisik, kimiawi dan kelistrikan suatu protein sedemikian rupa sehingga konformasi dan aktifitasnya tidak berubah. Beberapa teknik isolasi protein yang umum digunakan akan dijelaskan pada subbab dibawah ini.

2.3.1 Teknik Pemanasan Protein

Protein-protein dalam suatu organisme memiliki tingkat kestabilan terhadap suhu dan pH yang berbeda-beda. Ada protein-protein yang stabil pada suhu tinggi seperti protein-protein dalam bakteri termofilik dan ada pula yang mudah rusak akibat pemanasan. Perbedaan tingkat kestabilan suatu protein ditentukan oleh urutan asam amino-asam amino penyusun protein dan interaksi-interaksi intramolekulnya. Fungsi suatu enzim akan dipertahankan selama struktur protein globular tidak berubah. Ada tiga jenis interaksi non kovalen yang berhubungan dengan tingkat kestabilan struktur protein tersier. Pertama, yaitu ikatan hidrogen antara gugus-gugus rantai samping residu asam amino pada simpul yang berdekatan di dalam rantai. Kedua, yaitu gaya tarik menarik ionik antara gugus-gugus rantai samping yang muatannya berlawanan. Yang ketiga, yaitu interaksi hidrofobik. Gugus-gugus rantai hidrofobik dari beberapa residu asam amino menghindari lingkungan air dan cenderung untuk berkelompok bersama-sama di bagian dalam struktur globular yang terlindung dari air. Interaksi-interaksi hidrofob tersebut akan melipat molekul protein membentuk struktur yang

paling stabil dengan energi bebas yang paling kecil. Jika suatu protein yang tidak tahan panas berada dalam lingkungan yang suhunya tinggi, maka lipatan protein yang hidrofobik akan membuka (terdenaturasi). Protein-protein yang telah mengalami pembukaan lipatan akan saling berinteraksi satu sama lain membentuk suatu agregat dan akhirnya akan mengendap (Lehninger, 1977).

2.3.2 *Ion Exchange Chromatography*

Teknik ini menggunakan zeolitas, resin organik atau anorganik sebagai penukar ion. Senyawaan yang mempunyai ion-ion dengan afinitas yang berbeda terhadap resin yang digunakan dapat dipisahkan. Kromatografi pertukaran ion (*ion-exchange chromatography*) biasa digunakan untuk pemurnian materi biologis, seperti asam amino, peptida, protein. Metode ini dapat dilakukan dalam dua tipe, yaitu dalam kolom maupun ruang datar (planar). Terdapat dua tipe pertukaran ion, yaitu pertukaran kation (*cation exchange*) dan pertukaran anion (*anion exchange*).

Pada pertukaran kation, fase stasioner bermuatan negatif; sedangkan pada pertukaran anion, fase stasioner bermuatan positif. Molekul bermuatan yang berada pada fase cair akan melewati kolom. Jika muatan pada molekul sama dengan kolom, maka molekul tersebut akan terelusi. Namun jika muatan pada molekul tidak sama dengan kolom, maka molekul tersebut akan membentuk ikatan ionik dengan kolom. Untuk mengelusi molekul yang menempel pada kolom diperlukan penambahan larutan dengan pH dan kekuatan ionik tertentu (Deutscher 1990).

2.3.3 *Gel Filtration*

Gel filtrasi dilakukan dengan menggunakan butiran berpori. Kolom yang dibangun dengan butiran tersebut akan mempunyai dua pengukuran volume cairan, volume eksternal, yaitu cairan diantara pori, dan volume internal, yaitu cairan yang berada diantara pori-pori butiran. Molekul besar hanya melewati volume eksternal ketika molekul kecil melewati volume internal dan eksternal. Campuran protein dilewatkan melalui bagian atas kolom gel filtrasi

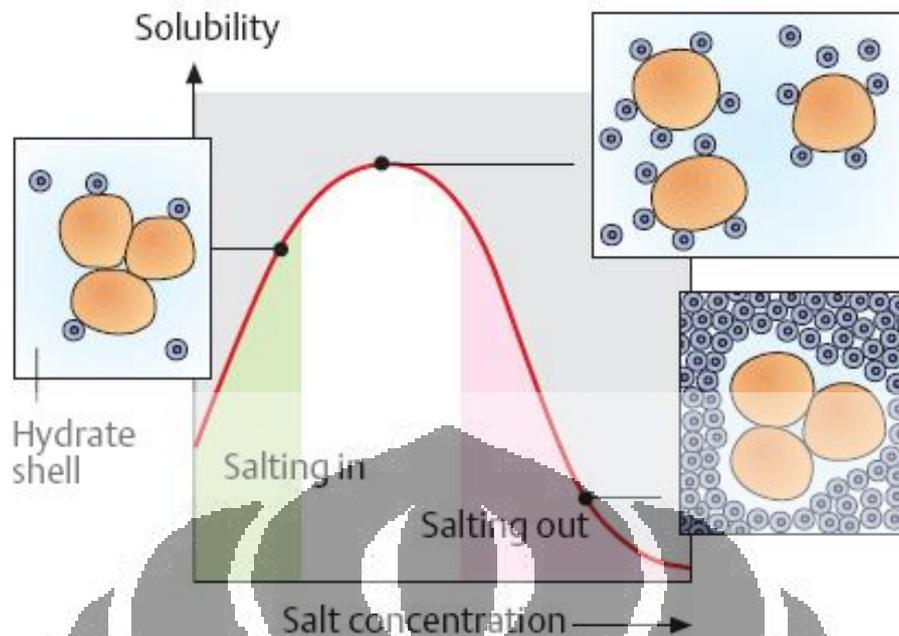
dan dibiarkan perkolasi melewati kolom. Yang terpenting pada gel filtrasi adalah diameter pori yang dapat memasuki volume internal dan diameter hidrodinamik molekul protein. Protein yang mempunyai diameter hidrodinamik kecil yang sama dengan diameter rata-rata pori-pori butiran akan memasuki volume internal dan akan menjadi bagian matriks gel. Protein yang mempunyai diameter hidrodinamik besar tidak akan memasuki volume internal dan akan keluar dari kolom (Deutscher, 1990).

2.3.4 Dialisis

Protein globular dalam larutan dengan mudah dapat dipisahkan dari zat terlarut yang berbobot molekul kecil (misalnya garam) dengan menggunakan cara dialisis. Membran semipermeabel (tabung dialisis yang biasanya terbuat dari selofan) digunakan untuk menahan molekul-molekul protein, sedangkan molekul terlarut kecil (seperti glukosa dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) dan air dibiarkan lewat. Proses dialisis dikendalikan oleh perbedaan konsentrasi terlarut dalam kedua sisi yang dipisahkan membran. Setelah kesetimbangan konsentrasi tercapai, proses difusi zat terlarut menembus membran menjadi setimbang. Penggantian molekul garam dengan air atau bufer berkekuatan ion rendah dari luar membran menyebabkan konsentrasi molekul terlarut kecil di dalam larutan protein berkurang (Koelman, 2005).

2.3.5 Fraksinasi Ammonium Sulfat

Fraksinasi tergolong ke dalam metode pemurnian yang telah lama digunakan. Cara ini mudah dan cukup efektif dalam memisahkan campuran protein ekstrak kasar. Fraksinasi dilakukan atas dasar perbedaan kelarutan protein-protein di dalam campuran. Garam netral, seperti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ditambahkan ke dalam larutan protein dalam jumlah tertentu. Pengaruh garam netral terhadap kelarutan protein merupakan fungsi dari kekuatan ioniknya, suatu ukuran konsentrasi dan jumlah muatan listrik sumbangan kation dan anion garam. Efek *salting-in* disebabkan oleh kecenderungan perubahan gugus-gugus rantai samping dalam protein yang terdisosiasi untuk mengion. Tetapi bila kekuatan ionik meningkat lebih lanjut, kelarutan protein mulai menurun. Pada kekuatan ionik yang cukup tinggi, protein akan mengendap dengan sempurna (*salting-out*). Garam pada konsentrasi tinggi menarik molekul air di permukaan molekul protein sehingga mengurangi kelarutan protein tersebut (Deutscher, 1990).



Gambar 2.2. Mekanisme kerja pada proses fraksinasi ammonium sulfat
(Koelman, 2005)

2.3.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tertentu. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses umum dari ekstraksi dapat dibagi menjadi tiga yaitu pelarutan, difusi dan matriks. Pertama, komponen yang terlarut (*solute*) harus dapat terlarut di dalam pelarut. Kedua, *solute* harus dapat berpindah secara cepat, baik melalui difusi atau mekanisme lain, dari bagian dalam matriks tempat *solute* berada. Proses difusi tersebut dapat berupa difusi normal dari *solute* seperti dalam polimer, atau melibatkan difusi dalam fluida melalui pori-pori matriks. Waktu terjadinya difusi akan bergantung kepada koefisien difusi dan bentuk serta ukuran dari matriks atau partikel matriks (Deutscher, 1990).

Dari semua hal itu, dimensi atau ukuran memegang peranan yang paling penting. Ketiga, *solute* harus dilepaskan oleh matriks. Proses terakhir ini dapat melibatkan proses desorpsi dari pusat matriks, melewati dinding sel, atau keluar dari bentuk yang mengurungnya, seperti

pada rantai polimer. Proses ini dapat berlangsung secara lambat dan pada beberapa kasus, komponen yang ingin diekstrak terkunci dalam struktur matriks. Biasanya hal ini disebabkan oleh kehadiran air yang bersifat tidak larut dan dapat menghalangi komponen yang ingin diekstrak. Oleh karena itu, terkadang diperlukan proses pengeringan sebelum dilakukan proses ekstraksi.

2.3.6.1 Ekstraksi Maserasi

Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama beberapa hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan (Deutscher, 1990).

2.3.6.2 Ekstraksi Soxhletasi

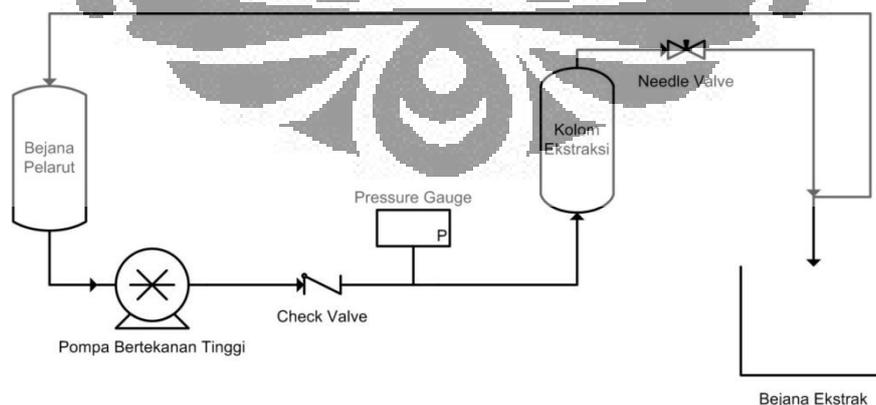
Penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara serbuk simplisia ditempatkan dalam klonsong yang telah dilapisi kertas saring sedemikian rupa, cairan penyari dipanaskan dalam labu alas bulat sehingga menguap dan dikondensasikan oleh kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang jatuh ke dalam klonsong menyari zat aktif di dalam simplisia dan jika cairan penyari telah mencapai permukaan sifon, seluruh cairan akan turun kembali ke labu alas bulat melalui pipa kapiler hingga terjadi sirkulasi. Ekstraksi sempurna ditandai bila cairan di sifon tidak berwarna, tidak tampak noda jika di KLT, atau sirkulasi telah mencapai 20-25 kali. Ekstrak yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan (Deutscher, 1990).

2.3.6.3 Ekstraksi Perkolasi

Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara serbuk simplisia dimaserasi selama 3 jam, kemudian simplisia dipindahkan ke dalam bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori, cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui simplisia tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat aktif dalam sel-sel simplisia yang dilalui sampai keadan jenuh. Gerakan ke bawah disebabkan oleh karena gravitasi, kohesi, dan berat cairan di atas dikurangi gaya kapiler yang menahan gerakan ke bawah. Perkolat yang diperoleh dikumpulkan, lalu dipekatkan (Deutscher, 1990).

