



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKTRAKSI, PEMURNIAN DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERIAL RACUN DURI *Acanthaster planci*
PERAIRAN MALUKU DAN PAPUA**

SKRIPSI

SKRIPSIHANA IHTIARTO

0706270075

**FAKULTAS TEKNIK
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA
DEPOK
JUNI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKTRAKSI, PEMURNIAN DAN UJI AKTIVITAS
ANTIBAKTERIAL RACUN DURI *Acanthaster planci*
PERAIRAN MALUKU DAN PAPUA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

SKRIPSIHANA IHTIARTO

0706270075

**FAKULTAS TEKNIK
DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA**

DEPOK

JUNI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Skripsihana Ihtiarto

NPM : 0706270075

Tanda Tangan : 6 Juli 2011

Tanggal :



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Skripsihana Ihtiarto

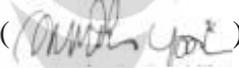
NPM : 0706270075

Program Studi : Teknik Kimia

Judul Skripsi : Ekstraksi, Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakterial
Raun Duri *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Papua

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Teknik pada Program Studi Teknik Kimia 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 : Dianursanti, ST., MT ()

Penguji : Dr. Ing. Misri Gozan, M. Tech ()

Penguji : Ir. Tania Surya Utami, MT ()

Ditetapkan di : Departemen Teknik Kimia

Tanggal : 28 Juni 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena 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, Teh Rini, Teh Suri, Teh Ninu, Teh Neng, dan Mas Munir yang telah memberikan kesempatan untuk belajar lebih banyak di LIPI
4. Dewan penguji, Dr. Misri Gozan, Ibu Dianursanti, dan Ibu Tania atas masukan yang banyak diberikan.
5. Ayah dan Ibu yang sangat ingin penulis bahagiakan. Terima kasih atas dukungan, kasih sayang, dan doa yang diberikan.
6. Toni, dan Mbak Yusnita. Terimakasih untuk berbagi ilmu dan kebersamaannya.
7. Teman-teman angkatan 2007 atas kebersamaan dan pertemanannya selama ini.
8. Tim Riset Mikroalga, Biofilter, yang telah banyak mengajarkan mengenai penelitian.
9. 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, 23 Juni 2011

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Skripsihana Ihtiarto
NPM : 0706270075
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 Noneklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Ekstraksi, Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakterial Racun Duri *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Papua

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 : 23 Juni 2011
Yang menyatakan



(Skripsihana Ihtiarto)

ABSTRAK

Nama : Skripsihana Ihtiarto
Program Studi : Teknik Kimia
Judul : **Ekstraksi, Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakterial Racun Duri *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Papua**

Ledakan populasi bintang laut berduri *Acanthaster planci* telah menyebabkan kerusakan sistem terumbu karang dalam jumlah yang signifikan di wilayah Indo-Pasifik. Usaha kontrol populasi yang dilakukan banyak menghabiskan biaya sementara kandungan enzim Fosfolipase A2 (PLA2) dalam racun duri *A.planci* yang merupakan molekul efektor penting pertahanan sel belum dimanfaatkan lebih lanjut. Berbagai penelitian mengenai PLA2 *A.planci* sebagai antibiotik muncul menjadi langkah awal solusi mendatangkan nilai tambah dalam permasalahan yang dihadapi. Penelitian ini bertujuan mengetahui ada tidaknya sifat antibakteri PLA2 *A.planci* terhadap bakteri uji. Melalui metode pemurnian parsial kombinasi presipitasi ammonium sulfat dan pemanasan, penelitian ini berhasil mendapatkan ekstrak racun dengan kemurnian PLA2 tertinggi 2.29 kali *crude venom*. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi menunjukkan bahwa enzim PLA2 duri bintang laut *Acanthaster planci* memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri gram positif *B. subtilis*, *M. luteus*, dan *S. aureus*.

