



**UNIVERSITAS INDONESIA**

Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A<sub>2</sub> dari *Acanthaster planci*

**SKRIPSI**

**RESPATIPHALA ARDHA SATWIKA**

**0806368143**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA**

**PROGRAM EKSTENSI**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA**

**DEPOK, NOVEMBER 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A<sub>2</sub> dari *Acanthaster planci*

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana**

**RESPATIPHALA ARDHA SATWIKA**

**0806368143**

**FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA**

**PROGRAM EKSTENSI**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA**

**DEPOK, NOVEMBER 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Respatiphala Ardha Satwika**

**NPM : 0806368143**

**Tanda Tangan :**

**Tanggal : 30 Desember 2010**



## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Respatiphala Ardha Satwika  
NPM : 0806368143  
Program Studi : S1 Ekstensi  
Judul Skripsi : Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi  
Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A<sub>2</sub>  
dari *Acanthaster planci*

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng. ( )  
Pembimbing : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng. ( )  
Penguji : Dr. Ing. Ir. Misri Gozan, M.Tech ( )  
Penguji : Ir. Dianursanti, MT ( )  
Penguji : Dr. Eny Kusriani ( )

Ditetapkan di : Departemen Teknik Kimia

Tanggal : 6 Januari 2011

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karen atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai Gelar Sarjana Teknik Kimia Jurusan Teknik Kimia pada Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA, selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
2. Prof. Anondho Wijanarko, Dr. Muhamad Sahlan, dan Ibu Imelda atas bimbingan yang telah diberikan.
3. Ibu Nunuk Widhyastuti, bu Kesi, Suri, Ninu, Neng, dan Mas Ugi yang telah memberikan kesempatan untuk belajar lebih banyak di LIPI
4. Ayah dan Ibu yang sangat ingin penulis bahagiakan. Terima kasih atas dukungan, kasih sayang, dan doa yang diberikan.
5. Dipank, Toni, dan Skripsi. Terimakasih untuk berbagi ilmu dan kebersamaannya.
6. Teman-teman Ekstensi angkatan 2008 atas kebersamaan dan pertemanannya selama ini.
7. Tim Riset Mikroalga, Biofilter, yang telah banyak mengajarkan mengenai penelitian.
8. Pihak-pihak lain yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 30 Desember 2010

Penulis

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Respatiphala Ardha Satwika  
NPM : 0806368143  
Program Studi : Ekstensi  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : Skripsi

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

**Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A<sub>2</sub> dari *Acanthaster planci***

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pengkalan 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 : 30 Desember 2010  
Yang menyatakan

(Respatiphala Ardha Satwika)

## ABSTRAK

Nama : Respatiphala Ardha Satwika

Program Studi : Ekstensi

Judul : **Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A<sub>2</sub> dari *Acanthaster planci***

Sengatan duri bintang laut *Acanthaster planci* terbukti mempunyai aktivitas biologi fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), DNase II (plancitoxin), dan peptida antikoagulan (plancinin) yang mengakibatkan banyak aktivitas biologi merugikan pada manusia seperti hemolitik, pembengkakan, myoncretic, pembentukan edema dan aktivitas antikoagulan. Penelitian ini berhasil memurnikan enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> pada spesimen duri *A. planci* sebanyak 50 gr dengan menggunakan metode sonikasi, pemanasan dan fraksinasi ammonium sulfat. Aktivitas PLA<sub>2</sub> tertinggi terdapat pada fraksi pengendapan ammonium sulfat 20% sebanyak 108,48 unit/mg dengan tingkat kemurnian 20 kali lebih besar dari *crude venom*, telah dibuktikan bahwa metode ini memberikan tingkat pemurnian yang sama dan lebih efisien jika dibandingkan dengan metode-metode yang digunakan untuk memurnikan enzim pada umumnya.

Kata Kunci : *Acanthaster planci*, sonikasi, fosfolipase-A<sub>2</sub>, fraksinasi ammonium sulfat

## ABSTRACT

Name : Respatiphala Ardha Satwika  
Study Program : Extensions  
Title : **The Combination of Sonication, Heating and Ammonium Sulfate Fractionation for Enzyme Phospholipase-A<sub>2</sub> Extraction from *Acanthaster planci***

The sting of *Acanthaster planci* thorns starfish shown to have biological activity of phospholipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), DNase II (plancitoxin), and anticoagulant peptide (plancinin) which resulted in many adverse biological activity in humans, such as hemolytic, swelling, myoncretic, edema formation and anticoagulant activity. This study succeeded in purifying the enzyme phospholipase-A<sub>2</sub> in thorns of *A. planci* specimens 50 gr by using a simple heating method and the precipitation of ammonium sulphate fractionation. The highest PLA<sub>2</sub> activity present in ammonium sulphate precipitation fraction of 20% of 108.48 units/mg with a purity level of 20.75 times greater than the crude venom, it's proven that this method provides the same level of purification and more efficient than the methods used to purify the enzyme in general.

Keyword : *Acanthaster planci*, sonication, phospholipase-A<sub>2</sub>, ammonium sulphate fractionation.

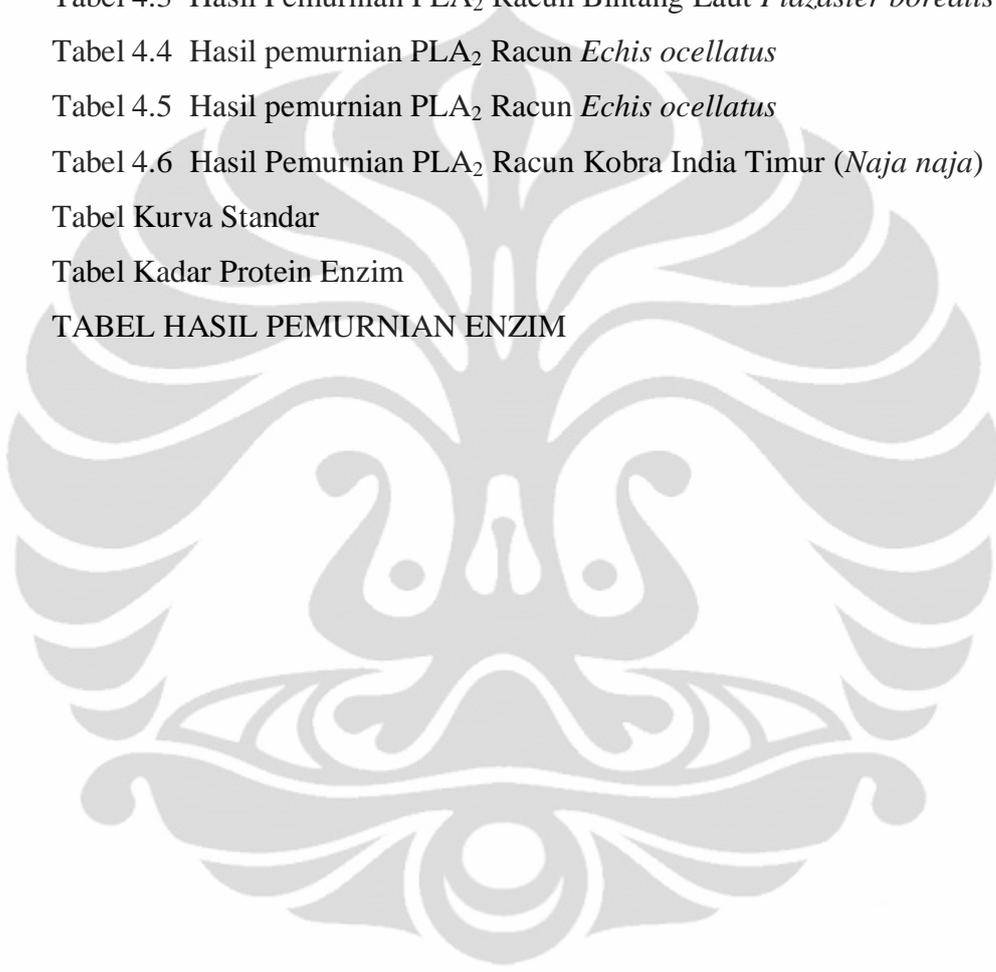
## DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	iv
ABSTRAK .....	v
ABSTRACT .....	vi
DAFTAR ISI .....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Batasan Masalah .....	2
1.5 Sistematika Penulisan .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 State Of The Arts .....	6
2.2 Prinsip Dasar Isolasi Protein .....	10
2.3 Teknik-Teknik Isolasi Protein .....	10
2.4 Sodium Dodesil Sulfat-Gel Poliakrilamid (SDS-PAGE).....	16
2.5 Fosfolipase-A <sub>2</sub> .....	18
2.6 Uji Aktivitas Fosfolipase-A <sub>2</sub> .....	18
2.7 Uji Aktivitas Kaseinolitik .....	19
2.8 Uji Kadar Protein Lowry.....	19
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>21</b>
3.1 Preparasi Sampel Protein Enzim .....	21
3.2 Fraksinasi Ammonium Sulfat.....	23
3.3 Uji Aktivitas Kaseinolitik .....	23
3.4 Uji Aktivitas Fosfolipase-A <sub>2</sub> .....	24
3.5 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry .....	24
3.6 <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS- PAGE)</i> .....	25

3.7	Bahan dan Alat .....	26
BAB IV PEMBAHASAN.....		29
4.1	Hasil Preparasi Enzim dan Pemanasan .....	29
4.2	Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan .....	30
4.3	Hasil Fraksinasi Ammonium Sulfat.....	31
4.4	Hasil Uji Aktivitas Kaseinolitik .....	32
4.5	Hasil Uji Aktivitas Fosfolipase-A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) .....	33
4.6	Hasil Uji SDS-PAGE.....	36
BAB V KESIMPULAN.....		39
DAFTAR PUSTAKA .....		41
LAMPIRAN A .....		44
Penentuan Kadar Protein Metode Lowry .....		44
	Tabel Kurva Standar .....	44
	Gambar Kurva Standar Protein BSA .....	44
Penentuan Kadar Protein Sampel .....		44
	Tabel Kadar Protein Enzim .....	45
LAMPIRAN B.....		46
Penentuan Aktivitas Spesifik PLA <sub>2</sub> .....		46
	Unit (abs/menit) .....	46
	Aktivitas Enzim (unit/ml).....	46
	Unit Total (unit).....	46
	Jumlah Protein Total (mg).....	46
	Aktivitas Spesifik (unit/mg) .....	46
	Tingkat Kemurnian Enzim .....	47

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2. STATE OF THE ARTS	6
Tabel 4.1 Aktivitas Spesifik PLA <sub>2</sub>	32
Tabel 4.2 Hasil Pemurnian PLA <sub>2</sub> Penelitian Kazuo Shiomi	34
Tabel 4.3 Hasil Pemurnian PLA <sub>2</sub> Racun Bintang Laut <i>Plazaster borealis</i>	35
Tabel 4.4 Hasil pemurnian PLA <sub>2</sub> Racun <i>Echis ocellatus</i>	35
Tabel 4.5 Hasil pemurnian PLA <sub>2</sub> Racun <i>Echis ocellatus</i>	36
Tabel 4.6 Hasil Pemurnian PLA <sub>2</sub> Racun Kobra India Timur ( <i>Naja naja</i> )	36
Tabel Kurva Standar	44
Tabel Kadar Protein Enzim	45
TABEL HASIL PEMURNIAN ENZIM	48



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Penelitian

Bintang laut *Acanthaster planci* (*crown-of-thorns*) berhabitat di perairan tropis dan subtropis memangsa polip karang, sehingga merusak terumbu karang. Bintang laut ini juga diketahui mempunyai sejumlah duri beracun di atas permukaan tubuhnya. Ketika disengat oleh duri, 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-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Shiomi *et al.*, 1985), aktivitas pelepasan histamin dari sel (Shiomi *et al.*, 1989), dan aktivitas antikoagulan (Karasudani *et al.*, 1996).