2.3.6.4 Metode Ekstraksi Bertekanan Tinggi

Metode ekstraksi tekanan tinggi adalah proses ekstraksi menggunakan pelarut dalam kondisi tekanan tinggi. Umumnya, pelarut yang digunakan berada dalam kondisi superkritis sehingga proses ini biasa disebut dengan proses ekstraksi fluida superkritis. Metode ekstraksi ini merupakan cara yang cukup efektif untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam. Namun kekurangan dari metode ekstraksi tekanan tinggi ini adalah sulitnya mencapai kondisi operasi dibutuhkan, biaya yang mahal untuk mempersiapkan alat. Selain itu, proses pemisahan pelarut dengan ekstrak juga harus melalui proses terpisah sendiri. Skema alat yang akan digunakan dapat dilihat pada Gambar di bawah ini (Armstrong, 1999).



Gambar 2.3. Skema Alat Metode Ekstraksi Tekanan Tinggi.

2.3.6.5 Metode Ekstraksi Gelombang Mikro

Ekstraksi dengan Bantuan Gelombang Mikro merupakan proses ekstraksi yang memanfaatkan energi yang ditimbulkan oleh gelombang mikro dalam bentuk radiasi non-ionisasi elektromagnetik (Armstrong, 1999). Energi ini dapat menyebabkan pergerakan molekul dengan migrasi ion dan rotasi dari dua kutub, tetapi tidak mengubah struktur molekulnya. Pada umumnya ekstraksi menggunakan pelarut polar sebagai pengekstraknya, tetapi ekstraksi juga dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut nonpolar, seperti heksana dan toluena dengan cara menambahkan aditif polar ataupun serat yang dapat menyerap gelombang mikro (Armstrong, 1999).

2.3.7 Metode Pemisahan dengan Membran

Membrane separation yaitu suatu teknik pemisahan campuran 2 atau lebih komponen tanpa menggunakan panas (Koelman, 2005). Komponen-komponen akan terpisah berdasarkan ukuran dan bentuknya, dengan bantuan tekanan dan selaput *semi-permeable*. Hasil pemisahan berupa *retentate* (bagian dari campuran yang tidak melewati membran) dan *permeate* (bagian dari campuran yang melewati membran).

Berdasarkan jenis pemisahan dan strukturnya, membran dapat dibagi menjadi 3 kategori:

- Porous membrane. Pemisahan berdasarkan atas ukuran partikel dari zat-zat yang akan dipisahkan. Hanya partikel dengan ukuran tertentu yang dapat melewati membran sedangkan sisanya akan tertahan. Berdasarkan klasifikasi dari IUPAC, pori dapat dikelompokkan menjadi *macropores* (>50nm), *mesopores* (2-50nm), dan *micropores* (<2nm). *Porous membrane* digunakan pada *microfiltration* dan *ultrafiltration*.
- Non-porous membrane. Dapat digunakan untuk memisahkan molekul dengan ukuran yang sama, baik gas maupun cairan. Pada *non-porous membrane*, tidak terdapat pori seperti halnya *porous membrane*. Perpindahan molekul terjadi melalui mekanisme difusi. Jadi, molekul terlarut di dalam membran, baru kemudian berdifusi melewati membran tersebut.
- Carrier membrane. Pada *carriers membrane*, perpindahan terjadi dengan bantuan *carrier molecule* yang mentransportasikan komponen yang diinginkan untuk

melewati membran. Carrier molecule memiliki afinitas yang spesifik terhadap salah satu komponen sehingga pemisahan dengan selektifitas yang tinggi dapat dicapai.

Dari berbagai teknik dan metode isolasi protein yang ada, pada penelitian ini kami memutuskan untuk menggunakan teknik isolasi pengendapan dengan etanol. Hal ini dikarenakan teknik pengopersian ini yang paling sederhana baik dari segi pengadaan alat dan biaya operasional. Sehingga diharapkan jika penelitian ini berhasil melakukan isolasi protein dari duri bintang laut *A. Planci* maka dapat diaplikasikan pada dunia industri dengan biaya investasi awal dan operasional yang sangat ekonomis.

Pelarut yang digunakan adalah senyawa alkohol lebih tepatnya adalah etanol. Terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah kepolaran dari senyawa yang ingin diekstraksi dan kuatnya protein enzim yang ingin diekstraksi terhadap pelarut organik. Senyawa etanol atau etil alkohol memiliki gugus senyawa C_2H_5OH . Senyawa ini merupakan jenis pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi karena sifatnya yang dapat melarutkan berbagai senyawa organik. Pemilihan etanol sebagai pelarut didasarkan pada sifatnya yang mudah menguap, tidak menimbulkan bahaya yang signifikan dan ketersediaannya cukup banyak serta harganya terjangkau. Berikut ini adalah properti fisik dari etanol :

Tabel 2.1. Properti fisik etanol

(Tabel Properties Of Etanol.2010 ; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol>)

Properti	Nilai
Massa molekul Relatif, g/mol	46,07
Titik beku, °C	-114,1
Titik didih, °C	78,32
Temperatur kritis, °C	243,1
Tekanan kritis, kPa	6383,48
Densitas, gr/mL	0,7893
Viskositas pada 20 °C, mPa.s = cP	1,17

2.4. State of The Art

Subbab ini akan menjelaskan dan me-review artikel – artikel yang terkait dengan penelitian tentang *A. planci*. Berikut dibawah ini merupakan ringkasan dalam bentuk tabel tentang state of the art dalam penelitian ini

Tabel 2.2 Ringkuman state of the art penelitian

Peneliti (tahun)	Hasil Penelitian
Shiomi (1984)	Aktivitas biologi racun duri <i>A. planci</i>
Karasudani (1995)	Aktivitas kontraksi otot dan peningkatan permeabilitas vascular pada tikus oleh racun <i>A. planci</i>
Shiomi (1997)	Pemurnian dan karakterisasi fosfolipase A ₂ racun <i>A. planci</i>
Koyama (1998)	Situs aktif antikoagulan racun <i>A. planci</i>
Shiomi (2004)	Pemurnian plancitoxin sebagai DNase II pada racun <i>A. planci</i>
Ota (2005)	Pengkloningan molekul racun fosfolipase A ₂ <i>A. planci</i>
Ota (2006)	Aktivitas hepatotoksitas dari plancitoxin I pada racun <i>A. planci</i>
L.M. Bergeron (2007)	Kestabilan Enzim tahan panas pada pelarut organik
B. Lin (2008)	Potensi Toksisitas racun <i>A. planci</i> pada tubuh manusia

A. Biological Activity Of Crude Venom From The Crown-Of-Thorns Starfish *Acanthaster Planci*, Shiomi et'al, 1984

Penelitian ini melakukan uji aktivitas biologi dari ekstrak kasar racun *A. planci*. Racun kasar diekstrak dari duri dan diuji aktivitasnya. Aktivitas hemolitik terjadi terhadap eritrosit hewan tanpa adanya lesitin, aktivitas lebih tinggi terjadi diketahui dengan adanya kehadiran lecitin, membuktikan racun mengandung faktor hemolitik

secara langsung dan tidak langsung, yaitu *fosfolipase A₂* yang bisa mengubah lesitin menjadi lysoleitin yang mempunyai aktivitas hemolitik. Racun mematikan untuk tikus ketika disuntikan pada dosis LD₅₀ 2,7 mg/kg, kecepatan dari gejala tergantung dari jumlah dosis. Pengekstrakan dilakukan dengan cara homogenisasi dengan fosfat bufer, dan pengukuran kadar protein diukur dengan metode Lowry dengan bovine serum albumin sebagai standar.

B. Caspase-Independent Apoptosis Induced in Rat Liver Cells by Plancitoxin I, the Major Lethal Factor From the Crown-of-thorns Starfish *Acanthaster Planci* Venom, Karasudani et'al 1995

Penelitian ini melakukan pengujian racun pada duri *A. planci* yang menyebabkan kontraksi pada uterus tikus dan menaikkan permeabilitas vaskular pada kelinci. Hasil ini menyimpulkan aksi kontraksi uterus disebabkan oleh prostaglandin sebagai mediator dan sebagian dikontribusi oleh aktifitas *fosfolipase* pada racun. Preparasi racun dari duri *A. planci* menggunakan Polytron homogeniser dengan fosfat bufer pH 7.0 dan disentrifugasi 4000x g selama 30 menit, lalu diendapkan menggunakan ammonium sulfat 50%, supernatan dinamakan venom A dan endapan dinamakan venom B, endapan didialisis menggunakan air dan digunakan sebagai percobaan biologi.

C. Purification And Properties Of Phospholipases A₂ From The Crown-Of- Thorns Starfish (*Acanthaster Planci*) Venom, K. Shiomi et'al, 1997

Penelitian ini menjelaskan tentang pemurnian *fosfolipase A₂* (AP-PLA2-I dan II) dari *A. planci*. PLA2 mempunyai massa molekul sebesar 12 kDa dengan gel filtrasi atau 15 kDa dengan SDS-PAGE. Aktivitas enzim meningkat 180% dengan adanya Ca²⁺ tetapi berkurang 10-20% dengan adanya Cu²⁺ dan Zn²⁺. Pemurnian dilakukan dengan dialisis menggunakan fosfat bufer pH 7 lalu diaplikasikan ke dalam kolom CM-cellulose (2 x 48; Brown, Berlin, U.S.A.). Fraksi yang aktif diendapkan dengan ammonium sulfat hingga 80% konsentrasi akhir, lalu dimasukkan ke dalam kolom *Phenyl Sepharose* CL-4B (2 x 40 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Pengukuran protein menggunakan metode Lowry, menggunakan bovine serum albumin sebagai standar.

D. Analysis for Sites of Anticoagulant Action of Plancinin, a New Anticoagulant Peptide Isolated from the Starfish *Acanthaster planci*, in the Blood Coagulation Cascade, T. Koyama et'al, 1998

Penelitian ini menemukan ada suatu peptida baru yang berfungsi sebagai antikoagulan yang dinamakan *plancinin* (Karasudani, 1996). *Plancinin* memperpanjang waktu aktivasi tromboplastin dan protrombin tetapi tidak memperpanjang waktu trombin untuk terbentuk. Hasil penelitian ini mengindikasikan aksi antikoagulan berlokasi pada faktor II dan X langkah aktivasi dengan kompleks koagulan darah. Pada penelitian ini (Koyama, 1998), *plancinin* dimurnikan dengan kolom DEAE selulosa (Nacalai tesqua, Kyoto, Japan). Dipekatkan dengan *ultrafiltrasi* (Amicon 10, Japan Grace, Tokyo, Japan) menggunakan gas nitrogen lalu diaplikasikan menggunakan kolom Sephadex G-50 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). Analisis peptida menggunakan SDS-PAGE, dan pengukuran kandungan menggunakan metode Lowry. Semua prosedur pemurnian dilakukan di dalam *chromatochamber* pada 4°C.

E. Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II, K. Shiomi et'al, 2004

Penelitian ini menjelaskan tentang adanya dua faktor mematikan (*plancitoxins* I dan II) dengan LD50 yang sama dari 140 mg / kg yang dimurnikan dari duri bintang laut *A. planci*. Injeksi dosis subletal *plancitoxin* I atau II ke tikus menunjukkan peningkatan kadar serum *glutamic oxaloacetic transaminase* dan *glutamic pyruvic transaminase*, hal tersebut berarti bahwa kedua racun tersebut berpotensi *hepatotoxic*. Analisis dengan SDS-PAGE menunjukkan bahwa kedua *plancitoxins* terdiri dari dua subunit (a-subunit 10 kDa dan b-subunit 27 kDa) yang dijembatani oleh ikatan disulfida. Menariknya, sekuens asam amino menyimpulkan bahwa *plancitoxin* ini menunjukkan homologi 40-42 % dengan *deoxyribonucleases* mamalia II (*DNases II*). Selain itu, *plancitoxin* menunjukkan aktivitas DNA merendah pada pH optimum 7,2. *Plancitoxin I* merupakan contoh pertama dari *DNases II*.

Prosedur pemurnian dalam penelitian ini dilakukan dengan cara mengumpulkan 100 gram duri dari tiga spesimen *A. planci*. Kemudian duri tersebut diekstraksi dua kali dengan dua volume sebesar 0,01 M buffer fosfat (pH 7,0). Crude toxin tersebut didialisis dengan buffer yang sama. Kolom dicuci bersih dengan buffer yang sama untuk menghilangkan protein *unadsorbed* dan kemudian dielusi dengan sekitar 40 ml

/jam. Toksin yang mengandung fraksi dikumpulkan, didialisis terhadap air suling dan *lyophilized*. Dua fraksi beracun sesuai dengan plancitoxins I dan II secara individual dikumpulkan dan digunakan untuk penentuan aktivitas biologis tertentu.