Kata Kunci:
Acanthaster planci, Fosfolipase A2, Uji Antibakteri

ABSTRACT

Name : Skripsihana Ihtiarto
Study Program: Chemical Engineering
Title : **Extraction, Purification and Antibacterial Activity Test of *Acanthaster planci* Spine's Venom from Maluku and Papua**

Population outbreaks of the Crown-of-Thorns starfish, *Acanthaster planci*, have been known to cause considerable amounts of damage to coral reef systems in Indo-Pacific region. Population control already spent a lot of costs while the content of phospholipase A2 (PLA2) enzyme in the venom *A.planci* which is an important effector molecule of the cell's defense has not been exploited further. Various studies on PLA2 *A.planci* as antibiotics have been conducted and became the first step to give added value solutions to the problems faced. Using partial purification method combining ammonium sulfate precipitation and heating, this research successfully obtained venom extract with the highest purity of PLA2 2.29 times compare to crude venom. The test results of antibacterial activity by the diffusion method showed that the PLA2 enzyme of *Acanthaster planci* have antibacterial properties against gram-positive bacteria *B. subtilis*, *M. luteus*, and *S. aureus*.

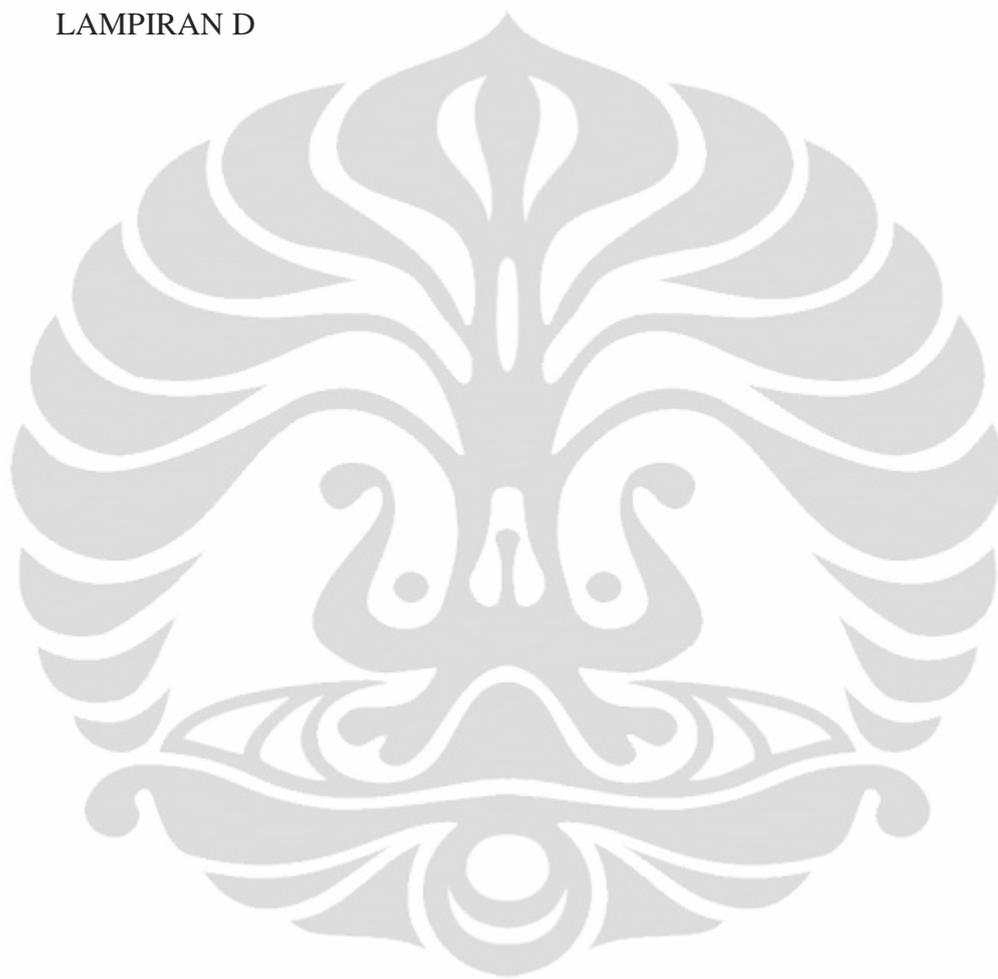
Keywords:
Acanthaster planci, Phospholipase A2, Antibacterial test