Dengan aktivitas biologi sebanyak itu dapat memberikan kontribusi besar terhadap dunia kedokteran. Aktivitas fosfolipase-A<sub>2</sub> 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. Dari hasil penelitian secara kualitatif telah ditunjukkan bahwa jenis fosfolipid membran eritrosit penderita hiperlipidemia tidak berbeda dari fosfolipid membran eritrosit normal, sedangkan dari hasil analisis kuantitatif dengan pengolahan data statistik diperoleh peningkatan kadar fosfatidilkolin dan fosfatidiletanolamin.

Maka dari itu tujuan penelitian ini adalah mengekstrak protein enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> dari duri *A. planci* menggunakan metode sederhana dengan cara sonikasi, pemanasan dan fraksinasi ammonium sulfat. Pemurnian (pemekatan) protein menggunakan ammonium sulfat adalah metode yang sering digunakan karena memiliki daya larut tinggi di dalam air, relatif murah, dan kestabilan

protein di dalam larutan ammonium sulfat (2 M – 3 M) tahan bertahun-tahun. Pemilihan ammonium sulfat didasarkan pada kelarutan protein yang berinteraksi polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan protein (pada pH dan temperatur tertentu) meningkat pada kenaikan konsentrasi garam (*salting in*). Kenaikan kelarutan protein akan meningkatkan kekuatan ion larutan. Pada penambahan garam dengan konsentrasi tertentu kelarutan protein menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak yang menyebabkan penarikan selubung air yang mengelilingi permukaan protein sehingga mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan kemudian mengendap.

Sampel protein yang telah hilang kelarutannya kemudian diendapkan dari suspensinya dengan cara sentrifugasi refrigerasi. Fraksinasi dilakukan pada 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Lalu setiap fraksi diuji aktivitasnya untuk diketahui aktivitas dari fosfolipase-A<sub>2</sub> yang tertinggi. Identifikasi enzim menggunakan SDS-PAGE. Kontrol positif metode ini menggunakan enzim papain yang diambil dari lateks pepaya dan diuji aktivitas kaseinolitiknya.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Fokus pada penelitian ini adalah apakah dengan metode sonikasi, pemanasan dan fraksinasi ammonium sulfat bisa didapatkan enzim fosfolipase-A<sub>2</sub>.

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan utama penelitian ini untuk mengetahui jumlah PLA<sub>2</sub> yang bisa didapatkan dengan fraksinasi ammonium sulfat.

## **1.4 Batasan Masalah**

Batasan masalah yang dibahas pada penelitian ini mencakup sebagai berikut.

1. Specimen bintang laut yang dipakai adalah *Acantaster planci*.
2. Target enzim protein yang diinginkan adalah fosfolipase-A<sub>2</sub>.

3. Metode pemisahan protein yang dipakai adalah metode sonikasi, pemanasan dan ammonium sulfat.
4. Pemisahan enzim protease dari papain dengan metode yang sama digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini.
5. Identifikasi enzim protein menggunakan SDS-PAGE.
6. Uji aktivitas untuk enzim protease menggunakan metode kaseinolitik (metode Anson).
7. Uji aktivitas untuk enzim fosfolipase menggunakan metode Marinetti (1965).
8. Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry.

### **1.5 Sistematika Penulisan**

Sistematika penulisan yang digunakan dalam penulisan penelitian ini adalah sebagai berikut :

#### **BAB I. PENDAHULUAN**

Bab ini terdiri dari latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

#### **BAB II. TINJAUAN PUSTAKA**

Tinjauan Pustaka berisi ulasan tentang *Acanthaster planci*, fosfolipase-A<sub>2</sub>, pemisahan protein dan uji aktivitas protein.

#### **BAB III. METODE PENELITIAN**

Metode penelitian berisi diagram alir penelitian, prosedur penelitian, alat dan bahan yang dipakai.

#### **BAB IV. PEMBAHASAN**

Menyajikan data hasil pengamatan dan pembahasannya.

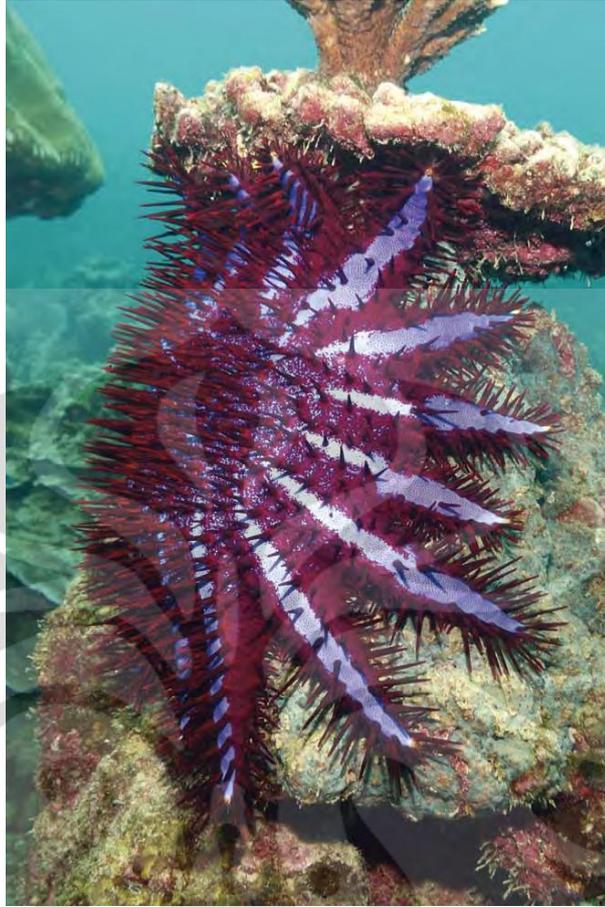
#### **BAB V. KESIMPULAN**

Berisi kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan berdasarkan data yang selama ini diperoleh.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

Bintang laut *Acanthaser planci* (*Crown of Thorns*) adalah *corallivore* (pemangsa terumbu karang) dimana kehadirannya dalam jumlah besar dapat menghancurkan ekosistem terumbu karang. Seperti bintang laut pada umumnya, *A. planci* mampu mengeluarkan perutnya yang berlipat untuk mencerna mangsanya diluar. Metode pencernaan ini bisa membuat bintang laut ini mencerna karang dengan area luas dalam waktu relatif singkat. Torehan luka berwarna putih-lah yang tersisa ketika karang telah dimangsa oleh *A. planci*. Luka bekas mangsa ini tak pernah kembali dan pada kebanyakan kasus ditumbuhi oleh alga. Fenomena ini mampu memanipulasi ekosistem dengan mengurangi spesies dan kekayaan spesies karang dan menyediakan ruang bagi alga untuk berkembang (Porter *et al*, 1972). Di lain pihak mengurangi habitat untuk kebanyakan spesies terumbu karang dan dampak negatif sistem terumbu karang.

Makanan utama *A. planci* adalah *scleractinian* atau karang pembentuk terumbu, sering juga selain makanan utamanya tersebut dia juga memangsa spesies yang bertumbuh cepat seperti *Acropora spp.* dan *Montipora* (De'ath dan Moran, 1997). Ketika *A. planci* telah diketahui salah satunya memangsa *Pocillopora spp.*, spesies karang ini bukan mangsa yang umum seperti karang yang lain dengan ukuran dan rugositas yang sama. Ini dikarenakan sebagian besar adanya simbiosis dengan invertebrata yang akan melindungi karang dari *A. planci* (Pratchett, 2001). Studi tahun 2001 yang dilakukan oleh Morgan Pratchett menemukan kepiting *Trapezia* dan spesies *Tetralia* cukup efektif melindungi karang, sehingga *A. planci* berpindah ke karang yang lain, keseringan karang yang kurang disukai untuk mencegah dirinya dari bahaya. Ketika simbiosis dengan karang berakhir, *A. planci* akan memangsa karang tersebut tanpa ragu (Pratchett, 2001).



**Gambar 2.1** *Acanthaster planci*

*A. 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. Racun diperkirakan diproduksi oleh sel asidofili pada epidermis duri. Telah ditemukan bahwa racun dari *A. planci* itu tersebut adalah enzim protein *phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 2* atau sering disebut *phospholipase-A<sub>2</sub>* ([www.uniprot.org/uniprot/Q3C2C1](http://www.uniprot.org/uniprot/Q3C2C1)) dan Dnase II.