F. Molecular cloning of two toxic phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom, E. Ota et'al, 2005

Penelitian ini melakukan *cloning* terhadap racun PLA2 dari *A. planci*. Pengkloningan ini dimaksudkan untuk mengetahui lokasi aksi racun-racun tersebut pada level molekul. Pemurniannya dilakukan dengan kombinasi kromatografi hidrofobik, gel filtrasi dan *reverse phase* HPLC. Protein diukur dengan menggunakan metode Lowry.

G. Caspase-independent apoptosis induced in rat liver cells by plancitoxin I, the major lethal factor from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom, Eiji Ota et'al, 2006

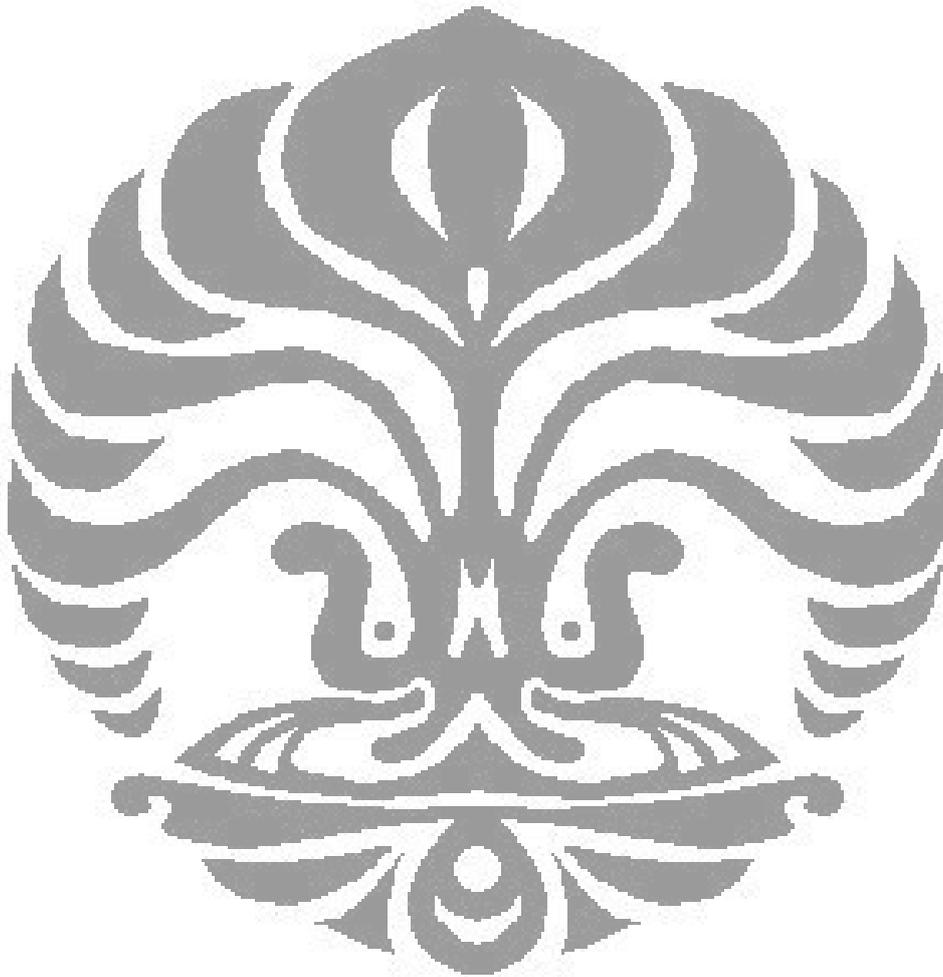
Penelitian ini menguji toksisitas *Plancitoxin* I sebagai faktor mematikan utama dari bintang laut *A. planci*, cukup unik bukan hanya dalam menunjukkan potensi hepatotoksitas tapi juga dalam urutan homologi dengan *deoxyribonuclease II* mamalia. Prosedur penelitian ini dilakukan dengan cara Plancitoxin I dimurnikan dari punggung *A. planci* oleh kombinasi kromatografi kolom CM-selulosa dan *fast protein liquid chromatography* pada Mono S. Hasil penelitian kami menunjukkan bahwa plancitoxin I menginduksi apoptosis sel TRL 1215.

H. A Case of Elevated Liver Function Tests After Crown-of-Thorns (*Acanthaster planci*) Envenomation, B. Lin et'al, 2008

Penelitian ini menjelaskan enzim hati meningkat pada seorang wanita berusia 19 tahun yang menginjak duri *A. planci*. Kegagalan enzim hati untuk menormalkan sampai setelah bedah debridemen dan penghapusan fragmen tulang belakang menunjukkan toksisitas sistemik yang sedang berlangsung dari racun duri *A. planci* yang tertanam di kakinya. laporan kasus tambahan lebih lanjut dapat melukiskan potensi untuk toksisitas dari *A. planci* pada manusia.

I. Chaperone function in organic co-solvents: Experimental characterization and modeling of a hyperthermophilic chaperone subunit from *Methanocaldococcus jannaschii* , Lisa M. Bergeron et'al 2007

Penelitian ini menjelaskan bahwa molekul chaperone memainkan peran sentral dalam mempertahankan struktur protein dalam sel. Dipaparkan bahwa protein enzim yang kuat pada suhu tinggi ternyata mampu bertahan untuk tidak terdenaturasi dengan pelarut organik seperti etanol.

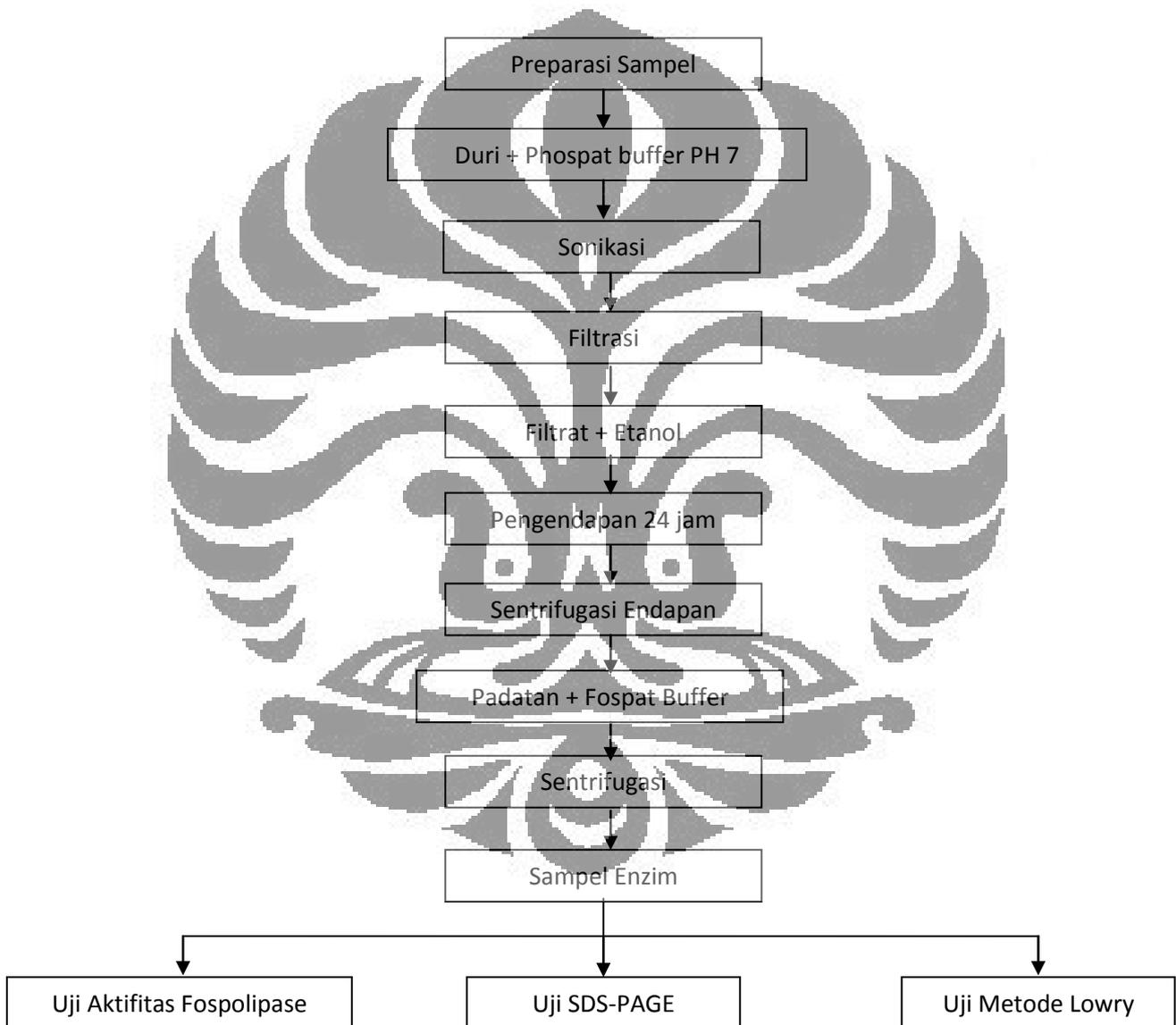


BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Berikut ini adalah rancangan penelitian yang akan dilakukan, terdiri dari : preparasi sampel dari *A. planci*, proses pengendapan dengan etanol, uji aktivitas Fosfolipase, SDS-PAGE serta uji konsentrasi dengan metode Lowry.



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

Pada Gambar 3.1 di atas dapat dilihat alur dari penelitian ini. Berikut ini adalah penjelasan dari alur penelitian tersebut:

1. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah *Acanthaster planci* yang diambil dari beberapa tempat, yaitu :

- Tanjung Setan – Desa Morela, Kec. Leihitu, Kab. Maluku Tengah
- Pulau Pombo, Kec. Salahutu, Kab. Maluku Tengah
- Kalauli – Desa Hila, Kec. Leihitu, Kab. Maluku Tengah
- Desa Suli, Tial dan Tengah-Tengah, Kec. Salahutu, Kab. Maluku Tengah
- Desa Hutumuni dan Leahari, Kec. Leitimur Selatan, Kota Ambon

Lalu spesimen disimpan dalam lemari es suhu -20°C sampai digunakan. Duri dari *Acanthaster planci* digunting dan dikumpulkan. Pemisahan enzim pada duri *A. planci* bisa dilakukan setelah enzim protease berhasil dipisahkan dari papain (getah pepaya muda) dengan metode ekstraksi etanol sebagai control positif pada penelitian ini. Keberhasilan pemisahan *protease* dibuktikan dengan uji aktivitas kaseinolitik.

2. Sonikasi

Hal ini dilakukan untuk mengeluarkan racun dari *A. Planci* yang didalamnya terdapat enzim yang ingin dilakukan isolasi. Proses sonikasi ini dilakukan dengan menggunakan alat sonikator yang terdapat di Lab RPKA department teknik kimia Universitas Indonesia dengan perlakuan 2x 8 menit sonikasi.

3. Filtrasi

Filtrasi dilakukan untuk menyaring hasil dari proses sonikasi yang sebelumnya telah dilakukan sehingga didapatkan filtrat yang jernih. Proses filtrasi ini dilakukan dengan menggunakan pompa Vakum dan kertas saring whatman 42.

4. Penambahan Larutan Etanol pada filtrat

Hal ini dilakukan untuk mengisolasi enzim fosfolipase yang diinginkan dengan cara menambahkan etanol analitical grade 99,9% kedalam filtrat sehingga konsentrasi etanol menjadi 80% dan didiamkan selama 24 jam.

5. Sentrifugasi

Perlakuan sentrifugasi dilakukan sebanyak 2 kali. Pertama setelah terbentuknya endapan dari pencampuran larutan etanol dengan duri hasil sonikasi untuk mendapatkan padatan yang mengandung enzim yang terpisah dari etanol. sentrifugasi kedua dilakukan setelah terbentuk padatan enzim dari sonikasi pertama kemudian ditambahkan buffer fosfat secukupnya kemudian di sentrifugasi dan diambil supernatannya yang merupakan sampel enzim hasil isolasi.