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	2
1.4. Batasan Masalah.....	3
1.5. Tempat dan Waktu Penelitian	3
1.6. Sistematika Penulisan.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. <i>Acanthaster Planci</i>	5
2.2. Bakteri	7
2.2.1. Komponen sel bakteri	7
2.2.2. Struktur Dinding Sel Bakteri.....	7
2.3. <i>Bacillus subtilis</i>	8
2.4. <i>Micrococcus luteus</i>	9
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.6. Enzim	10
2.7. Aktivitas Enzim.....	11
2.8. Fosfolipase A2	11
2.9. Mekanisme Antibakteri Enzim Fosfolipase A2	12
2.9.1. Mekanisme Melarutkan Komponen Membran	12
2.9.2. Mekanisme Permeabilitas Umum	14
2.10. Penelitian Enzim PLA2 Sebelumnya (<i>State of the Art</i>)	15
2.11. Isolasi Enzim.....	17

2.11.1. Sonikasi.....	18
2.11.2. Pemanasan Protein	18
2.11.3. Pemisahan Protein dengan Pengendapan oleh Garam	19
2.11.4. Sentrifugasi	20
2.12. Spektrofotometri UV-Vis.....	20
2.13. Uji Aktivitas Enzim Fosfolipase A2	21
2.14. Uji Kadar Protein Lowry.....	21
2.15. Elektroforesis SDS - PAGE	21
2.16. Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	22
3. METODE PENELITIAN	24
3.1. Tahap Ekstraksi Racun.....	25
3.2. Uji Sifat Antikoagulan Racun	26
3.3. Fraksinasi Amonium Sulfat	26
3.4. Uji Aktivitas PLA2	27
3.5. Pengujian Kandungan Protein (Lowry)	28
3.6. <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i>	29
3.7. Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	31
3.7.1. Peremajaan Bakteri	31
3.7.2. Pembuatan <i>Nutrient Agar</i> dan Cair	31
3.7.3. Sterilisasi Alat dan Bahan	32
3.7.4. Pemeliharaan Mikroba Uji dalam <i>Nutrient Cair</i>	32
3.7.5. Penanaman Mikroba Uji ke dalam Cawan Petri	32
3.7.6. Pengujian Aktivitas Antibakteri Racun.....	32
3.8. Alat dan Bahan.....	33
3.8.1. Peralatan.....	33
3.8.2. Bahan-bahan.....	33
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1. Ekstraksi Racun <i>Acanthaster planci</i>	35
4.3. Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan	36
4.3. Pemurnian Kandungan Enzim Fosfolipase A2.....	37
4.3.1. Tahap Pemanasan.....	38
4.3.2. Fraksinasi Ammonium Sulfat	38
4.4. Hasil Uji Kandungan Protein (Lowry)	39
4.5. Hasil Uji Aktivitas Fosfolipase A2 (PLA2)	41
4.6. Hasil Uji SDS-PAGE	46

4.7. Hasil Uji Antibakteri	48
5. KESIMPULAN.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN A	
LAMPIRAN B	
LAMPIRAN C	
LAMPIRAN D	



DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Beberapa Penelitian Enzim PLA2 Sebelumnya.....	15
Tabel 3. 1 Metode Penentuan Kadar Protein (Lowry)	29
Tabel 4. 1 Kandungan Protein Sampel Racun Duri <i>A.planci</i> Papua.....	39
Tabel 4. 2 Kandungan Protein Sampel Racun Duri <i>A.planci</i> Maluku	40
Tabel 4. 3 Aktivitas Spesifik Fraksi Pemurnian Racun Duri <i>A. planci</i>	44
Tabel 4. 4 Komparasi Aktivitas Spesifik Ekstrak Racun Duri <i>A.planci</i> Maluku..	45
Tabel 4. 5 Komparasi Aktivitas Spesifik PLA2 dan antibakteri.....	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 <i>Acanthaster planci</i>	5
Gambar 2. 2 <i>Bacillus subtilis</i>	8
Gambar 2. 3 <i>Micrococcus luteus</i>	9
Gambar 2. 4 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Gambar 2. 5 Efek Katalis Terhadap Penurunan Energi Aktivasi Reaksi.....	10
Gambar 2. 6 Mekanisme Kerja PLA2.....	12
Gambar 2. 7 Mekanisme Melarutkan Komponen Membran	13
Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian	24
Gambar 3. 2 Diagram Alir Ekstraksi <i>Crude Venom A. planci</i>	25
Gambar 3. 3 Diagram Alir Fraksinasi Amonium Sulfat	26
Gambar 3. 4 Diagram Alir Uji Aktivitas PLA2	27
Gambar 3. 5 Diagram Alir Uji Lowry.....	28
Gambar 3. 6 Penyusunan Plate pada SDS-PAGE.....	29
Gambar 4. 1 Duri <i>A. planci</i> Siap Ekstrak.....	35
Gambar 4. 2 Aktivitas Antikoagulan Ekstrak Racun Duri <i>A. planci</i>	37
Gambar 4. 3 Penurunan Absorbansi Substrat (Sampel Papua)	42
Gambar 4. 4 Penurunan Absorbansi Substrat (Sampel Maluku)	42
Gambar 4. 5 Hasil SDS-PAGE Racun Duri <i>A.planci</i> Perairan Papua	47
Gambar 4. 6 Hasil SDS-PAGE Racun Duri <i>A.planci</i> Perairan Maluku.....	47
Gambar 4. 7 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Racun (CV).....	49
Gambar 4. 8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fraksinasi dan Propolis	51

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Acanthaster planci atau yang biasa dikenal sebagai bintang laut berduri *A.planci*, merupakan salah satu spesies penghuni dan pemakan terumbu karang. Selain dapat menjadi pengendali pertumbuhan karang yang terlalu cepat, keberadaannya juga dapat menjadi hama pemusnah karang. Kini, bintang laut *A.planci* menjadi salah satu masalah besar yang dihadapi di dalam pengelolaan terumbu karang akibat terjadinya ledakan populasi. Ledakan populasi ini disebabkan oleh aktivitas manusia yang telah mengurangi tingkat pemangsaan bintang laut ini melalui kegiatan menjala ikan yang berlebihan termasuk di dalamnya ikan pemangsa *A.planci* (Sweatman. 1997). Kerusakan terumbu karang akibat *A.planci* telah dilaporkan di seluruh dunia, misalnya Jepang, Australia, Palau, Guam, Vanuatu, Papua, Vietnam dan Indonesia. Pada saat terjadi peledakan populasi, kepadatan *A.planci* sekitar 158 individu dewasa per 314 m² (Moran. 1990)

Kerusakan terumbu karang yang dapat ditimbulkan oleh bintang laut ini sangat besar sehingga pengelolaannya membutuhkan dana yang besar pula. Di Pulau Ryuku, Jepang, pengelolaan bintang laut *Acanthaster planci* telah menelan biaya JPY 600 juta untuk memusnahkan 13 juta bintang laut antara tahun 1970-1983 (Yamaguchi. 1986). Pada perairan sekitar Cairns-Whitsunday, GBR, peledakan populasi *A.planci* juga telah menelan biaya AUD 3 juta untuk pengendalian populasi selama setahun pada tahun 2001 (CRC. 2003). Di Indonesia, peledakan populasi (*outbreak*) bintang-laut ini pernah dilaporkan di beberapa tempat, salah satunya terjadi di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan (Yusuf. 2008).