## 2.1 State Of The Arts

**Tabel 2. STATE OF THE ARTS**

Peneliti (tahun)	Topik Penelitian	Hasil Penelitian
Shiomi (1984)	Aktivitas biologi racun duri <i>A. planci</i>	Racun ditemukan mematikan pada LD <sub>50</sub> 2,7 mg/kg
Karasudani (1995)	Aktivitas kontraksi otot dan peningkatan permeabilitas vaskular racun <i>A. planci</i>	Penyebab aktivitas kontraksi otot dan peningkatan permeabilitas disebabkan fosfolipase
Shiomi (1997)	Pemurnian dan karakterisasi fosfolipase-A <sub>2</sub> racun <i>A. planci</i>	Properti dan karakterisasi PLA <sub>2</sub> didapatkan
Koyama (1998)	Situs aktif antikoagulan racun <i>A. planci</i>	Situs antikoagulan terletak pada langkah aktivasi protrombin
Shiomi (2004)	Pemurnian plancitoxin sebagai DNase II pada racun <i>A. planci</i>	Plancitoxin sebagai faktor mematikan pada racun merupakan DNase II
Ota (2005)	Pengkloningan molekul racun fosfolipase-A <sub>2</sub> <i>A. planci</i>	Dua jenis PLA <sub>2</sub> berhasil dikloning
Ota (2006)	Aktivitas hepatotoksisitas dari plancitoxin I pada racun <i>A. planci</i>	Plancitoxin I mampu memasuki nukleus dan merusaknya

Pada penelitian (Shiomi *et al.*, 1997) tentang pemurnian fosfolipase-A<sub>2</sub> dari *A. planci* menyebutkan dua fosfolipase-A (AP-PLA<sub>2</sub>-I dan II) dimurnikan dari racun. Kedua enzim tersebut telah dipastikan merupakan fosfolipase-A<sub>2</sub> berdasarkan hasil yang menunjukkan aktivitas hemolitik hanya dengan kehadiran fosfatidilkolin dan juga melepaskan asam lemak fluoresens dari fosfatidilkolin pada posisi sn-2. PLA<sub>2</sub> mempunyai massa molekul sebesar 12 kDa dengan gel filtrasi atau 15 kDa dengan SDS-PAGE. Aktivitas enzim meningkat 180% dengan adanya Ca<sup>2+</sup> tetapi berkurang 10-20% dengan adanya Cu<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup>. 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.

Telah ditemukan ada suatu peptida baru yang berfungsi sebagai antikoagulan yang dinamakan plancinin (Karasudani *et al.*, 1996). Plancinin memperpanjang waktu aktivasi tromboplastin dan protrombin tetapi tidak memperpanjang waktu trombin untuk terbentuk. Hasil mengindikasikan aksi situs antikoagulan berlokasi pada faktor II dan X langkah aktivasi dengan kompleks koagulan darah. Pada penelitian situs aktif plancinin (Koyama *et al.*, 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.

Pengkloningan molekul pernah dilakukan (Ota *et al.*, 2005) terhadap racun PLA<sub>2</sub> 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.

Aktivitas biologi dari ekstrak kasar racun *A. planci* pernah dilakukan (Shiomi *et al.*, 1984). 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 lesitin, membuktikan racun mengandung faktor hemolitik secara langsung dan tidak langsung, yaitu fosfolipase A yang bisa mengubah lesitin menjadi lysolesitin yang mempunyai aktivitas hemolitik. Racun mematikan untuk tikus ketika disuntikan pada dosis LD<sub>50</sub> 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.

Racun pada duri *A. planici* menyebabkan kontraksi pada uterus tikus dan menaikkan permeabilitas vaskular pada kelinci (Karasudani *et al.*, 1995). Hasil ini menyimpulkan aksi kontraksi uterus disebabkan oleh prostaglandin sebagai mediator dan sebagian dikontribusi oleh aktivitas fosfolipase pada racun. Preparasi racun dari duri *A. planici* menggunakan Polytron homogeniser dengan fosfat bufer pH 7.0 dan disentrifugasi 4000xg 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.

Penelitian ditemukannya DNase II (Shiomi *et al.*, 2004) menjelaskan tentang adanya dua faktor mematikan (plancitoxins I dan II) dengan LD<sub>50</sub> yang sama dari 140 mg/kg yang dimurnikan dari duri bintang laut *A. planici*. Injeksi dosis sublethal 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. Berdasarkan N-terminal sekuen asam amino ditentukan a-dan b-subunit. Alfa-Subunit (92 residu asam amino) dan beta-subunit (240 residu) yang dikodekan dalam urutan oleh cDNA yang sama. 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. planici*. 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*. Bahan kering dilarutkan dalam 10 ml 0,01 M buffer fosfat (pH 6,0) dan dilakukan kromatografi protein FPLC pada SHR5 aMono / 5 kolom (0,5 x 5 cm; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Inggris). Kolom dielusi dengan NaCl gradien linier (0,0-0,3 M dalam 60 menit) dalam buffer yang sama dengan laju alir 1 ml / menit. Dua fraksi beracun sesuai dengan plancitoxins I dan II secara individual dikumpulkan dan digunakan untuk penentuan aktivitas biologis tertentu. 1,0 M NaCl dalam buffer. 10 ml fraksi dikumpulkan pada laju alir. Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa setelah dianalisis dengan SDS-PAGE, plancitoxins memberikan sebuah band tunggal yang menunjukkan homogenitas mereka. Homogenitas dari plancitoxins dimurnikan lebih lanjut didukung oleh HPLC pada TSKgel ODS-120T, di mana setiap persiapan plancitoxin muncul di puncak tunggal.

Uji toksisitas Plancitoxin I sebagai faktor mematikan utama (Ota *et al.*, 2006) dari bintang laut *A. planci*, cukup unik bukan hanya dalam menunjukkan potensi hepatotoksisitas tapi juga dalam urutan homologi dengan deoxyribonuclease II mamalia. Dalam penelitian ini, perubahan morfologi dan biokimia dalam sel hati tikus epitel (TRL 1215 sel) diamati kemudian diperiksa untuk memahami mekanisme plancitoxin I yang bersifat hepatotoksisitas. *AlamarBlue assay* menetapkan bahwa plancitoxin I bersifat cytolethal untuk TRL 1215 sel. Apoptosis diamati terbukti menjadi independen dari *caskade caspase 3* yang umumnya diterima sebagai efektor dari proses apoptosis. Percobaan menggunakan FITC-plancitoxin I membuktikan bahwa racun bisa masuk ke inti sel TRL 1215. 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 melalui prosedur berikut: mengikat ke reseptor khusus di membran sitoplasma, masuk sel, memasuki inti dan DNA merendahkan.

## 2.2 Prinsip Dasar 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 fraksinasi sel yaitu (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 sentrifus dengan kecepatan dan lama sentrifugasi tertentu. Sebagian besar protein merupakan molekul yang mudah rusak bila tidak berada pada kondisi fisiologisnya. Karena itu, untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein, fraksinasi dilakukan pada suhu rendah (0-4°C) dalam buffer dan pH tertentu (tergantung dari jenis protein yang akan dianalisa).

Beberapa teknik analisa protein membutuhkan prosedur isolasi yaitu memisahkan protein dari makromolekul yang lain atau memisahkan protein dengan sifat tertentu dari protein lain yang tidak diinginkan dalam analisa. Suatu teknik isolasi dan identifikasi protein harus mempertimbangkan sifat-sifat fisik, kimiawi dan kelistrikan suatu protein sedemikian rupa sehingga konformasi dan aktivitasnya tidak berubah. Pada tahap awal isolasi, biasanya digunakan metode yang memiliki daya pemisah terendah seperti pengendapan dengan ammonium sulfat. Pengendapan ini dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain jumlah dan posisi gugus polar, berat molekul, pH dan temperatur larutan.

## 2.3 Teknik-Teknik Isolasi Protein

### 2.3.1 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 (Lehninger, 1977). 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 hidrofobik 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.

Fosfolipase-A<sub>2</sub> merupakan enzim yang tahan panas stabil sampai suhu 75°C dalam waktu inkubasi 5 menit (Karasudani *et al.*, 1995). Atas dasar ini maka enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> bisa dimurnikan menggunakan teknik pemanasan pada suhu 60°C.

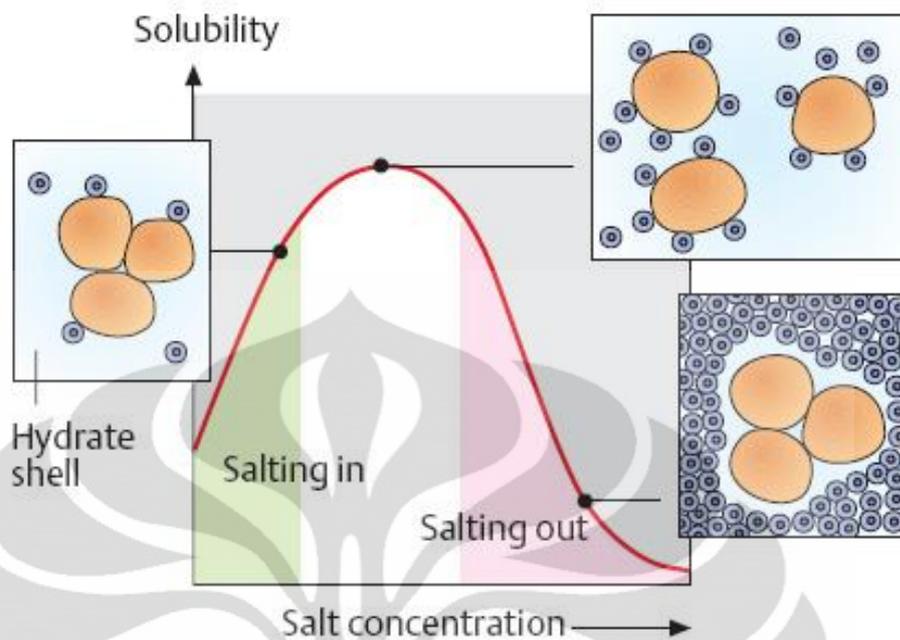
### 2.3.2 Sonikasi

Kebanyakan molekul protein berada dalam sel, dan kemungkinan besar terdapat di dalam organel pada sel, dan pada kasus ini membuka sel dan organel dibutuhkan. Sonikasi frekuensi tinggi adalah metode yang banyak digunakan untuk menghancurkan sel dan organel. Aplikasi

gelombang suara frekuensi tinggi adalah metode yang efektif untuk merusak sel yang bisa diaplikasikan ke mikroorganisme. Mekanismenya melibatkan *microcavitation* yang menghasilkan perbedaan tekanan yang akan merusak dinding sel. Efisiensi perusakan sel dipengaruhi oleh kekuatan yang dipakai pada instrument, durasi pemaparan dan volume material proses. Pendinginan dibutuhkan untuk mencegah peningkatan panas (Koelman, 2005).