6. Uji Aktifitas Fosfolipase

Uji aktifitas Fosfolipase pada percobaan ini menggunakan metode Marinetti yang bertujuan untuk memeriksa apakah Fosfolipase dari ekstrak yang dihasilkan masih memiliki aktivitas enzim untuk menurunkan nilai absorbansi dari suspensi telur dan Tris-Cl yang dibuat.

7. Uji SDS-Page

SDS-PAGE dilakukan untuk menguji tingkat kemurnian protein dari ekstrak yang dihasilkan. Prinsip dari pengujian ini adalah Protein memiliki muatan positif atau negatif yang mencerminkan campuran muatan asam amino yang dikandungnya. Bila medan listrik diaplikasikan pada larutan yang mengandung molekul protein, protein akan bermigrasi dengan laju yang tergantung pada muatan netto, bentuk, dan ukurannya. Teknik tersebut adalah elektroforesis dan dipergunakan untuk memisahkan campuran protein, baik pada larutan bebas maupun pada larutan dengan matriks berpori solid seperti pati (Alberts *et al.*, 1994).

8. Uji Kandungan Protein

Pengujian ini menggunakan metode Lowry. Langkah ini dilakukan untuk menentukan kadar protein di dalam ekstrak yang dihasilkan dengan prinsip perbedaan nilai serapan dari masing-masing larutan yang diukur pada panjang gelombang 750 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan-bahan yang digunakan selama penelitian terdiri atas berbagai macam dengan jenis dan fungsinya

3.2.1 Peralatan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah sebagai berikut :

1. Tabung reaksi
2. *Beaker glass*
3. *Vortex mixer*
4. SDS-PAGE
5. Spektrofotometer
6. Pipet tetes
7. Pipet ukur
8. Mikropipet
9. Labu ukur
10. Gelas ukur
11. Timbangan
12. Spatula
13. Termometer
14. Waterbath
15. Sentrifugasi
16. Sonikator

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada saat penelitian adalah sebagai berikut :

Pembuatan fosfat bufer pH 7.0 :

1. K_2HPO_4 (Mr.174,17)
2. KH_2PO_4 (Mr.136,08)
3. Aquades

Pembuatan Ekstrak Protein pepaya:

1. bubuk dari Getah papain
2. Etanol analytical grade

Penentuan Kadar Protein Lowry :

1. BSA 250 $\mu\text{g/mL}$
2. dH_2O
3. NaOH 0,1N
4. CuSO_4 1% ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,56 gr + dH_2O)
5. NaK-Tartrat 1% (NaK-Tartrat 2,37 gr + dH_2O)
6. Na_2CO_3 2% (NaOH 2 gr + Na_2CO_3 10 gr + dH_2O)
7. Larutan Biuret (5 ml larutan CuSO_4 1% dan larutan 5 ml NaK-Tartrat 1% dimasukkan ke dalam 500 ml larutan Na_2CO_3 2%)
8. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N

Penentuan Uji Aktivitas Kaseinolitik :

1. Trikloroasetat (TCA) 20%
2. Larutan kasein 1%
3. NaOH 0,5 M
4. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 2N
5. Bufer Tris-Cl, pH 8.0

Penentuan Uji Aktivitas Antikoagulan :

1. Darah segar
2. Parafin cair
3. Sampel enzim

Bahan-bahan SDS-PAGE

1. Aquades
2. Akrilamid 29,2 gr
3. (bis)akrilamid
4. Sodium Dedosil Sulfat 0,4 gr

5. Larutan HCl
6. Ammonium persulfat (APS) 0,1 gr
7. 2-mercaptoetanol 0.1 ml
8. Gliserin 2 ml
9. Glisin 7,2 gr
10. Bromofenol biru (BPB)
11. Coomassie Brilliant Blue 1 gr
12. Metanol 300 mL
13. Asam asetat 100 mL
14. N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED)

3.3. Prosedur Preparasi Sampel

Preparasi sampel dari spesimen *A. Planci* dilakuakn dengan cara :

1. Mengeluarkan dari spesimen *A. Planci* yang tersimpan di *Freezer* dan menunggu sekitar 12 jam sehingga dari spesimen *A. Planci* tersebut tidak membeku
2. Dengan menggunakan gunting *steinless steel* dan pelindung tangan, dilakuan pemangkasan duri dari spesimen *A. Planci* dan menyimpannya dalam wadah yang diberi es baku untuk menjaga kondisi duri selalu fresh

3.4. Metode Sonikasi

Metode sonikasi dilakukan dengan prosedur sebagai berikut

1. memberishkan batang sonikator dengan menggunakan alkohol 90% dan kemudian membilasnya dengan akuades hingga bersih dan mengeringkannya dengan tissue
2. memasukan duri yang ingin diekstrak dan larutan phospat buffer pH 7 dengan perbandingan 1:1 kedalam wadah yang sesuai dengan diberikan es pada sekeliling wadah agar duri yang ingin di sonikasi tetap terjaga suhunya dengan baik.

3. lakukan sonikasi selama 2x 8 menit dengan intensitas 80% (42.5 Mega Hertz) mode push on off agar tidak terjadi panas yang berlebihan pada duri tersebut

3.5. Prosedur Uji Aktifitas Fosfolipase

Aktivitas Fosfolipase (PLA₂) dilakukan dengan cara mengukur kejernihan suspensi kuning telur, sesuai dengan metode Marinetti (1965). Ke dalam 0,1 ml larutan sampel ditambahkan 1,5 ml suspensi kuning telur yang dibuat dari 0,1 M Tris-HCl bufer pH 8.0 pada konsentrasi 2 mg kuning telur/ml. Absorbansi pada 900 nm campuran diperkirakan tepat 5 menit. Satu unit enzim diperkirakan sebagai aktivitas yang menyebabkan pengurangan 0,01 absorbansi/menit.



3.6. Prosedur Uji SDS-PAGE

SDS-PAGE menggunakan *cross-linked* gel poliakrilamid sebagai matriks inert di mana protein akan bermigrasi. Gel biasanya disiapkan sebelum dipergunakan. Ukuran pori gel dapat disesuaikan sehingga cukup kecil untuk memperlambat migrasi molekul protein yang dikehendaki. Protein-protein tersebut tidak berada pada larutan biasa tetapi pada larutan yang mengandung deterjen yang bermuatan negatif sangat kuat, yakni Sodium Dodesil Sulfat (SDS). Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen.

Plate pembentuk gel disusun seperti petunjuk yang diberikan. *Separating gel* dibuat dengan cara menyiapkan tabung polipropilen 50 ml. Sebanyak 3.125 ml stok akrilamid dimasukkan dalam tabung, kemudian sebanyak 2.75 ml 1M Tris-pH 8.8 juga dimasukkan. Akuabides dimasukkan sebanyak 1.505 ml. SDS 10% kemudian dimasukkan sebanyak 75 ml. Sebanyak 6.5 ml TEMED dimasukkan, kemudian tabung ditutup dan digoyang secara perlahan. APS 10% dimasukkan sebanyak 75 ml, tabung. Homogenisasi dilakukan dengan *pipeting*. Larutan segera dituang ke dalam *plate* pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara), hingga batas yang terdapat pada *plate*. Akuades perlahan ditambahkan di atas larutan gel dalam *plate* sehingga permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan di antara batas air dan gel yang terbentuk). Air yang menutupi *separating gel* selanjutnya dibuang. Bila *separating gel* telah memadat, *stacking gel* 3% disiapkan dengan cara yang sama, tetapi dengan volume larutan yang meliputi : 30% *acrylamide-bis* sebanyak 0.45 ml, 1 M Tris-pH 6.8 sebanyak 0.38 ml, akuabides sebanyak 2.11 ml, 10% SDS sebanyak 30 ml, TEMED sebanyak 5 ml, dan 10% APS sebanyak 30 ml. Setelah *stacking gel* dimasukkan, maka selanjutnya sisiran diletakkan di atasnya (Alberts *et'al*, 1994).

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bagian bawah gel terendam. Gelembung udara yang mungkin terbentuk pada dasar gel atau di antara sumur sampel harus dihilangkan. Sampel dimasukkan ke dalam dasar sumur gel secara hati-hati menggunakan Hamilton *syringe*.

Syringe dibilas sampai tiga kali dengan air atau dengan *running buffer* sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* untuk memulai *running*. *Running* dilakukan pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai 0.5 cm dari dasar gel. Bila *running* telah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*.

Tahapan ini memerlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas *band protein* yang terbentuk. Larutan *staining* 1 liter terdiri atas *Coomassie Blue R-250* sebanyak 1.0 g, metanol sebanyak 450 ml, akuades sebanyak 450 ml dan asam asetat glasial sebanyak 100 ml. Larutan destaining 1 liter terdiri atas metanol sebanyak 100 ml, asam asetat glasial sebanyak 100 ml, dan akuades sebanyak 800 ml. Gel direndam dalam 20 ml *staining solution* sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, larutan staining dituang kembali pada wadahnya. Gel direndam dalam 50 ml *destaining solution* setelah dicuci dengan air beberapa kali, sambil digoyang selama kurang semalaman atau sampai *band protein* terlihat jelas.

3.7. Prosedur Uji Lowry

Larutan protein standar (BSA 250 µg/mL) dan dH₂O dicampurkan dengan jumlah tertentu dalam tabung reaksi sehingga diperoleh berbagai konsentrasi antara 20-200 mg dalam larutan standar 1 mL. Ke dalam tabung lain dicampurkan juga sampel protein dan dH₂O sehingga volume total larutan sampel 1,0 mL. Kemudian larutan biuret 5 mL ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi larutan protein (standar dan sampel) dan segera dikocok dengan alat *vortex mixer*. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu kamar tepat 3 menit. Untuk menghitung waktu reaksi digunakan *stopwatch*, dan waktu dihitung saat menambahkan larutan Biuret. Agar waktu reaksinya seragam untuk setiap sampel, maka ketika menambahkan larutan Biuret pada tabung selanjutnya (misalnya antara tabung ke 1 dan tabung ke 2) diberikan selang waktu tertentu. Kemudian pada menit ke-5 sebanyak 0,5 mL reagen Folin ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan segera dikocok menggunakan alat *vortex*. Larutan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit setelah penambahan reagen Folin. Serapan masing-masing larutan diukur tepat pada menit ke-15 yang ditetapkan pada panjang gelombang 750 nm (Lowry 1951).

3.8. Metode Spektrofotometer

Deteksi absorbansi dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer yang ada di Laboratorium Bioproses. Berikut ini adalah prosedur dari spektrofotometer.

1. Menyiapkan sampel yang akan diuji
2. Mengeset panjang gelombang pada angka 750
3. Menunggu sekitar 10 menit untuk stabilisasi alat
4. Memasukkan larutan standar pada kuvet
5. Memasukkan kuvet kaca yang berisi larutan standar dalam alat spektrofotometer
6. Mengeset absorbansi pada titik 0
7. Memasukkan kuvet kaca yang berisi sampel yang akan diuji pada tempat sampel.
8. Mencatat nilai absorbansi yang terekam di alat spektrofotometer.

Alat ini banyak bermanfaat untuk penentuan konsentrasi senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi pada daerah ultraviolet (200 – 400 nm) atau daerah sinar tampak (400 – 900 nm) (Sastrohamidjojo, 1991). Analisis ini dapat digunakan yakni dengan penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur. Prinsip penentuan spektrofotometer adalah aplikasi dari Hukum Lambert-Beer, yaitu: $A = -\log T = -\log I_t / I_o = \epsilon \cdot b \cdot C$

dengan :

- A = Absorbansi dari sampel yang akan diukur
- T = Transmittansi
- I_o = Intensitas sinar masuk
- I_t = Intensitas sinar yang diteruskan
- ϵ = Koefisien ekstingsi
- b = Tebal kuvet yang digunakan
- C = Konsentrasi dari sampel

Berdasarkan persamaan diagram di atas maka nilai absorbansi berkisar dari 0 hingga 1, tetapi dapat pula lebih tinggi dari itu. Absorbansi 0 pada suatu panjang gelombang artinya tidak ada sinar dengan panjang gelombang tertentu yang diserap. Intensitas berkas sampel dan pembanding sama, jadi perbandingan I_o/I_t adalah 1. \log_{10} dari satu adalah nol. Absorbansi 1 terjadi ketika 90 % sinar pada suatu panjang gelombang diserap.