### 2.3.3 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).

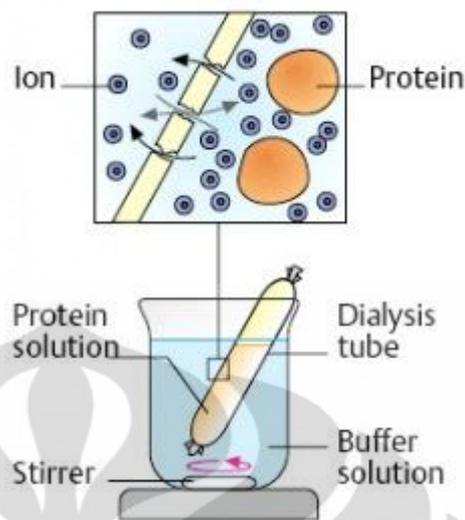


**Gambar 2.2 Grafik Hubungan Konsentrasi Garam dengan Kelarutan**

(Koelman, 2005)

#### 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.



**Gambar 2.3 Proses Dialisis**

(Koelman, 2005)

### 2.3.5 Gel Filtrasi

Gel filtrasi dilakukan 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).

### 2.3.6 Kromatografi Penukar Ion

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).

### **2.3.7 Ultrafiltrasi**

Ultrafiltrasi adalah variasi dari membran filtrasi dimana tekanan hidrostatik mendorong cairan melewati membran semipermeabel. Endapan padat dan campuran dengan berat molekul besar tertahan, sedangkan air dan campuran dengan berat molekul kecil melewati membran. Proses pemisahan ini digunakan pada industri dan penelitian untuk memurnikan dan memekatkan campuran molekul makro ( $10^3 - 10^6$  Da), terutama untuk campuran protein. Ultrafiltrasi tidak jauh berbeda dari mikrofiltrasi, nanofiltrasi, kecuali dalam ukuran molekul yang tertahan (Deutscher, 1990).

### **2.3.8 Ekstraksi pelarut**

Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan pencari yang sesuai selama beberapa hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan pencari 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 pencari 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 pencari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan.

### 2.3.9 Metode Ekstraksi Gelombang Mikro

Ekstraksi dengan Bantuan Gelombang Mikro Ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro yang 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).

## 2.4 Sodium Dodesil Sulfat-Gel Poliakrilamid (SDS-PAGE)

Protein biasanya 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).

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrilamide-gel electrophoresis*) 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. Agen reduksi seperti merkaptoetanol ditambahkan untuk mengurai pautan S-S protein sehingga semua konstituen polipeptida pada molekul multisubunit dapat dianalisis secara terpisah (Alberts *et al.*, 1994).

Tiap molekul protein mengikat sejumlah besar molekul deterjen bermuatan negatif yang menyelubungi muatan intrinsik protein dan menyebabkannya bermigrasi menuju elektroda positif ketika dikenai tegangan listrik. Protein yang berukuran sama cenderung berperilaku identik karena (Alberts *et al.*, 1994) :

1. Struktur aslinya terurai secara sempurna oleh SDS sehingga memiliki bentuk yang sama
2. Protein tersebut mengikat jumlah SDS yang sama sehingga memiliki jumlah muatan negatif yang sama. Semakin besar protein, dengan muatan yang lebih banyak, akan diperlakukan dengan gaya listrik yang lebih besar, dan juga tarikan yang lebih besar. Pada larutan yang bebas, kedua efek tersebut dapat ditiadakan, tetapi pada jaring-jaring gel poliakrilamid, yang berperan sebagai saringan molekuler, protein yang berukuran lebih besar memiliki hambatan yang lebih besar daripada protein yang berukuran lebih kecil. Hasilnya, campuran kompleks protein akan mengalami fraksinasi membentuk serangkaian pita protein diskret yang tersusun berdasarkan berat molekulnya. Protein mayor dapat dideteksi dengan pewarnaan gel menggunakan *Coomassie blue*, protein minor dapat diwarnai dengan *silver stain*.

SDS-PAGE merupakan prosedur yang lebih baik daripada analisis protein lainnya karena dapat dipergunakan untuk memisahkan semua jenis protein,



## 2.7 Uji Aktivitas Kaseinolitik

Selain mendegradasi peptida, protease juga 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. Produk-produk peptida yang larut dalam campuran reaksi tadi dipisahkan dengan cara disentrifugasi menggunakan alat sentrifuga 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.

## 2.8 Uji Kadar Protein Lowry

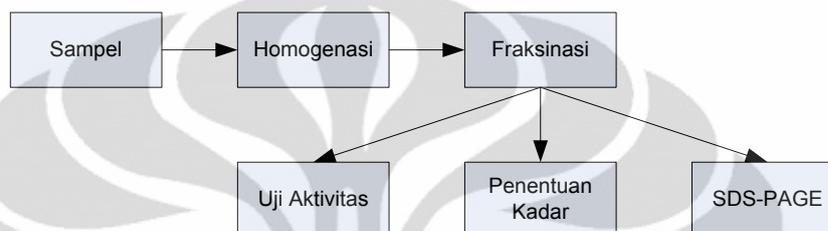
Uji protein Lowry adalah biokimia assay untuk menentukan tingkat total protein dalam suatu larutan. Konsentrasi total protein ditunjukkan oleh perubahan warna larutan sampel secara proporsional dengan konsentrasi protein, yang kemudian dapat diukur dengan menggunakan teknik kolorimetri. Ini adalah nama untuk ahli biokimia Oliver H. Lowry yang mengembangkan teknik di tahun 1940. Teknik ini termasuk yang paling sering digunakan dalam makalah biologi. Metode ini menggabungkan reaksi ion tembaga dengan ikatan peptida dalam kondisi basa (hasil uji Biuret) dengan residu oksidasi aromatik protein. Metode Lowry ini paling baik digunakan dengan protein konsentrasi 0,01-1,0 mg/mg dan didasarkan pada reaksi  $\text{Cu}^{2+}$  yang dihasilkan oleh oksidasi ikatan peptida dengan pereaksi Folin Ciocalteu (campuran asam fosfotungstat dan asam fosfomolibdat pada pereaksi Folin Ciocalteu). Mekanisme reaksi belum dipahami dengan baik, tetapi melibatkan reduksi reagen Folin dan oksidasi residu aromatik (terutama triptofan juga tirosin). Konsentrasi pereaksi Folin yang tereduksi diukur dengan absorbansi 750 nm. Sebagai hasilnya, konsentrasi total protein dalam sampel dapat disimpulkan dari konsentrasi residu triptofan dan tirosin yang mengurangi reagen Folin. Kerugian dari metode ini adalah waktu inkubasi yang panjang dan

sering ada gangguan dengan buffer yang umum digunakan. Metode ini juga dikenakan untuk variasi protein-protein karena hubungan intensitas warna tergantung pada isi tirosin dan triptofan di dalam protein.



## BAB III METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, Depok dan Laboratorium Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong. Diagram alir penelitian ekstraksi enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> ditunjukkan pada Gambar 3.1 di bawah ini :



**Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian**

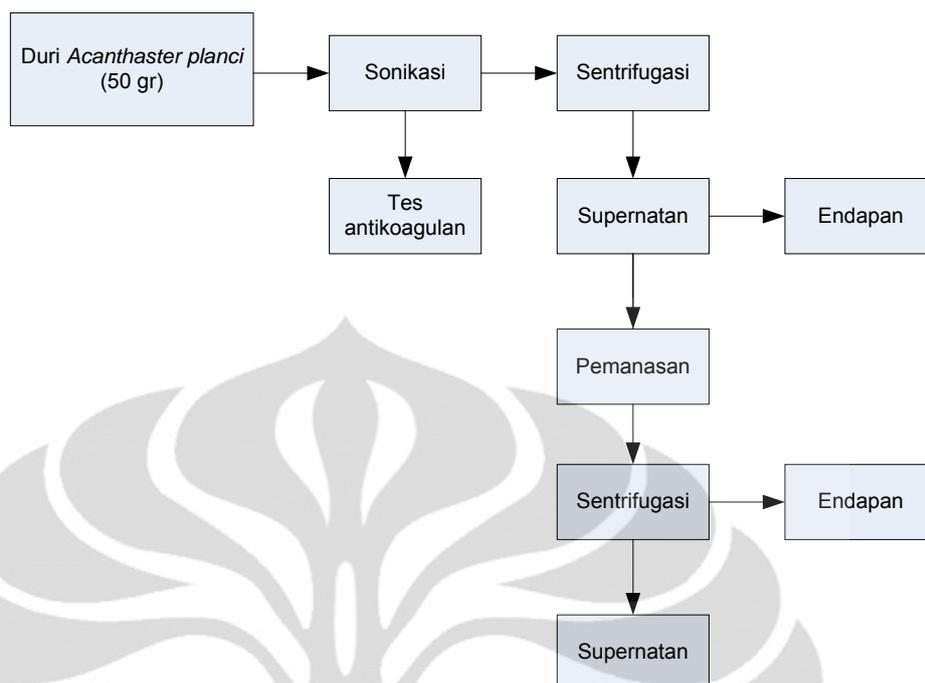
Tahapan awal penelitian adalah studi literatur nasional maupun internasional yang dapat memberikan informasi mengenai *A. planci*, enzim fosfolipase, pemurnian protein, fraksinasi ammonium sulfat, dan SDS-PAGE.

### 3.1 Preparasi Sampel Protein Enzim

Langkah selanjutnya adalah preparasi bahan dan alat. Spesimen *A. planci* 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 *A. planci* digunting dan dikumpulkan.

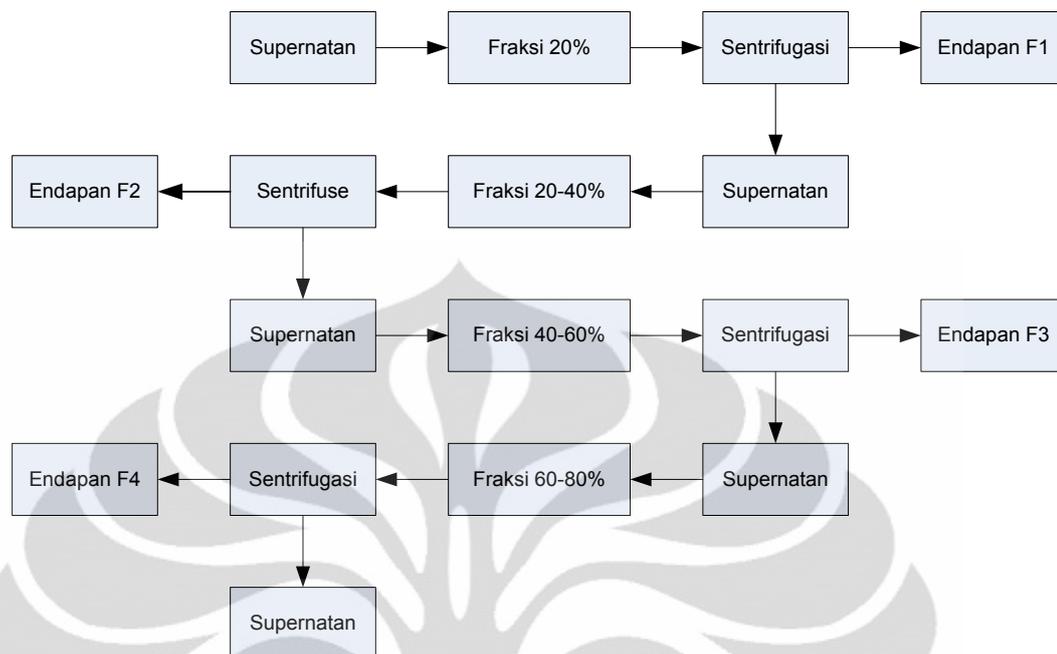


**Gambar 3.2 Diagram Alir Preparasi Sampel**

Sampel duri yang telah dikumpulkan (50 gr) direndam dalam bufer fosfat 0.01 M, pH 7.0 sebanyak 100 ml dan 10 ml CaCl 0,1 M lalu dihomogenisasi dengan cara sonikasi. Semua dilakukan dalam suhu 4°C. Untuk membuktikan keluarnya racun dari duri dilakukan tes antikoagulan menggunakan darah manusia. Antikoagulan merupakan ciri khas racun duri *A. planci* yang ditandai dengan larutnya koagulan darah. Sampel hasil sonikasi dimasukkan ke dalam substrat darah manusia untuk diamati aktivitas antikoagulannya.