Kondisi berikut adalah keabsahan dari hukum Lambert-Beer : Cahaya yang digunakan harus monokromatis, bila tidak maka akan diperoleh dua nilai absorbansi pada dua panjang gelombang. Hukum tersebut tidak diikuti oleh larutan yang pekat, konsentrasi lebih tinggi untuk beberapa garam tidak berwarna akan mempunyai efek absorpsi yang berlawanan. Larutan yang bersifat memancarkan pendar-fluor atau suspensi tidak selalu mengikuti hukum Beer. Jika selama pengukuran pada larutan encer terjadi reaksi kimia seperti polimerisasi, hidrolisis, asosiasi atau disosiasi, maka hukum Beer tidak berlaku.

3.9. Uji Aktivitas Kaseinolitik

Enzim protease pada papain (getah pepaya) dapat mendegradasi ikatan amida pada protein globular. Metode kaseinolitik merupakan suatu metode untuk menguji aktivitas protease yang menggunakan kasein (protein susu) sebagai substrat. Pada uji kaseinolitik, sampel enzim direaksikan dengan substrat kasein pada suhu, pH, dan lama waktu tertentu. Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan larutan TCA (trikloroasetat) sehingga enzim dan sisa substrat terdenaturasi, kecuali produk-produk peptida (*patent Office London no. 1078,838*).

Produk-produk peptida yang larut dalam campuran reaksi tadi dipisahkan dengan cara sentrifugasi menggunakan alat sentrifugasi klinis dan ditentukan serapannya dengan menggunakan metode-metode pengukuran serapan protein (seperti metode Anson di 650 nm dan metode pengukuran serapan di 280 nm). Aktivitas protease dari sampel yang ditentukan sebanding dengan serapan yang terukur.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Prosedur Penelitian

Teknik isolasi dan pemurnian dari enzim *fosfolipase* ini merujuk pada sebuah metode yang sebelumnya (*The patent Office London no. 1078,838*) yang telah berhasil digunakan untuk mengisolasi enzim protease dari getah buah pepaya. Kemudian dari artikel "*Chaperone function in organic co-solvents: Experimental characterization and modeling of a hyperthermophilic chaperone subunit from Methanocaldococcus jannaschii*" (Bergeron, 2007) diketahui bahwa protein enzim yang kuat pada suhu tinggi ternyata mampu bertahan untuk tidak terdenaturasi dengan pelarut organik. Sehingga dalam penelitian ini, digunakan teknik isolasi protein enzim dengan menggunakan metode pengendapan pelarut etanol yang merupakan pelarut organik pada konsentrasi 80%. Hal ini dikarenakan enzim fosfolipase merupakan suatu enzim yang tahan terhadap panas hingga 75° C serta teknik pengendapan yang digunakan merupakan teknik yang paling sederhana baik dari segi pengadaan alat, biaya operasional bahan serta waktu pengerjaan.

Pengendapan disebabkan karena adanya gugus NH₂, NH, OH, CO dalam protein, yang dapat mengikat (hidratasi) sehingga protein kehilangan air. Pada saat itu protein akan mempunyai kelarutan yang paling kecil dan mudah untuk diendapkan. Namun protein yang diendapkan dengan cara ini tidak mengalami perubahan dalam struktur kimia dan dapat dilarutkan kembali dengan mudah dalam air. Proses pengendapan ini akan paling baik terjadi pada titik isoelektriknya.

Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi : preparasi sampel dari *A. planci*, Penambahan larutan fosfat *buffer* pH 7 ke dalam sampel duri dengan perbandingan 1 : 1, sonikasi selama 2 x 8 menit, memfiltrasi hasil sonikasi dengan menggunakan *vakum filtration* pada kertas saring *whatman 42*, dan kemudian mengambil filtrat tersebut untuk diendapkan bersama etanol hingga konsentrasi campuran menjadi 80% dan didiamkan selama 24 jam.

Setelah ditunggu selama 24 jam maka terjadi pengendapan pada larutan tersebut. Bagian bawah dari larutan tersebut kemudian diambil dan dilakukan sentrifugasi 13.000 g (8600 Rpm) selama 30 menit hingga terjadi padatan dibawahnya. Padatan tersebut kemudian diambil dan dilarutkan kembali dengan fosfat *buffer* pH 7 secukupnya kemudian dilakukan

sonikasi 13.000 g selama 30 menit kembali untuk dilakukan pengambilan supernatan dari larutan tersebut yang mengandung protein enzim *fosfolipase* dengan tingkat kemurnian tinggi. Kemudian pada sampel enzim tersebut dilakukan uji aktifitas *fosfolipase*, SDS-PAGE, dan metode Lowry.

Dalam proses pemurnian enzim, baik pH, temperatur, kualitas air, maupun faktor – faktor yang berhubungan dengan penyimpanan enzim menjadi hal yang sangat menentukan dalam keberhasilan proses. Pemilihan buffer juga menjadi salah satu hal penting dalam menjaga kualitas hasil dalam isolasi protein.

Dalam isolasi enzim ini digunakan larutan dengan pH optimum dari enzim yang ingin diisolasi dengan tujuan agar struktur protein tersier yang diinginkan berada dalam keadaan yang paling stabil dan mempunyai aktifitas yang tinggi. Pada pH optimum ini, gugus pemberi atau penerima proton yang penting pada sisi katalitikenzim atau sisi pengikatan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan sehingga substrat lebih mudah berinteraksi dengan sisi katalitik enzim.

Air yang digunakan pun harus terbebas dari ion dan steril dari mikroorganisme yang dapat mengganggu stabilitas enzim. Sebab ion –ion tertentu berjenis logam dapat mengganggu stabilitas dan aktivitas enzim serta dapat mekurangi kapasitas membufferkan ion hidrogen (Bollag, 1996)

4.1.1 Tahap Isolasi Papain sebagai Kontrol Positif

Sebelum dilakukan penelitian untuk mengisolasi protein dari duri bintang laut *A.planci*, dilakukan isolasi enzim protease dari getah pepaya dengan merujuk pada *The patent Office London no. 1078,83*. Metode ini dilakukan dengan cara merendam serbuk getah pepaya dalam larutan etanol analytical grade 99,9% hingga konsentrasi etanol menjadi 80% dan ditunggu hingga terbentuk endapan selama 24 jam. Dari hasil percobaan dapat dilihat bahwa terbentuk endapan berwarna putih. Endapan itulah yang merupakan sampel enzim protease yang di uji aktivitasnya.

4.1.2 Tahap Uji Kaseinolitik Papain

Dalam getah pepaya mengandung enzim protease yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi protein seperti kasein. Pada pengujian ini, sejumlah sampel enzim dari isolasi

pepaya menggunakan etanol direaksikan dengan substrat kasein dalam suhu 25°C selama 10 menit. Reaksi enzim-substrat menghasilkan produk – produk peptida yang larut dan stabil sehingga untuk menghentikan reaksi, kedalam masing masing tabung ditambahkan TCA 10% (b/v) yang menyebabkan protein enzim dan sisa substrat kasein terdenaturasi dan membentuk agregat yang berupa gumpalan – gumpalan besar berwarna putih yang dapat dengan mudah dipisahkan. Agar proses pemisahan ini berjalan dengan lebih baik lagi, campuran enzim-substrat tersebut di sentrifugasi selama 30 menit. Produk produk peptida yang terbentuk terdapat dalam fraksi supernatannya.

Prinsip dasar dari pengujian aktivitas kaseinolitik ini adalah menggunakan metode Anson, yaitu dengan menambahkan reagen folin yang mampu mendeteksi residu residu tirosin dalam protein karena gugus – gugus fenolik dalam residu tersebut akan mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat menjadi tungstem dan molibdenum berwarna biru yang menunjukkan puncak serapan pada daerah merah dari spektrum sinar tampak.

Dalam penelitian ini, uji aktivitas kaseinolitik hanya dijadikan sebagai control positif dari percobaan sehingga pengujian yang dilakukan hanya bersifat kualitatif. Terjadinya aktivitas enzim dibuktikan dengan menjadi keruhnya larutan substrat dengan membandingkannya pada larutan blanko dimana pada larutan blanko tersebut aktivitas enzim ditiadakan dengan mencampurkan TCA terlebih dahulu sebelum dimasukan sampel enzim. Berikut merupakan hasil foto dari penelitian yang telah dilakukan.



Gambar 4.1. Foto Hasil Uji Aktivitas *Kaseinolitik*
Larutan 1 blanko, 2 dan 3 Sampel Enzim

Larutan 1 merupakan larutan blanko dengan komposisi : substrat kasein ditambah aquades kemudian TCA, sampel enzim *protease*, NaOH dan reagen folin. Sedangkan larutan 2 dan 3 dengan komposisi yang sama namun proses pencampurannya berbeda dengan larutan 1, yaitu 1 ml larutan kasein 1% ditambahkan 0,35 ml aquades ditambah 0.05 ml sampel enzim ditunggu sampai 10 menit untuk bereaksi kemudian diberikan TCA untuk menghentikan reaksinya kemudian ditambahkan NaOH untuk menetralkan pH dan terakhir reagen folin.

4.1.3 Tahap Preparasi Sampel

Untuk memulai tahap isolasi, bintang laut *A.Planci* dikeluarkan dahulu dari lemari es dan ditunggu hingga keadaannya tidak membeku lagi (kurang lebih 12 jam) sehingga durinya dapat dipotong dengan menggunakan gunting. Pada tahap pemotongan duri dengan menggunakan gunting, peneliti memakai sarung tangan agar dapat meminimalisir tertusuk duri beracun bintang laut *A.planci*. dalam proses pemotongan ini hal yang penting diperhatikan adalah duri yang dipotong harus hanya bagian durinya saja, tidak boleh ada bagian lain seperti kulit dan daging dari *A.Planci* yang ikut terambil karena hal itu akan mengakibatkan terambilnya juga protein lain yang tidak diinginkan.

Setelah semua duri tergantung maka langkah selanjutnya adalah membersihkan duri – duri tersebut dengan menggunakan air aquades untuk memisahkannya dari pengotor yang terbawa seperti kotoran, pasir laut dll. Setelah itu, duri – duri tersebut direndam dengan menggunakan larutan fosfat buffer pH 7. Dalam penelitian ini dilakukan 3 kali percobaan dengan 3 variasi komposisi perbandingan duri dengan fosfat buffer, yaitu 1:2, 1:1 dan 3:2.

4.1.4 Tahap Sonikasi

Tahap sonikasi merupakan salah satu langkah penting dalam pengisolasian protein. Dalam langkah ini racun dari duri bintang laut *A.planci* dikeluarkan dengan cara merusak sel durinya sehingga dihasilkan crude venom. Sebelum dilakukan sonikasi, batang sonikator harus dibersihkan dengan menggunakan alkohol 90% dan kemudian membilasnya dengan aquades hingga bersih dan mengeringkannya dengan tissue. Hal ini dilakukan untuk mencegah adanya bakteri dan mikroorganisme ataupun pengotor lainnya dalam batang sonikator tersebut.



Gambar 4.2. Sonikator

Sonikasi dilakukan selama 2x 8 menit dengan intensitas 80% (42.5 Mega Hertz) mode push on off. Pada proses ini cenderung untuk menghasilkan panas yang dapat merusak enzim dalam protein yang ingin kita isolasi sehingga untuk menghindari terjadinya panas yang berlebihan maka disekitar wadah diberikan es batu sebagai media pendingin. Penjagaan suhu sangat penting sekali dalam proses isolasi enzim untuk mencegah rusaknya protein enzim tersebut.

4.1.5 Tahap Filtrasi

Setelah dilakukan sonikasi dan didapatkan crude venom maka langkah selanjutnya adalah menyaring crude tersebut agar diperoleh crude dengan tingkat kejernihan yang lebih tinggi. Dalam penelitian ini, penyaringan dilakukan dengan menggunakan pompa vakum agar proses penyaringan dapat berlangsung lebih cepat daripada dengan penyaringan biasa dan juga suhunya pun dapat terjaga dengan menggunakan penyaringan vakum ini. Untuk kertas saring digunakan kertas saring whatman 42.



Gambar 4.3. Filtrasi Vakum

Dalam tahapan ini, karena menggunakan kertas saring whatman 42 yang ukuran porinya relatif sangat kecil sehingga proses penyaringan memakan waktu sekitar 15 – 20 menit maka air yang digunakan dalam pompa vakum di ganti secara berkala setiap 5 menit untuk menghindari terjadinya panas yang berlebihan. Dalam proses ini dihasilkan filtrat crude venom dengan tingkat kejernihan yang tinggi.

4.1.6 Uji Aktivitas Anti-Coagulant

Dalam sebuah journal berjudul “*Analysis for Sites of Anticoagulant Action of Plancinin, a New Anticoagulant Peptide Isolated from the Starfish Acanthaster planci, in the Blood Coagulation Cascade*”, Tomoyuki Koyama, diketahui bahwa ternyata dalam racun yang terkandung dalam duri *A.planci* juga mengandung suatu zat anti pembekuan darah. Sehingga untuk membuktikan apakah proses sonikasi pada duri tersebut berhasil mengeluarkan racun yang terkandung di dalamnya maka dilakukanlah uji aktivitas *anti-coagulant* ini. Dan dari percobaan yang dilakukan ternyata membuktikan bahwa ternyata proses sonikasi tersebut berhasil mengeluarkan racun dalam duri *A.Planci*. Berikut dibawah ini adalah foto hasil penelitian yang telah dilakukan.



Gambar 4.4. Hasil Pengamatan Aktivitas Antikoagulan. (1)darah, (2)darah dengan bufer fosfat, (3)darah dengan racun

Pada gambar diatas, gambar nomor 1 adalah sampel darah saja tanpa dicampur apapun sehingga dalam waktu beberapa saat saja darah tersebut langsung mengalami penggumpalan. Gambar nomor 2 adalah sampel darah yang dicampur larutan buffer, darah tetap menggumpal, sedangkan bufer tidak menggumpal. Sedangkan gambar nomor 3,4,5 berturut turut adalah sampel darah yang ditambahkan dengan *crude venom* hasil sonikasi, blender dan kombinasi keduanya, menunjukkan adanya proses anti penggumpalan yang disebabkan oleh enzim dalam venom tersebut.

4.1.7 Tahap Isolasi

Setelah dihasilkan filtrate dengan tingkat kejernihan tinggi, maka langkah selanjutnya adalah pencampuran dengan larutan etanol untuk memisahkan protein yang ingin diisolasi dari larutan crude secara keseluruhan. Tahap ini dilakukan dengan cara menambakan etanol analitical grade 99,9% ke dalam filtrate sehingga konsentrasinya etanol menjadi 80% dan didiamkan selama 24 jam. Setelah ditunggu selama 24 jam, terlihat bahwa dilapisan bawah larutan terbentuk endapan – endapan putih yang merupakan protein enzim yang ingin kita pisahkan. Penting untuk digarisbawahi pada tahapan ini, setelah dilakukan pencampuran etanol, larutan tersebut harus langsung ditutup dengan menggunakan plastik wrap. Hal ini dikarenakan sifat fisik etanol yang sangat mudah menguap pada suhu lingkungan. Pada tahap ini juga, larutan etanol + crude 80% ditaruh di dalam lemari pendingin dengan tujuan untuk mempercepat proses pengendapan.

4.1.8 Tahap Sentrifugasi

Sentrifugasi dilakukan untuk memperoleh pengendapan sempurna dari larutan dengan cara memutar pada kecepatan tinggi larutan yang ingin diendapkan. Hal ini dilakukan karena ternyata pada proses sebelumnya, tidak dapat diperoleh pengendapan yang dapat dengan mudah dipisahkan dari pelarut etanol. Proses ini dilakukan dengan cara membuang bagian atas larutan etanol 80% tadi dan mengambil hanya di bagian bawah yang mulai terbentuk lapisan endapan berwarna putih. Kemudian lapisan endapan berwarna putih tersebut di sentrifugasi dengan kecepatan 13000 g selama 30 menit sehingga terbentuk padatan berwarna kecoklatan didasar. Padatan tersebut kemudian diambil dan dicampurkan kedalam larutan phospat buffer pH 7 secukupnya hingga terbentuk suatu larutan baru yang homogen.



Gambar 4.5. Alat Sentrifugasi

Larutan tersebut kemudian di sentrifugasi lagi dengan kecepatan 13000 g selama 30 menit. Namun pada tahapan ini yang diambil adalah bagian supernatannya (larutan bagian atas) bukan bagian gumpalan di bagian bawah. Hal ini dikarenakan gumpalan yang berada di bagian bawah diartikan sebagai protein yang sudah tidak dapat larut karena sudah terjadi denaturasi sedangkan yang larut dalam buffer masih merupakan protein enzim yang memiliki aktivitas tinggi. Pada tahapan ini diperoleh sampel enzim yang diinginkan untuk kemudian dilakukan pengujian aktivitas, kemurnian dan kandungan protein di dalamnya.

4.2 Analisis Hasil

4.2.1 Tahap Uji Aktifitas *fosfolipase*

Proses pengujian aktivitas dalam suatu metode isolasi protein enzim mutlak harus dilakukan. Pengujian aktifitas *fosfolipase* bertujuan untuk memeriksa apakah *fosfolipase* dari ekstrak yang dihasilkan masih memiliki aktivitas enzim atau tidak. Tahapan proses ini dilakukan dengan cara mengukur kejernihan suspensi kuning telur, sesuai dengan metode Marinetti (1965). Kuning telur mengandung fosfotidilkolin yang akan bereaksi dengan PLA_2 membentuk 1-asil-gliserofosfokolin dan asam karboksilat. Sehingga dengan penambahan enzim fosfolipase- A_2 akan menjernihkan suspensi kuning telur dari serapan panjang gelombang 900 nm. Satu unit enzim didefinisikan sebagai pengurangan 0,01 abs/menit, pengurangan dilakukan pada inisial waktu 5 menit.

Metode ini dilakukan dengan cara memasukan 0,1 ml larutan sampel enzim lalu ditambahkan 1,5 ml suspensi kuning telur yang dibuat dari 0,1 M Tris-HCl bufer pH 8.0 pada konsentrasi 2 mg kuning telur/ml. Kemudian dilakukan pengukuran nilai absorbansi pada 900 nm campuran pada menit ke 0 dan menit kelima. Satu unit enzim di definisikan sebagai aktivitas yang menyebabkan pengurangan 0,01 absorbansi/menit.mg.

Dalam penelitian ini dilakukan percobaan tiga kali pengujian aktivitas enzim *fosfolipase* (PLA2). Pada percobaan I, sampel yang digunakan adalah crude venom yang hanya dilakukan sonikasi saja. Penurunan absorbansi pun sudah terjadi dari crude venom ini sehingga penelitian ini kemudian dilanjutkan untuk mengisolasi enzim *fosfolipase* dari crude tersebut untuk mendapatkan enzim dengan tingkat kemurnian yang tinggi sehingga diharapkan penurunan nilai absorbansinya pun akan lebih tinggi dan stabil untuk setiap percobaan yang dilakukan.

Pada percobaan II dan III dilakukan pengujian aktivitas *fosfolipase* dengan mencampurkan crude venom hasil sonikasi dengan larutan etanol *analytical grade* 99% hingga konsentrasi larutan menjadi 80% etanol dan menunggunya selama 24 jam hingga terbentuk endapan. Oleh karena endapan yang terbentuk tidak terlalu jelas maka dilakukan proses sentrifugasi pada larutan di bagian bawah sehingga terbentuk seperti gumpalan (endapan berbentuk padatan) pada akhir proses sentrifugasi. Kemudian gumpalan tersebut diambil dan dilarutkan dalam bufer fosfat 5 ml kemudian dilakukan lagi sentrifugasi 13000 g selama 30 menit dan diambil pada bagian supernatannya saja (endapannya dibuang). Sentrifugasi kedua ini dilakukan dengan tujuan agar protein yang terambil adalah protein yang terlarut dan belum terdenaturasi. Berikut dibawah ini merupakan tabel penurunan rata – rata nilai absorbansi pada percobaan yang dilakukan.

Tabel 4.1 Penurunan Nilai Absorbansi Uji Aktivitas *Fosfolipase*

t (min)	Absorbansi Larutan Substrat		
	Percobaan I	Percobaan II	Percobaan III
0	0.2813	0.224	0.357
5	0.2556	0.106	0.306

4.2.2 Tahap Uji Metode Lowry

Metode Lowry bertujuan untuk menentukan jumlah kandungan protein di dalam sampel enzim yang dihasilkan dengan prinsip perbedaan nilai serapan dari masing-masing larutan yang diukur. Pada percobaan ini digunakan panjang gelombang 750 nm pada spektrofotometer.

Metode dalam penelitian ini menggunakan larutan protein standar (BSA 200 µg/mL) dan dH₂O dicampurkan dengan jumlah tertentu dalam tabung reaksi sehingga diperoleh berbagai konsentrasi antara 20-200 mg dalam larutan standar 1 mL. Ke dalam tabung lain dicampurkan juga sampel protein dan dH₂O sehingga volume total larutan sampel 1,5 mL. Kemudian larutan biuret 5 mL ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang berisi larutan protein (standar dan sampel) dan segera dikocok dengan alat *vortex mixer*. Dari nilai nilai absorbansi yang terbaca kemudian dibuat dalam suatu kurva dan persamaan grafik sehingga kandungan jumlah protein dalam larutan sampel dapat diketahui dengan membandingkannya pada larutan BSA yang sudah diketahui kandungan nilai proteinya.

Seperti halnya pada uji aktivitas fosfolipase, pengukuran kandungan protein dengan metode lowry ini juga dilakukan sebanyak 3 kali pengukuran, yaitu pengukuran crude venom yang dilakukan sonikasi saja (percobaan I) dan pengukuran sampel enzim yang sudah dilakukan isolasi secara lengkap sebanyak 2 kali (percobaan II dan III). Grafik nilai serapan dari tiap- tiap percobaan yang dilakukan dapat dilihat pada bagian lampiran.

Dari persamaan grafik yang diperoleh kemudian didapatkan rata – rata nilai kandungan protein dari tiap percobaan adalah sebagai berikut

Tabel 4.2 Nilai Kandungan Protein Percobaan

Percobaan	Kandungan Protein (µg/µL)
I	2.586
II	2.8466
III	2.42

4.2.3 Pengukuran aktivitas enzim per satuan berat protein

Setelah penurunan nilai absorbansi pada uji aktivitas *fosfolipase* dan kandungan nilai protein dalam sampel dengan metode lowry diketahui maka selanjutnya diukur aktivitas

enzimnya per satuan berat protein. Satu unit enzim di definisikan sebagai aktivitas yang menyebabkan pengurangan 0,01 absorbansi/menit.mg.

Proses perhitungan aktivitas enzim per satuan berat ini dilakukan dengan cara membagi nilai penurunan absorbansi larutan sampel pada setiap menitnya dengan kandungan protein dalam sampel per mg sehingga didapatkan nilai satuan unit penurunan absorbansi dalam uji *fosfolipase* tiap – tiap percobaan.

Proses detail perhitungan dapat dilihat pada bagian lampiran. Berikut dibawah ini merupakan tabel hasil perhitungan aktivitas enzim per satuan berat protein berdasarkan satuan unit yang telah dijelaskan diatas.

Tabel 4.3 Aktivitas Spesifik PLA₂

Sampel	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purity Level</i>
Percobaan I	7.9381	1
Percobaan II	33.07	4.16
Percobaan III	39.8760	5.02

Jika dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang telah berhasil memurnikan enzim PLA₂ dari berbagai macam spesies dan kromatografi akan terlihat bahwa metode ini belum begitu efektif, seperti yang dilakukan oleh Kazuo Shiomi dan kawan-kawannya (1997) mengenai karakterisasi enzim PLA₂ dari spesies yang sama (*Acanthaster planci*) setelah dimurnikan didapatkan kemurnian yang sama sebanyak 20 kali lipat (AP-PLA₂-II). Terlihat pada tabel dibawah aktivitas spesifik setelah melalui berbagai macam kolom kromatografi didapatkan AP-PLA₂-I 7830 units dan AP-PLA₂-II 16.600 units.