Setelah sampel dalam bufer fosfat telah disiapkan selanjutnya di refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 30 menit untuk dipisahkan pengotornya. Supernatan lalu dipanaskan di dalam *waterbath* selama 30 menit pada suhu 60°C dan setiap 10 menit diaduk dengan *magnetic stirrer*, lalu dipisahkan kembali dengan sentrifugasi 15.000g selama 30 menit. Supernatannya digunakan untuk tahap berikut.

### 3.2 Fraksinasi Ammonium Sulfat



**Gambar 3.3 Diagram Alir Fraksinasi Ammonium Sulfat**

Kemudian supernatan hasil preparasi mulai diendapkan protein enzimnya dengan garam ammonium sulfat secara bertahap (fraksinasi) 20%, 40%, 60%, dan 80% menurut derajat kelarutannya. Setiap pengendapan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dan wadah sampel direndam dalam es supaya terjaga suhunya. Pemisahan endapan dilakukan dengan refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 30 menit. Endapan hasil sentrifuse masing-masing fraksi dilarutkan dalam bufer fosfat 0,01 M, pH 7,0, sebanyak 10 ml dan diberi kode F1, F2, F3, F4, dan F5 (supernatan hasil fraksi 60-80% tidak perlu diendapkan karena merupakan fraksi 100%).

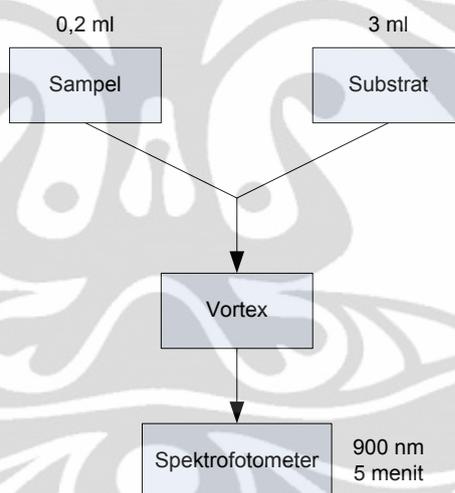
### 3.3 Uji Aktivitas Kaseinolitik

Sampel enzim protease dari papain 50 µl ditambahkan ke dalam sejumlah larutan kasein 2% (b/v) sebanyak 0,5 ml dan 0,5 ml bufer fosfat 0,01 M, pH 7,0, di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit untuk mendegradasi protein peptida pada kasein, reaksi dihentikan setelah 10 menit tersebut dengan penambahan 0,4 ml TCA 10% untuk mendenaturasi enzim dan sisa substrat. Peptida yang masih terlarut dipisahkan dengan sentrifugasi klinis. Supernatan

yang mengandung peptida diukur setelah penambahan 2 ml NaOH 0,5 M dan 0,5 ml reagen Folin Fenol Ciocalteau dengan jeda waktu tertentu. Aktivitas protease dari sampel yang ditentukan sebanding dengan serapan yang terukur (650 nm). Hasil kualitatif metode ini dapat dilihat pada Lampiran C.

### 3.4 Uji Aktivitas Fosfolipase-A<sub>2</sub>

Kuning telur sebanyak 0,2 gr dilarutkan dalam labu ukur 100 ml bufer fosfat 0,01 M, pH 7.0. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 900 nm selama 5 menit menggunakan spektrofotometer. Sebanyak 0,2 ml sampel enzim dimasukkan 3 ml substrat kuning telur, di-*vortex* lalu diukur pengurangan absorbansinya selama 5 menit. Blanko substrat diukur tanpa menggunakan sampel enzim.

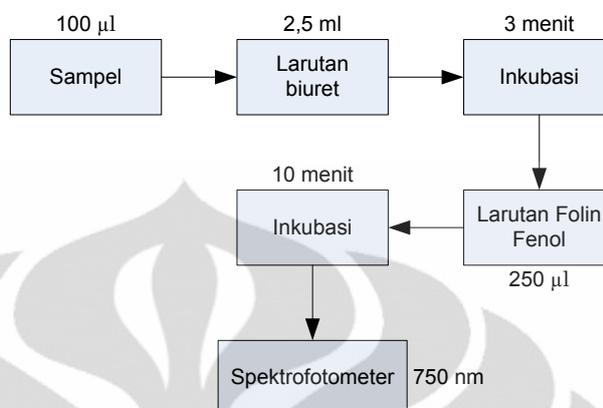


**Gambar 3.4 Diagram Alir Uji Aktivitas PLA<sub>2</sub>**

### 3.5 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Pengujian kadar protein Metode Lowry menggunakan larutan Biuret (1 ml larutan CuSO<sub>4</sub> 1% dan larutan 1 ml NaK-Tartrat 1% dimasukan ke dalam 100 ml larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%) dan reagen Folin Fenol Ciocalteau 1N. Kurva standarnya menggunakan protein bovine serum albumin (BSA) 200µg/ml. Rentang waktu inkubasi antara memasukkan larutan biuret dan reagen Folin adalah 3 menit, sedangkan rentang waktu inkubasi antara reagen Folin dan pengukuran absorbansi adalah 12 menit. Setelah memasukan larutan biuret dan Folin harus dicampur

menggunakan *vortex mixer*. Serapan masing-masing larutan diukur tepat pada menit ke-12 yang ditetapkan pada panjang gelombang 750 nm.



**Gambar 3.5 Diagram Alir Metode Lowry**

### 3.6 *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*

*Plate* pembentuk gel disusun seperti petunjuk yang diberikan. Gel pemisah 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. 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 gel pemisah selanjutnya dibuang. Bila gel pemisah telah memadat, gel penumpuk 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 gel penumpuk dimasukkan, maka selanjutnya sisiran diletakkan di atasnya.

*Plate* yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis. Elektroda 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 elektroda buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* untuk memulai pemisahan. Pemisahan dilakukan pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai 0.5 cm dari dasar gel. Bila pemisahan telah selesai, elektroda 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 pita 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 larutan *staining* sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, larutan *staining* dituang kembali pada wadahnya. Gel direndam dalam 50 ml larutan *destaining* setelah dicuci dengan air beberapa kali, sambil digoyang selama kurang semalaman atau sampai *band protein* terlihat jelas.

### **3.7 Bahan dan Alat**

#### **3.7.1 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 :

1. Garam  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2. Lateks papaya
3. Bufer fosfat pH 7.0

Penentuan Kadar Protein Lowry :

1. BSA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$
2.  $\text{dH}_2\text{O}$
3. NaOH 0,1N
4.  $\text{CuSO}_4$  1% ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,56 gr +  $\text{dH}_2\text{O}$ )
5. NaK-Tartrat 1% (NaK-Tartrat 2,37 gr +  $\text{dH}_2\text{O}$ )
6.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% (NaOH 2 gr +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 gr +  $\text{dH}_2\text{O}$ )
7. Larutan Biuret (5 ml larutan  $\text{CuSO}_4$  1% dan larutan 5 ml NaK-Tartrat 1% dimasukkan ke dalam 500 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%)
8. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N

Penentuan Uji Aktivitas Kaseinolitik :

1. Trikloroasetat (TCA) 20%
2. Larutan kasein 2%
3. NaOH 0,5 M
4. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N
5. Bufer fosfat, pH 7.0

Uji Aktivitas Fosfolipase-A<sub>2</sub>

1. CaCl 0,1 M
2. Kuning telur 2 mg/ml
3. Fosfat bufer pH 7.0

Bahan-bahan SDS-PAGE

1. Aquades
2. Akrilamid 29,2 gr
3. (bis)akrilamid
4. Sodium Dedosil Sulfat 10%
5. Larutan HCl

6. Ammonium persulfat (APS) 10%
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 absolut 300 mL
13. Asam asetat glasial 100 mL
14. N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED)

### 3.7.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah sebagai berikut :

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

## BAB IV PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Preparasi Enzim dan Pemanasan

Dalam pemurnian enzim keberhasilan sangat ditentukan oleh faktor-faktor yang dapat merusak/mendenaturasi protein, faktor-faktor tersebut adalah pH, suhu, dan kontaminasi. Maka dari itu peranan dari bufer fosfat pH 7.0 yaitu untuk mempertahankan pH, dimana enzim umumnya stabil dan mempunyai aktivitas pada pH netral, pH terlalu rendah atau terlalu tinggi bisa merusak enzim. Faktor lainnya yaitu suhu, enzim mempunyai batas ketahanan suhu yang bisa diterima untuk menjaga struktur proteinnya masing-masing dan enzim juga mempunyai suhu aktivitas optimum dan minimum. Berikutnya faktor yang tidak dapat dihindari adalah kontaminan mikroorganisme, biasanya terbawa oleh udara dan masuk ke dalam sampel, sehingga suhunya harus dijaga sekitar 4°C dimana pada suhu ini aktivitas dan laju pertumbuhan bakteri secara umum berkurang. Kebersihan alat-alat laboratorium juga harus diperhatikan, untuk meminimalkan kontaminan mikroorganisme sebelum dipakai alat-alat dibilas menggunakan alkohol 70% untuk disinfektan lalu dibilas lagi menggunakan aquades.