Tabel 4.4 Hasil Pemurnian PLA₂ *A.planci* (Shiomi, 1997)

Step	Protein (mg)	Specific PLA activity (units/mg)
Crude toxin	4820	830
CM-cellulose	4420	860
Phenyl Sepharose CL-4B		
PLA-I fraction	190	2470
PLA-II fraction	111	1550
AP-PLA-I		
Sephacryl S-200	31	2780
TSKgel Phenyl 5PW-RP	3.4	7830
AP-PLA-II		
Superose 12	6.3	15800
TSKgel ODS-120T	3.5	16600

Perbandingan terhadap penelitian lain yang berhasil memurnikan enzim PLA₂ dari spesies bintang laut *Plazaster borealis* (Koyama *et al.*, 2004) didapatkan kemurnian sebanyak 12 kali lipat setelah melewati tahap-tahap kromatografi.

Tabel 4.5 Hasil Pemurnian PLA₂ Racun Bintang Laut *Plazaster borealis* (Koyama, 2004)

Step	Protein (mg)	Total Activity (X 1000 U)	Spesifik Activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude Enzyme Solution	23500	438	19	1	100
Sephacryl S-200	4400	78	18	1	18
DEAE-Cellulose	600	38	63	3	9
Sephadex G-50	103	24	230	12	5

One minute of activity was defined as the microgram of phosphatidylcoline hydrolyzed per minute

- DEAE : Diethylaminoethyl

Spesies lain yang mempunyai kandungan enzim PLA₂ dari racunnya adalah ular berbisa *Echis ocellatus* (Sallau *et al.*, 2008) berhasil dimurnikan dengan tingkat kemurnian 13,50 kali dari racun kasarnya.

Tabel 4.6 Hasil pemurnian PLA₂ Racun *Echis ocellatus* (Sallau,2008)

Step	Protein (mg)	Total Activity $\mu\text{mol}/\text{min}$	Spesifik Activity $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Purity (fold)	Yield (%)
Crude	6.7	16	2.39	1	1
Ion Exchange on DEAE-Cellulose	1.2	8	6.67	2.8	50
Gel filtration on Sephadex G-75	0.43	13.87	32.26	13.5	86.69

Spesies ular kobra India *Naja naja* juga mempunyai racun dengan kandungan enzim PLA₂ yang dimurnikan dengan tingkat kemurnian tertinggi pada fraksi NND-IV sebanyak 13,6 kali lipat. Penelitian ini dilakukan oleh Satish dan kawan-kawannya (2004).

Tabel 4.7 Hasil Pemurnian PLA₂ Racun Kobra India Timur (Satish, 2004)

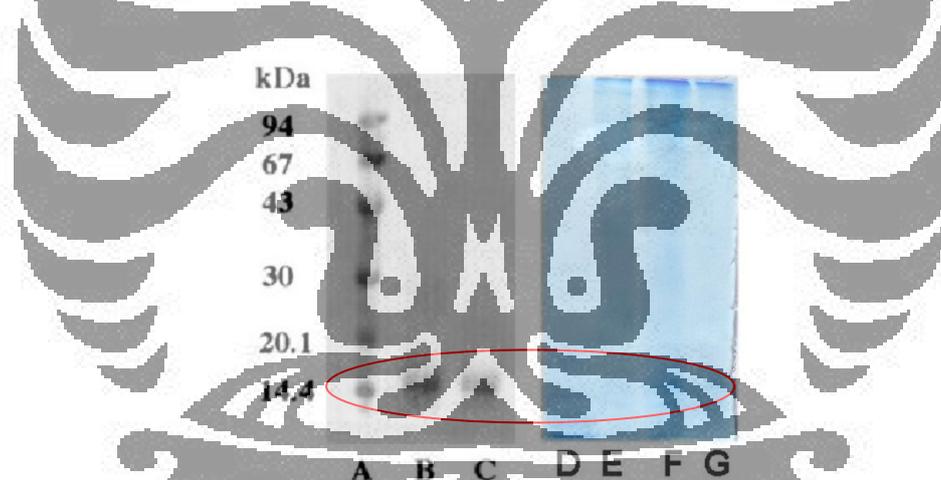
Step	fraction	Total Protein (mg)	Total Activity (μmol fatty acid/min)	Spesific activity (μmol fatty acid/min/mg)	Yield	Activity
CM-Sephadex C-25	Whole Venom	200	515	2.5	100	100
	NN-1	26	453.2	17.4	13	88
DEAE-Sephadex A-50	NN-I	15	261	17.4	100	100
	NND-I	0.16	0.08	0.5	1.13	0.03
	NND-II	1.65	3.79	2.3	11	1.45
	NND-III	2.91	55.2	18.9	19.4	21.14
	NND-IV	6.045	205	34	40.3	78.54

Dari ketiga percobaan yang telah dilakukan, membuktikan bahwa proses isolasi enzim *fosfolipase* dari crude venom ini dapat menaikkan nilai aktivitas enzim secara signifikan dengan *Purity Level* sekitar 5 kali lipat dari nilai aktivitas crude venom tanpa dilakukan isolasi. Walaupun nilai *Purity Level* tergolong kecil namun proses yang dilakukan sangat sederhana dengan biaya operasional yang jauh lebih kecil.

4.2.4 Tahap Uji SDS-PAGE

SDS-PAGE dilakukan untuk menguji tingkat kemurnian protein dari ekstrak yang dihasilkan. Prinsip dari pengujian ini adalah protein memiliki muatan positif atau negatif yang mencerminkan campuran muatan asam amino yang dikandungnya. SDS-PAGE menggunakan *cross-linked* gel poliakrilamid sebagai matriks inert di mana protein akan bermigrasi. Gel disiapkan sebelum dipergunakan namun masih dalam keadaan *fresh*. Ukuran pori gel disesuaikan sehingga cukup kecil untuk memperlambat migrasi molekul protein yang dikehendaki. Protein-protein tersebut tidak berada pada larutan biasa tetapi pada larutan yang mengandung deterjen yang bermuatan negatif sangat kuat, yakni Sodium Dodesil Sulfat (SDS). Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen (Alberts *e' al*, 1994).

Berikut merupakan hasil scanning dari percobaan SDS-PAGE yang dilakukan

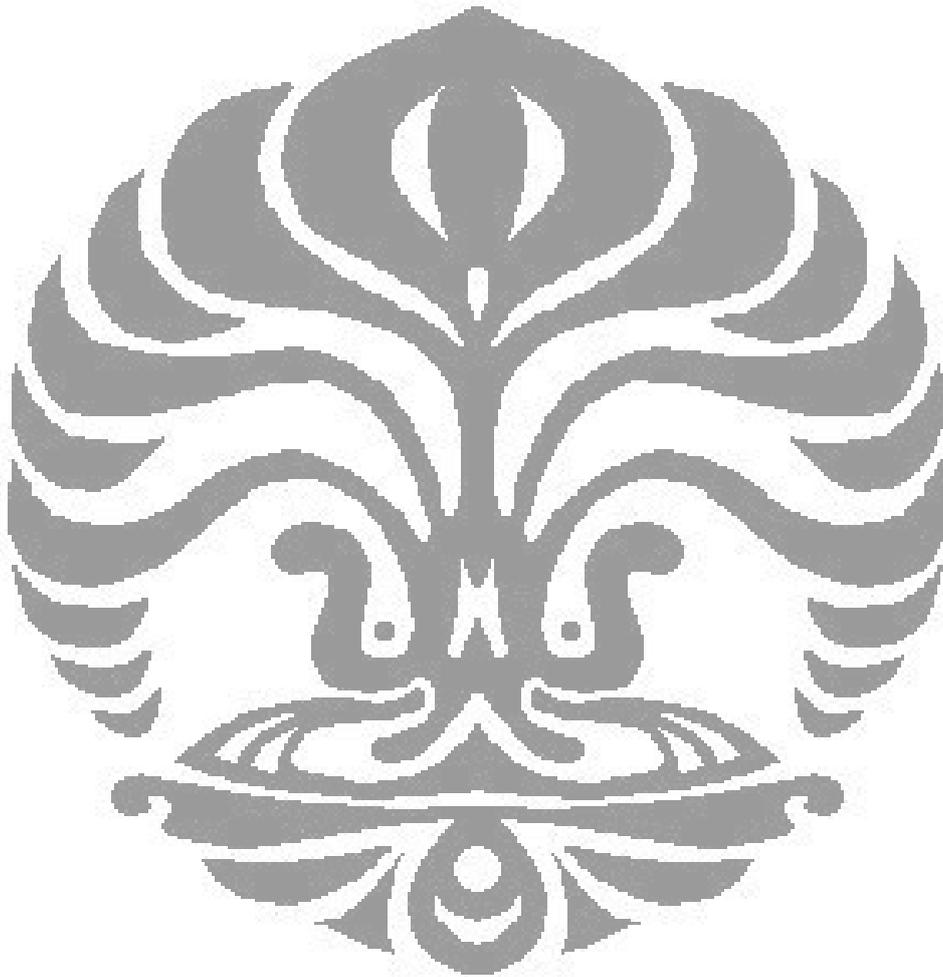


Gambar 4.6. Hasil *Scanning* SDS-PAGE

Pada gambar diatas, yang bertanda huruf A, B dan C merupakan uji SDS-Page dari artikel yang berjudul “*Purification And Properties Of Phospholipases A2 From The Crown-Of-Thorns Starfish (Acanthaster Planci) Venom*”, K. Azuo Shiomi Et'al 1997. Sedangkan D, E,F,G merupakan Uji yang dilakukan dalam penelitian ini.

Pada gambar diatas, protein sampel (marker) dalam penelitian adalah D, memiliki nilai band 10.000 dalton (garis paling bawah) dan 15.000 dalton (kedua dari bawah). Sedangkan sampel enzim yang diujikan (E,F,G) terlihat dari gambar bahwa memiliki band yang hampir sama dengan *marker* yaitu 15.000 dalton. Hal yang sama juga ditunjukkan pada hasil uji SDS

yang dilakukan Shiomi pada gambar diatas. Sehingga dari hasil percobaan dalam penelitian ini, dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa proses yang dilakukan terbukti dapat mengisolasi protein enzim *fosfolipase* dari crude venom *A.planci*. Hanya saja hasil isolasinya masih belum murni 100% karena dari gambar terlihat masih ada sedikit band lain dibagian paling atas pada gambar. Untuk mendapatkan enzim *fosfolipase* yang murni, diharapkan hasil dari isolasi yang telah dilakukan ini, diproses lebih lanjut dengan menggunakan hanya 1 kolom kromatografi.



BAB 5

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dalam penelitian yang berjudul “Isolasi enzim *fosfolipase* dari duri bintang laut *achantaster planci* menggunakan pengendapan etanol” ini adalah sebagai berikut :

1. Enzim papain yang digunakan sebagai kontrol positif metode penelitian ini berhasil diisolasi, hasilnya ditunjukkan secara kualitatif dengan sampel yang terlihat pada gambar 4.1
2. Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi : preparasi sampel, penambahan larutan phospat buffer pH 7, sonikasi, filtrasi, pengendapan dengan etanol, sentrifugasi lalu pengujian aktivitas *fosfolipase* dan tingkat kemurniannya serta kandungan proteinnya.
3. Penelitian berhasil mengisolasi enzim *fosfolipase* yang masih memiliki aktivitas dengan nilai berkisar antara 30- 39 satuan unit.
4. Protein-enzim yang kuat terhadap suhu tinggi juga ternyata kuat terhadap pelarut organik seperti etanol.
5. Penelitian ini belum berhasil memurnikan secara penuh enzim *fosfolipase* dari crude venom, sehingga diperlukan pemurnian lebih lanjut dengan menggunakan kolom kromatografi untuk mendapatkan enzim *fosfolipase* secara murni.