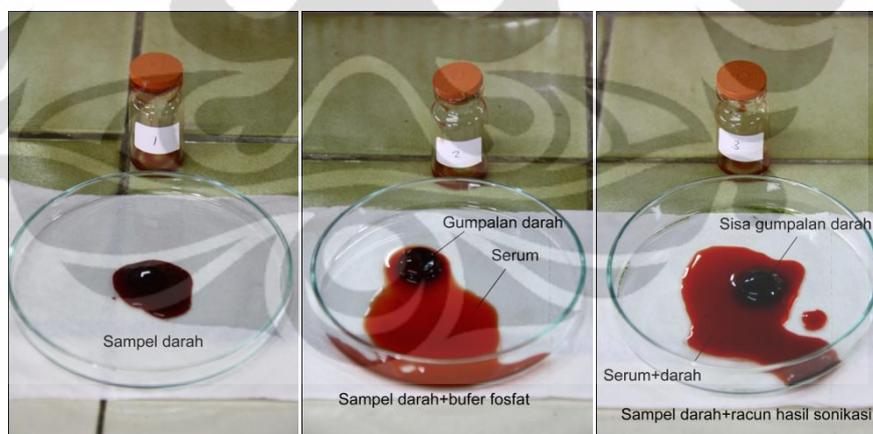
Untuk memulai tahap ekstraksi, duri dari *A. planci* digunting dan disimpan dalam suhu 20°C. Duri sebanyak 50 gr direndam dalam 100 ml fosfat bufer 0,01 M pH 7.0 dan 10 ml CaCl 0,1 M lalu disonikasi selama 8 menit, fosfat bufer ini berfungsi untuk menjaga kestabilan pH enzim dimana enzim sangat mudah terdenaturasi bila terjadi perubahan pH, sedangkan ion Ca<sup>2+</sup> akan menambah aktivitas enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> sebanyak 180%, tetapi akan berkurang sebanyak 10-20% oleh Cu<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> (Shiomi, 1997). Hasil sonikasi lalu disentrifugasi refrigerasi dengan kekuatan 15.000g pada suhu 4°C selama 30 menit, supernatannya merupakan sampel *crude venom* hasil sonikasi (CV).

Sampel CV dipanaskan di dalam *waterbath* dengan suhu tidak melebihi batas ketahanan enzim, fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) terdenaturasi pada suhu 75°C (Karasudani *et al.*, 1997), sehingga keduanya bisa dipanaskan dalam suhu 60°C. Pemanasan ini dapat menyebabkan lipatan-lipatan protein yang tidak tahan panas akan membuka (terdenaturasi) dan bagian-bagian residu yang tersikap keluar

(pelarut) saling berinteraksi dengan protein terdenaturasi lain membentuk suatu agregat yang akhirnya mengendap. Namun, protein yang bersifat termostabil seperti fosfolipase- $A_2$  dan papain tidak membentuk agregat sehingga tidak mampu terendapkan. Larutan sampel akan menjadi pucat disebabkan protein-protein lain yang tidak diinginkan terdenaturasi membentuk emulsi halus yang bisa dipisahkan dengan sentrifuse. Sentrifuse dilakukan pada 15.000g pada suhu 4°C selama 30 menit, supernatan dipisahkan sebagai sampel racun hasil pemanasan (PV).

#### 4.2 Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan

Homogenisasi sangat penting pada penelitian ini. Tujuan dari homogenisasi untuk mendapatkan racun kasarnya terlarut dalam larutan bufer fosfat. Teknik homogenisasi penelitian ini adalah dengan menggunakan sonikasi. Duri dari *A. planci* dimasukkan dalam bufer fosfat dan disonikasi. Untuk membuktikan racun kasar telah keluar dilakukan tes antikoagulan. Antikoagulan sebagai efek dari racun duri *A. planci* dimasukkan ke dalam darah manusia. Hasil pengamatannya diperlihatkan pada Gambar 4.1.



**Gambar 4.1 Hasil Pengamatan Aktivitas Antikoagulan. (1)darah, (2)darah dengan bufer fosfat, (3)darah dengan racun**

Pengamatan dilakukan pada 3 substrat darah, yaitu: darah (botol 1), darah dengan bufer fosfat pH 7.0 (botol 2), dan darah dengan racun hasil sonikasi (botol 3). Pada botol 1 membuktikan bahwa darah yang dijadikan substrat mempunyai kemampuan untuk koagulasi sehingga bisa dijadikan substrat pada uji aktivitas ini, botol 2 tidak membuktikan adanya aktivitas antikoagulan karena darah yang

menggumpal masih terlihat padat, sedangkan cairan disekelilingnya hanya campuran serum dan bufer fosfat, botol 3 terlihat aktivitas antikoagulan yang ditandai dengan cairan gumpalan darah disekeliling gumpalan darah, cairan disekelilingnya terlihat warna merah pekat yang merupakan sel darah merah yang telah rusak. Metode sonikasi mampu mengeluarkan enzim yang ada pada spesimen.

### 4.3 Hasil Fraksinasi Ammonium Sulfat

Cara ini didasarkan bahwa dengan penambahan garam yang mudah larut (ammonium sulfat 20, 40, 60, dan 80% jenuh) ke dalam larutan protein akan menyebabkan suatu keadaan dimana pada kelarutan tertentu protein akan berkurang kelarutannya dan mengendap (termasuk enzim fosfolipase-A<sub>2</sub>), karena kemampuan ion-ion garam untuk terhidrasi lebih besar sehingga membuat molekul-molekul protein mengendap (*salting out*). Pengadukan juga dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* sekaligus dijaga suhunya untuk menghindarkan penumpukan kadar elektrolit pada satu tempat dan meningkatkan kontak pengendapan dengan enzim. Pengadukan dengan *magnetic stirrer* tidak boleh terjadi gelembung yang berlebihan karena dapat merusak enzim di dalam larutan. Pemberian ammonium sulfat dilarutkan sedikit demi sedikit supaya enzim mengendap dengan baik. Setelah diendapkan lalu disentrifuse dengan kekuatan 30.000g, 4°C, selama 30 menit. Endapan lalu dilarutkan dengan fosfat bufer pH 7.0 secukupnya.

Setelah setiap endapan fraksi didapatkan maka sampel-sampel tersebut diuji kadar proteinnya dengan menggunakan Metode Lowry dengan BSA 200µg/ml sebagai standarnya. Kadar protein fosfolipase-A<sub>2</sub> dapat dilihat dalam Lampiran A. Fraksi 20%, 40%, 60%, dan 80% berturut-turut dinamakan F1, F2, F3, dan F4. Untuk diketahui pada fraksi mana mempunyai hasil ekstraksi papain dan fosfolipase-A<sub>2</sub> tertinggi dilakukan uji aktivitas kaseinolitik dan fosfolipase-A<sub>2</sub>.

**Tabel 4.1 Kadar Protein Metode Lowry**

Sampel	Absorbansi	Berat protein ( $\mu\text{g}$ )	Kadar protein (mg/ml)
CV	0,393	86,55	1,73
PV	0,346	72,30	1,45
F1	0,196	26,85	0,54
F2	0,453	104,73	2,09
F3	0,606	151,09	3,02
F4	1,128	309,27	6,19
F5	0,568	139,58	2,79

#### 4.4 Hasil Uji Aktivitas Kaseinolitik

Papain merupakan enzim protease yang didapat dari getah pepaya muda yang berumur 3-4 bulan, sering dipakai di industri makanan sebagai *meat tenderizer* (pengempuk daging). Papain yang berhasil diekstrak dari lateks pepaya merupakan kontrol positif metode penelitian ini. Keberhasilan hasil ekstraksi papain merupakan pembuktian bahwa metode penelitian ini bisa dilakukan.

Protease mampu mendegradasi larutan kasein sehingga sering digunakan sebagai uji aktivitas protease suatu enzim. Sejumlah sampel enzim papain direaksikan dengan larutan kasein 2%. Larutan kasein ini merupakan sumber nutrisi mikroorganisme sehingga tidak bisa disimpan pada suhu ruang harus dalam lemari es, penyimpanan pada suhu ruang berakibat timbulnya bau tidak sedap akibat hasil metabolik mikroorganisme. Reaksi enzim-substrat menghasilkan produk-produk peptida yang larut dan stabil sehingga untuk menghentikan reaksi, ke dalam masing-masing tabung ditambahkan TCA (trikloroasetat) 10% (b/v) yang akan menyebabkan protein enzim dan sisa substrat kasein terdenaturasi dan membentuk agregat yang berukuran besar. Protein-protein yang telah terdenaturasi ini terlihat berupa gumpalan-gumpalan berwarna putih yang mudah dipisahkan. Dengan sentrifugasi protein terdenaturasi akan dapat dipisahkan dari peptida yang terlarut dalam supernatan. Aktivitas kaseinolitik sebanding dengan jumlah peptida terlarut, maka dilakukan pengukuran serapan dari masing-masing sampel fraksi pengendapan menggunakan Metode Anson. Yaitu dengan mengambil supernatan peptida terlarut yang dinetralkan terlebih dahulu dengan NaOH 0,5 M lalu ditambahkan

Fenol Folin Ciocalteu. Prinsip dasar Metode Anson yaitu reagen Folin mampu mendeteksi residu tirosin dalam peptida karena gugus fenolik residu tersebut mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat pada Folin menjadi tungsten dan molibdenum berwarna biru yang menunjukkan serapan pada daerah merah dari spektrum sinar tampak. Dalam hal ini serapan diukur pada panjang gelombang 650 nm. Hasil dari aktivitas kaseinolitik hanya sebatas pengamatan visual (kualitatif) seperti pada Gambar 4.2 dibawah.



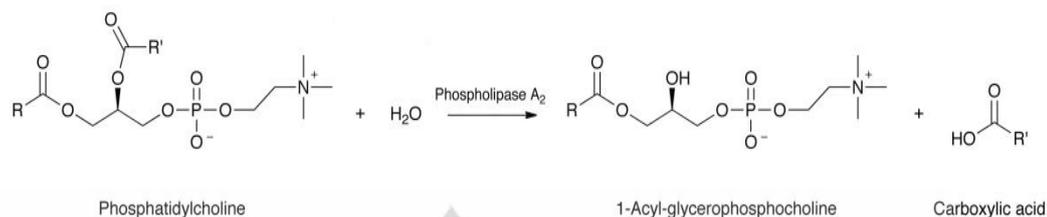
**Gambar 4.2 Hasil Kualitatif Uji Aktivitas**

Sampel 1 merupakan blanko yang terlihat lebih jernih dari sampel lainnya, sampel 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 berturut-turut adalah CP, PE, F1, F2, F3, F4, dan F5 yang memberikan warna biru yang lebih pekat dari blanko kecuali sampel 4 dan 8 dimana fraksi tersebut adalah fraksi 20% dan 100% mempunyai aktivitas kaseinolitik yang rendah, aktivitas tertinggi terlihat pada sampel 5, 6, 7 yaitu fraksi 40%, 60% dan 80%. Sampel 2 dan 3 merupakan enzim kasar dan enzim hasil pemurnian pemanasan dimana memberikan suatu aktivitas tetapi belum bisa dikatakan murni.

#### **4.5 Hasil Uji Aktivitas Fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)**

Uji aktivitas dilakukan berdasarkan penjernihan substrat suspensi kuning telur oleh fosfolipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Marinetti, 1965). Kuning telur mengandung fosfatidilkolin yang akan bereaksi dengan PLA<sub>2</sub> membentuk 1-asilgliserofosfokolin dan asam karboksilat. Sehingga dengan penambahan enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> 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.



**Gambar 4.3 Mekanisme Kerja Enzim**

(www.worthington.com)

Dari hasil perhitungan pada Lampiran B, aktivitas spesifik fosfolipase-A<sub>2</sub> dan tingkat kemurnian masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.2 Aktivitas Spesifik PLA<sub>2</sub>**

Sampel	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purity Level</i>
CV	5,23	1
PV	6,22	1,19
F1 (0-20%)	108,48	20,75
F2 (20-40%)	16,45	3,15
F3 (40-60%)	2,91	0,56
F4 (60-80%)	2,31	0,44

Aktivitas tertinggi terlihat pada F1 (fraksi 0-20%) sebanyak 108,48 unit/mg dengan tingkat kemurnian 20,75 kali lebih besar dari *crude venom* (racun kasar). Aktivitas juga ditemui pada F2 tetapi tidak signifikan. Ini membuktikan pada pengendapan fraksi ammonium sulfat 20% cukup untuk mengendapkan enzim fosfolipase-A<sub>2</sub> yang terdapat pada racun duri *A. planci*.

Jika dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang telah berhasil memurnikan enzim PLA<sub>2</sub> dari berbagai macam spesies dan kromatografi akan terlihat bahwa metode ini cukup efektif, seperti yang dilakukan oleh Kazuo Shiomi dan kawan-kawannya (1997) mengenai karakterisasi enzim PLA<sub>2</sub> dari

spesies yang sama (*A. planici*) setelah dimurnikan didapatkan kemurnian yang sama sebanyak 20 kali lipat (AP-PLA<sub>2</sub>-II).

**Tabel 4.3 Hasil Pemurnian PLA<sub>2</sub> Penelitian Kazuo Shiomi**

Step	Protein (mg)	Specific PLA <sub>2</sub> activity (units/mg)
Crude toxin	4820	830
CM-cellulose	4420	860
Phenyl Sepharose CL-4B		
PLA <sub>2</sub> -I fraction	190	2470
PLA <sub>2</sub> -II fraction	111	1550
AP-PLA <sub>2</sub> -I		
Sephacryl S-200	31	2780
TSKgel Phenyl 5PW-RP	3.4	7830
AP-PLA <sub>2</sub> -II		
Superose 12	6.3	15 800
TSKgel ODS-120T	3.5	16 600

(Shiomi *et al.*, 1997)

Terlihat pada tabel aktivitas spesifik setelah melalui berbagai macam kolom kromatografi didapatkan AP-PLA<sub>2</sub>-I 7830 units/mg dan AP-PLA<sub>2</sub>-II 16.600 units/mg.

Perbandingan terhadap penelitian lain yang berhasil memurnikan enzim PLA<sub>2</sub> dari spesies bintang laut *Plazaster borealis* (Koyama *et al.*, 2004) didapatkan kemurnian sebanyak 12 kali lipat setelah melewati tahap-tahap kromatografi.

**Tabel 4.4 Hasil Pemurnian PLA<sub>2</sub> Racun Bintang Laut *Plazaster borealis***

Purification step	Protein (mg)	Total activity ( $\times 10^3$ U)*	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude enzyme solution	23,500	438	19	1	100
Sephacryl S-200	4,400	78	18	1	18
DEAE-Cellulose	600	38	63	3	9
Sephadex G-50	103	24	230	12	5

\*One unit of activity was defined as the microgram of phosphatidylcholine hydrolyzed per minute.

DEAE : diethylaminoethyl

(Koyama *et al.*, 2004)

Spesies lain yang mempunyai kandungan enzim PLA<sub>2</sub> dari racunnya adalah ular berbisa *Echis ocellatus* (Sallau *et al.*, 2008) berhasil dimurnikan dengan tingkat kemurnian 13,50 kali dari racun kasarnya.

**Tabel 4.5 Hasil pemurnian PLA<sub>2</sub> Racun *Echis ocellatus***

Purification step	Protein (mg )	Total activity (μmol/min)	Specific activity (μmol/min/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude	6.70	16.00	2.39	1.00	1.00
Ion Exchange on DEAE- cellulose	1.20	8.00	6.67	2.80	50.00
Gel filtration on Sephadex G-75	0.43	13.87	32.26	13.50	86.69

(Sallau *et al.*, 2008)

Spesies ular kobra India *Naja naja* juga mempunyai racun dengan kandungan enzim PLA<sub>2</sub> 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 4.6 Hasil Pemurnian PLA<sub>2</sub> Racun Kobra India Timur (*Naja naja*)**

Step	Fraction	Total Protein (mg)	Total activity* (μmoles fatty acid released /min)	Specific activity (μmoles fatty acid released/ min/mg protein)	Yield**	
					Protein	Activity
CM-Sephadex C-25	Whole venom	200	515.0	2.5	100	100
	NN-I	26	453.2	17.4	13.0	88.0
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	11.0	1.45
	NND-III	2.91	55.2	18.9	19.4	21.14
	NND-IV	6.045	205.0	34.0	40.3	78.54

\* Total enzyme activity was estimated in the pooled peaks.

\*\* Percent contribution to the total protein and enzyme activity loaded onto the columns.

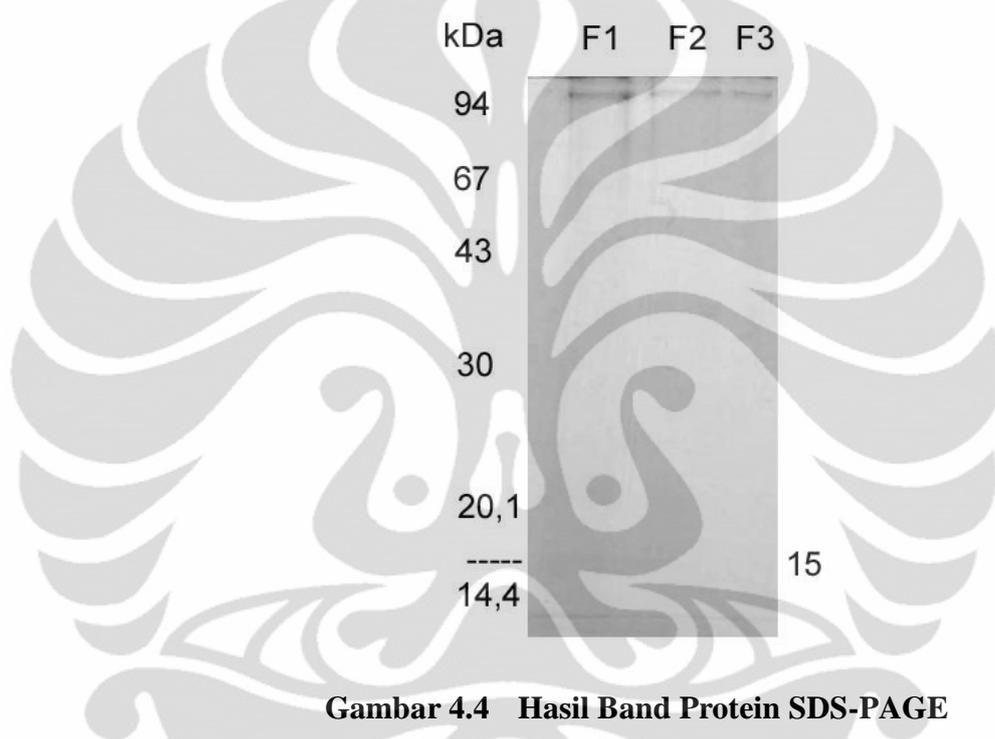
(Satish *et al.*, 2004)

#### 4.6 Hasil Uji SDS-PAGE

Protein biasanya 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.

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

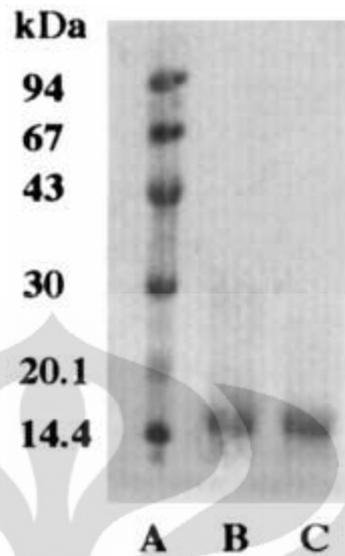
memperlambat migrasi molekul protein yang dikehendaki. Protein-protein tersebut tidak berada pada larutan biasa tetapi pada larutan yang mengandung deterjen yang bermuatan negatif sangat kuat, yakni Sodium Dodesil Sulfat (SDS). Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen.



**Gambar 4.4 Hasil Band Protein SDS-PAGE**

Fosfolipase- $A_2$  mempunyai band protein 15 kDa (Shiomi *et al.*, 1997). Sehingga hasil dari SDS-PAGE membuktikan adanya band tersebut sebagai hasil pemurnian PLA<sub>2</sub>. Pada gel hanya terlihat sepintas tipis pada band 15 kDa, ini dikarenakan sampel protein terlalu encer. Sampel sebanyak 50 gr dimasukkan sebanyak 100 ml bufer fosfat 0,01 M, pH 7.0 membuat band protein terlihat samar-samar.

Pada penelitian Shiomi juga didapatkan hasil yang sama pada Gambar 4.5 menunjukkan band protein 15 kDa pada AP-PLA<sub>2</sub>-I dan AP-PLA<sub>2</sub>-II. Jalur A merupakan protein standar dan jalur B dan C berturut-turut adalah AP-PLA<sub>2</sub>-I dan AP-PLA<sub>2</sub>-II.