DAFTAR PUSTAKA

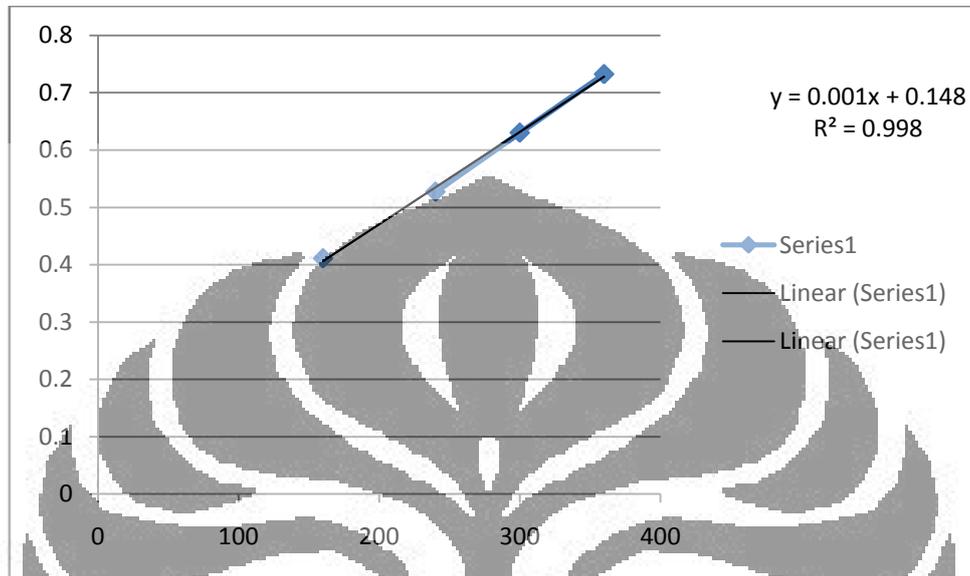
- Bergeron, L.M et al. Chaperone function in organic co-solvents: Experimental characterization and modeling of a hyperthermophilic chaperone subunit from *Methanocaldococcus jannaschii*. *science direct*. 2008 : 1784 (2008) 368–378
- Deutscher, M. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington : University of Connecticut Health Center.
- De'ath, G. and Moran P.J. 1997. *Factors affecting the behaviour of Crown-of-thorns starfish (Acanthaster planci L.) on the Great Barrier Reef: 2: Feeding Preferences*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 220(1998): 107-126.
- Moran, P. 1988. *Crown-of-thorns Starfish: Questions and Answers*. Australian Institute of Marine Sciences, Townsville MC. Queensland, Australia. pp. 11-29.
- Pratchett, M.S. 2001. *Influence of coral symbionts on feeding preferences of crown-of-thorns starfish Acanthaster planci in the western Pacific*. *Mar Ecol Prog Ser*. 214(2001): 111-119.
- Porter, J.W. 1972. *Predation by Acanthaster and its Effect on Coral Species Diversity*. *The American Naturalist*. 106(950): 487-492.
- Sahlan, M. 2002. *Eksplorasi Enzim Fibrinolitik dari Cacing Tanah Pheretima sp. Galur Lokal*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung.
- Shiomi, K., Kazama, A., Shimakura, K., Nagashima, Y., 1998. Purification and properties of phospholipases-A₂ from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon* 36, 589–599.
- Karasudani, I., Koyama, T., Nakandakari, S. and Aniya, Y. 1996. Purification of anticoagulant factor from the spine venom of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*. *Toxicon* 34, 871-879.
- Koelman J, Roehm KH, *Color Atlas Biochemistry*. 2nd ed. Marburg: Thieme, 2005.
- Koyama, N., Kishimura, H., Hayashi K. 2004. Partial purification and characteristics of phospholipase-A₂ from pyloric ceca of starfish *Plazaster borealis*. Hokkaido University.
- Lehninger, A. L., *Dasar-dasar biokimia*, Jilid 1, Maggy Thenawidjaja (Penerjemah), Penerbit Gramedia, Jakarta, 1993.
- Lowry, N.; Rosenbroug, A.; Farr; Randall, R. "Protein Measurement with the folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- Marinetti, G. V. (1965) The action of phospholipase A on lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 98, 554-565.

- Ota E, Nagashima Y, Shiomi K, *et al.* Caspase-independent apoptosis induced in rat liver cells by plancitoxin I, the major lethal factor from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom. *Toxicon*. 2006;48:1002–1010.
- Ota E, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. 2004. Molecular cloning of two toxic phospholipases A₂ from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom. Elsevier. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 143 (2006) 54 – 60.
- Phospholipase A₂ AP-PLA₂ II Precursor Acanthaster planci* (Crown of Thorns of starfish) 2010 ; Available from: www.uniprot.org/uniprot/Q3C2C1.
- Sallau A.B., Ibrahim M.A., Salihu A., Patrick F.U. Characterization of phospholipase-A₂ (PLA₂) from *Echis ocellatus* venom. Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria-Nigeria.
- Satish, S. 2004. Purification of a Class B1 platelet aggregation inhibitor phospholipase-A₂ from Indian cobra (*Naja Naja*) venom. Elsevier. University of Mysore.
- Shiomi, K., Itoh, K., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1985. Biological activity of crude venom from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 51, 1151-1154.
- Shiomi, K., Yamamoto, S., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1988. Purification and characterization of a lethal factor in venom from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*). *Toxicon* 26, 1077-1083.
- Shiomi, K., Nagai, K., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1989. Inhibitory effect of anti-inflammatory agents on cutaneous capillary leakage induced by six marine venoms. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 131-134.
- Shiomi, K., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T. and Konno, K. 1990. Liver damage by the crown-of- thorns starfish (*Acanthaster planci*) lethal factor. *Toxicon* 28, 469-475.
- Shiomi K, Midorikawa S, Ishida M, Nagashima Y, Nagai H. Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II. *Toxicon*. 2004;44:499–506.
- Skoog, D A. 1988. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. New York : Saunders College Publishing.
- Tissue, B M. *Infrared Absorption Spectrometers*. <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/spec/vib.htm> (tanggal 31 Oktober 2008)
- Tabel Properties Of Etanol.2010 ; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol>
- Underwood, A.L. dan. Day R.A, Jr. 1998. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Ed.ke-6. United States of America : Prentice-Hall, Inc.

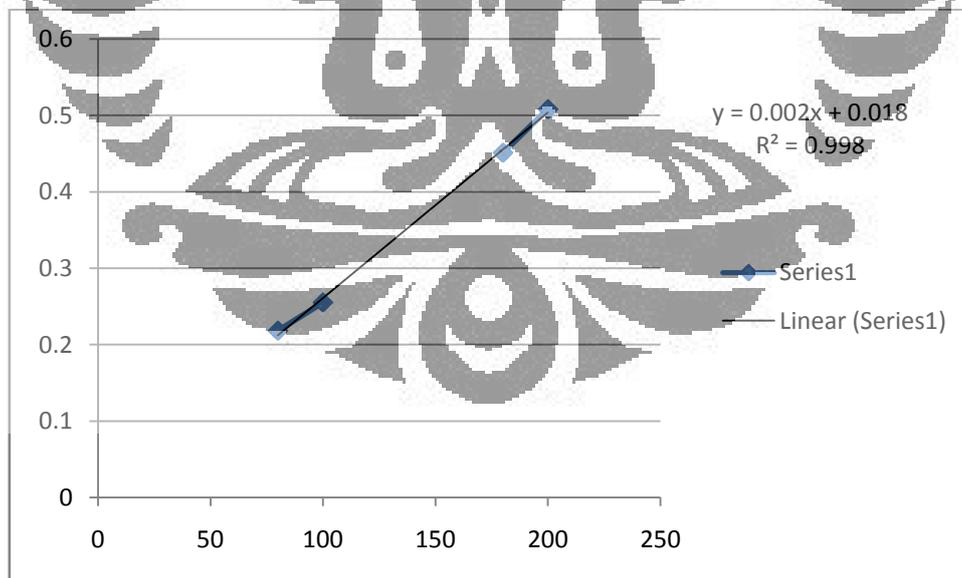
Lampiran A

Penentuan Kadar Protein Sampel

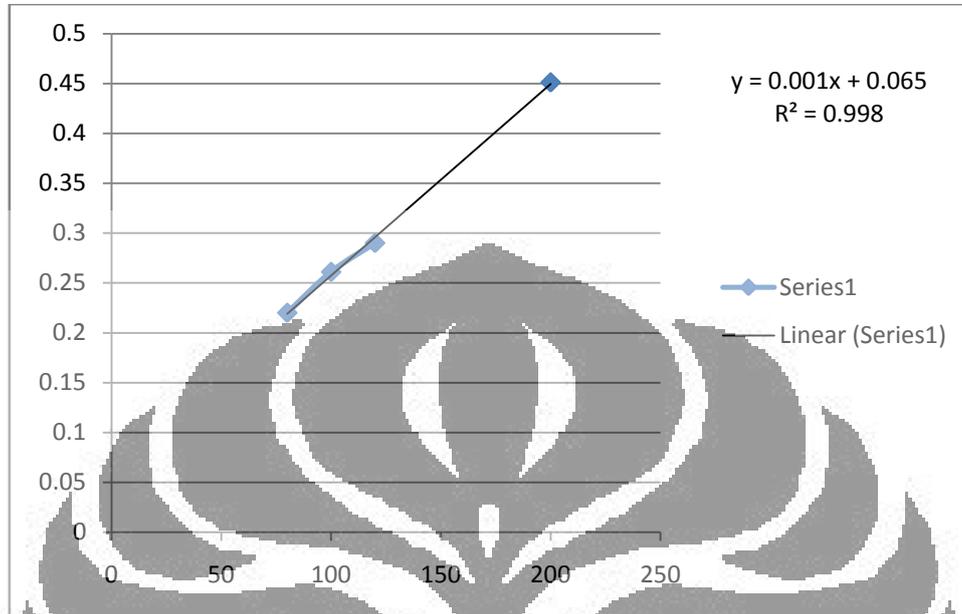
Kurva standart protein Percobaan I



Kurva standart protein Percobaan II



Kurva standart protein Percobaan III



Prosedur penentuan kadar protein pada percobaan III.

Dari gambar grafik diatas diperoleh persamaan garis $A = 0.001x + 0.065$

Dengan A_{750} adalah absorbansi protein pada panjang gelombang 750 nm dan x adalah kadar protein dalam micro gram. Kadar protein ditentukan dengan menggunakan persamaan diatas.

Nilai absorbansi pada sampel masing masing adalah 0.189, 0.186, 0.183 maka dengan dengan A_{750} untuk nilai rata – rata dari sampel adalah memiliki kadar protein 121 ug. Karena volum sampel yang diuji adalah 50 uL maka konsentrasi sampel adalah $121 \text{ Ug}/50 \text{ uL} = 2,42 \text{ mg/mL}$.

Lampiran B**Penurunan Absorbansi Uji Aktivitas Fosfolipase**Penurunan absorbansi uji aktivitas *fosfolipase* percobaan I

	Nilai Absorbansi Larutan Sampel I	Nilai Absorbansi Larutan Sampel II	Nilai Absorbansi Larutan Sampel III
Menit ke I	0,268	0,305	0,271
Menit ke V	0,242	0,282	0,243

Penurunan absorbansi uji aktivitas *fosfolipase* percobaan II

	Nilai Absorbansi Larutan Sampel I	Nilai Absorbansi Larutan Sampel II	Nilai Absorbansi Larutan Sampel III
Menit ke I	0,241	0,207	0,224
Menit ke V	0,104	0,098	0,117

Penurunan absorbansi uji aktivitas *fosfolipase* percobaan III

	Nilai Absorbansi Larutan Sampel I	Nilai Absorbansi Larutan Sampel II	Nilai Absorbansi Larutan Sampel III
Menit ke I	0,362	0,358	0,351
Menit ke V	0,311	0,302	0,305

Lampiran C

Perhitungan Aktivitas Spesifik Fosfolipase

Perhitungan Untuk Percobaan III

Unit Aktivitas Enzim(U)

Satu unit didefinisikan sebagai penurunan nilai absorbansi sebesar 0.001 absorbansi /menit mL.

Absorbansi awal	Absorbansi akhir	PENURUNAN Absorbansi	per mL	per menit	JUMLAH UNIT
0.362	0.311	0.051	51	10.2	42.14876033
0.305	0.265	0.04	40	8	33.05785124
0.351	0.305	0.046	46	9.2	38.01652893
0.358	0.302	0.056	56	11.2	46.28099174
					39.87603306

Unit Total (U)

Merupakan aktivitas keseluruhan sampel enzim fosfolipase yang didapatkan.

Contoh : aktivitas total sampel = unit aktivitas enzim X volume total sampel yang didapatkan

$$= 39,87 \text{ U} \times 20 \text{ mL} = 797,4$$

Jumlah Protein Total (mg)

Merupakan jumlah protein keseluruhan yang terdapat dalam sampel enzim fosfolipase, yang telah ditentukan sebelumnya (lampiran A) dengan metode lowry.