**Gambar 4.5 SDS-PAGE Penelitian Shiomi**

(Shiomi *et al.*, 1997)

Pada penelitian yang dilakukan Shiomi, racun diambil dari spesies yang sama yaitu *A. planci* menggunakan duri sebanyak 227 gr yang diekstrak dua kali menggunakan bufer fosfat 0,01 M, pH 7.0 sehingga racun yang dikeluarkan (terbilas) ke dalam sampel lebih banyak dan lebih pekat membuat penampakan pada SDS-PAGE lebih nyata dibandingkan dengan hanya dengan sekali ekstrak menggunakan dua kali volume dari berat sampel (50 gr) di penelitian ini.

## BAB V KESIMPULAN

Enzim papain yang digunakan sebagai kontrol positif metode penelitian ini berhasil diekstrak, hasilnya ditunjukkan secara kualitatif dengan sampel fraksi ammonium sulfat yang terlihat lebih pekat dibandingkan dengan blanko yang lebih jernih. Setiap fraksi memberikan kejernihan berbeda-beda sebagai bukti fraksinasi ammonium sulfat mampu memisahkan enzim papain.

Metode sederhana yang digunakan yaitu dengan pemanasan *crude venom* setinggi 60°C yang diteruskan dengan pengendapan fraksinasi ammonium sulfat 20, 40, 60 dan 80%. Tujuan dari pemanasan ini untuk mendenaturasi protein-protein lain yang terkandung dalam sampel yang umumnya tidak tahan terhadap panas, karena enzim PLA<sub>2</sub> termasuk enzim yang stabil terhadap panas yaitu 75°C selama 4 menit (Karasudani *et al.*, 1997). Enzim PLA<sub>2</sub> yang diekstrak dari duri *A. planci* sebanyak 50 gr didapatkan aktivitas tertinggi pada F1 (fraksi 20%) sebanyak 108,48 unit/mg dengan tingkat kemurnian 20,75 kali lebih besar dari *crude venom* (racun kasar). Band protein terlihat samar-samar berkisar pada 15 kDa pada SDS-PAGE.

Umumnya pemurnian enzim menggunakan berbagai macam jenis kromatografi dan berulang-ulang dilakukan tergantung dari sampelnya dimana kromatografi termasuk cara pemurnian yang relatif mahal dan rumit untuk dilakukan. Metode ini memberikan keefektifan yang sama dan jauh lebih murah dan mudah dibandingkan penelitian yang pernah dilakukan oleh Shiomi (1997) terhadap spesies yang sama (*A. planci*). Pada penelitian Shiomi yang berjudul “Purification and Properties of Phospholipases-A<sub>2</sub> from the crown-of-thorns Starfish (*Acanthaster planci*) Venom” didapatkan tingkat kemurnian yang sama yaitu sebesar 20 kali *crude venom* menggunakan CM-selulosa, kromatografi Phenyl Sepharose CL-4B, superose 12, TSKgel ODS-120T.

Sehingga bisa disimpulkan metode ini mampu memberikan keefektifan yang sama dan secara keekonomisan jauh lebih murah dibandingkan penelitian yang pernah dilakukan (Shiomi *et al.*, 1997). Hal-hal yang bisa ditingkatkan untuk mendapatkan kemurnian yang lebih baik dan penampakan pada SDS-PAGE yang

lebih jelas dari metode penelitian ini adalah cara mengekstrakkan racun dari duri, penambahan jumlah sampel, dan pelarut bufer fosfat yang secukupnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Deutscher, Murray. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington : University of Connecticut Health Center.
- De'ath, G. and P.J. Moran. 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, Muhamad. 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-A<sub>2</sub> 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-A<sub>2</sub> 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 A<sub>2</sub> from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom. Elsevier. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 143 (2006) 54 – 60.
- Sallau A.B., Ibrahim M.A., Salihu A., Patrick F.U. Characterization of phospholipase-A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) from *Echis ocellatus* venom. Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria-Nigeria.
- Satish, S. 2004. Purification of a Class B1 platelet aggregation inhibitor phospholipase-A<sub>2</sub> 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.

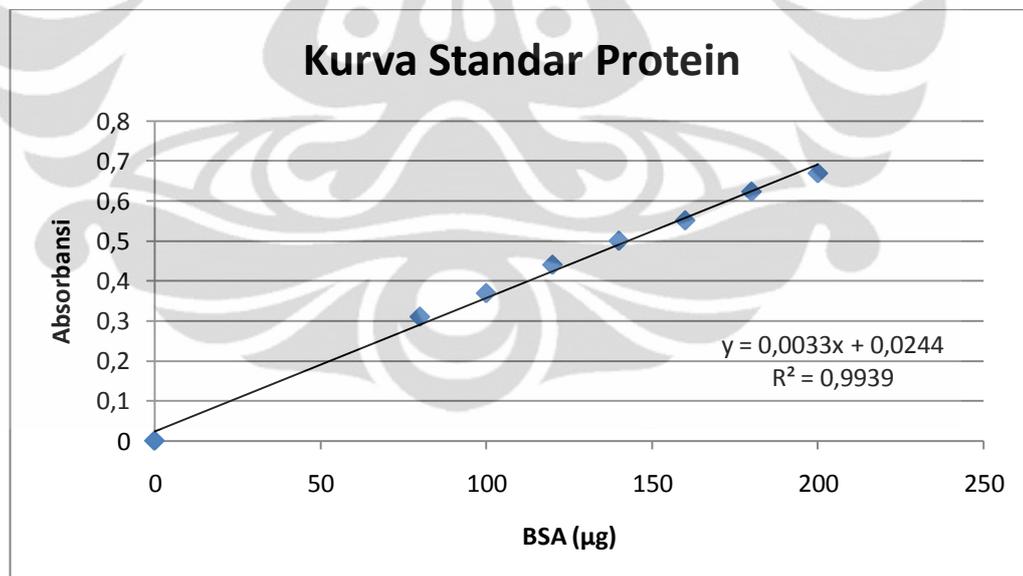
Shiomi K, Midorikawa S, Ishida M, Nagashima Y, Nagai H. Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*, are deoxyribonucleases II. *Toxicon*. 2004;44:499–506.

## LAMPIRAN A

### Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

**Tabel Kurva Standar**

Tabung	BSA ( $\mu\text{g}$ )	Abs <sub>750</sub>
1	0	0
2	80	0,31
3	100	0,369
4	120	0,44
5	140	0,5
6	160	0,551
7	180	0,623
8	200	0,669



**Gambar Kurva Standar Protein BSA**

#### Penentuan Kadar Protein Sampel

Kurva standar protein antara absorbansi pada panjang gelombang 750 nm dan kadar protein ( $\mu\text{g}$ ) didapat persamaan garis

$$y = 0,0033x + 0,0244$$

Dengan y adalah nilai absorbansi sampel dan x adalah nilai kadar protein dalam  $\mu\text{g}$ .

Contoh perhitungan :

Absorbansi sampel crude venom (CV) sebesar 0,31, maka kadar proteinnya

$$x = \frac{0,31 - 0,0244}{0,0033}$$

Maka didapat kadar CV sebesar 86,54  $\mu\text{g}$ , karena sampel yang digunakan sebesar 50  $\mu\text{l}$ , maka 86,54  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} = 1,73 \text{ mg/ml}$

**Tabel Kadar Protein Enzim**

Sampel	Absorbansi	Berat protein ( $\mu\text{g}$ )	Kadar protein (mg/ml)
CV	0,393	86,55	1,73
PV	0,346	72,30	1,45
F1	0,196	26,85	0,54
F2	0,453	104,73	2,09
F3	0,606	151,09	3,02
F4	1,128	309,27	6,19
F5	0,568	139,58	2,79

## **LAMPIRAN B**

### **Penentuan Aktivitas Spesifik PLA<sub>2</sub>**

#### **Unit (abs/menit)**

1 unit didefinisikan sebagai jumlah serapan yang berkurang 0,01 absorbansi pada panjang gelombang 900 nm per menit.

Contoh sampel CV selama 5 menit berkurang 0,116 absorbansi, sehingga  $0,166 \text{ absorbansi} / (5 \text{ menit} \cdot 0,01) = 2,33 \text{ unit}$

$2,33 \text{ unit} - 0,52 \text{ unit (blanko)} = 1,81 \text{ unit}$

#### **Aktivitas Enzim (unit/ml)**

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai unit per ml sampel enzim PLA<sub>2</sub> yang digunakan.

Contoh : aktivitas sampel CV =  $1,81 \text{ unit} / 0,2 \text{ ml} = 9,05 \text{ unit/ml}$

#### **Unit Total (unit)**

Merupakan aktivitas keseluruhan sampel enzim PLA<sub>2</sub> yang didapat.

Contoh : unit total sampel CV = aktivitas x volume total sampel enzim =  $9,05 \text{ unit/ml} \times 107 \text{ ml} = 968,35 \text{ unit}$

#### **Jumlah Protein Total (mg)**

Merupakan jumlah protein keseluruhan yang terdapat dalam sampel enzim yang telah ditentukan sebelumnya (dari metode Lowry)

Contoh : jumlah protein CV = konsentrasi sampel CV x volume total CV =  $1,73 \text{ mg/ml} \times 107 \text{ ml} = 185,20 \text{ mg}$

#### **Aktivitas Spesifik (unit/mg)**

Aktivitas spesifik didefinisikan sebagai unit total per protein total (mg).

Contoh : aktivitas spesifik CV =  $968,35 \text{ unit} / 185,20 \text{ mg} = 5,23 \text{ unit/mg}$

**Tingkat Kemurnian Enzim**

Tingkat kemurnian enzim didefinisikan sebagai perbandingan antara aktivitas spesifik enzim yang telah dimurnikan dan aktivitas spesifik *crude venom* (CV).

Contoh aktivitas spesifik CV dan PV berturut-turut adalah 5,23 unit/mg dan 6,22 unit/mg, maka tingkat kemurnian sampel PV adalah  $6,22/5,23 = 1,19$



Sampel	Kons.protein mg/ml	Vol.total (ml)	Unit	Aktivitas (unit/ml)	Aktivitas total (unit)	Protein total (mg)	Akt.spesifik (unit/mg)	Tingkat kemurnian
CV	1,73	107	1,81	9,05	968,35	185,21	5,23	1
PV	1,45	101	1,8	9	909	146,05	6,22	1,19
F1	0,54	5	11,65	58,25	291,25	2,68	108,48	20,75
F2	2,09	5	6,89	34,45	172,25	10,47	16,45	3,15
F3	3,02	5	1,76	8,8	44	15,11	2,91	0,56
F4	6,19	5	2,86	14,3	71,5	30,93	2,31	0,44

**TABEL HASIL PEMURNIAN ENZIM**