Dalam banyak penelitian yang telah dilakukan sebelumnya diketahui bahwa racun dari duri *A.planci* ternyata mengandung protein *phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 2* atau sering disebut Fosfolipase A2 (PLA2) golongan IIA. Protein ini banyak ditemui dalam racun ular dan mamalia lainnya yang berperan sebagai molekul efektor begitu penting dalam ketahanan tubuh. Melihat potensi ini, sebagai solusi pengurangan populasi *A.planci* sekaligus memanfaatkan potensi

yang ada maka dalam penelitian sebelumnya di tahun 2011 oleh Savitri *et al* telah dilakukan uji coba metode efisien dalam mengekstrak racun dari *A.planci* dan memurnikan kandungan enzim PLA2 di dalamnya.

Dalam pengembangannya, PLA2 yang diperoleh dapat digunakan sebagai antibiotik atau antibakteri untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri dimana saat ini resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antibiotik telah menjadi perhatian yang utama terkait ekstensifitas penggunaan klinis antibiotik konvensional (Bornomo. 2000). Sifat antibakteri yang dimiliki PLA2 ini didasarkan pada kemampuan PLA2 untuk menghidrolisis komponen fosfolipid membran sel bakteri sehingga bakteri mengalami lisis dan kemudian mati. Berbagai jenis PLA2 dari terbukti lebih efektif untuk mematikan bakteri jenis gram-positif secara *in vitro* (Koduri *et al.* 2002) namun tidak dengan gram negatif. Beberapa jenis bakteri yang tergolong gram positif yang dapat dijadikan target uji antibakteri adalah *Basillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, dan *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini menjadi studi awal eksplorasi sifat antibakteri yang dimiliki racun *A.planci* tersebut. Penelitian dimulai dari mulai proses ekstraksi racun *A.planci*, pemurnian, hingga pengujian aktivitas racun sebagai basis standar pengujian antibakteri setelahnya. Pengujian antibakteri menggunakan metode difusi cakram sebatas kualitatif untuk melihat ada tidaknya zona bening pada bakteri di sekeliling cakram sampel yang telah ditetesi ekstrak racun *A.planci*.

1.2. Perumusan Masalah

- Apakah ekstrak racun dari *Acanthaster planci* memiliki aktivitas antibakteri?
- Bagaimanakah tingkat kemurnian PLA2 dalam ekstrak racun dari *A.planci* sebelum, setelah melalui berbagai tahap pemurnian dan pengaruh tingkat kemurnian terhadap aktivitas antibakteri?

1.3. Tujuan Penelitian

- Mengekstrak racun dari *A.planci* dari perairan Maluku dan Papua.
- Memurnikan kandungan PLA2 dalam ekstrak racun dari *A.planci*.

- Mengetahui tingkat kemurnian dan aktivitas antibakteri enzim PLA2 dalam ekstrak racun yang dihasilkan.
- Membandingkan dan menganalisis aktivitas antibakteri racun dari *A.planci* dari kedua perairan pada dosis yang divariasikan.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah yang dibahas pada penelitian ini mencakup sebagai berikut.

- *A.planci* diambil dari perairan Maluku dan Papua pada Bulan April 2011.
- Metode ekstraksi yang dipakai mengacu ke metode Savitri *et al*, 2011.
- Uji aktivitas untuk kandungan enzim PLA2 menggunakan metode Marinetti, 1965.
- Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry.
- Identifikasi komponen protein menggunakan SDS-PAGE.
- Pengujian aktivitas antibakteri sebatas uji kualitatif secara *in vitro* untuk jenis bakteri *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*.

1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat: - Laboratorium Bioproses, Gedung Departemen Teknik Kimia Lt.4
Departemen Teknik Kimia, FTUI, Depok.
- Laboratorium Mikrobiologi Puslit Biologi, LIPI, Cibinong.

Waktu : Maret-Mei 2011

1.6. 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*, Bakteri, fosfolipase A2, Teknik isolasi protein, dan uji antibakteri.

BAB III. METODE PENELITIAN

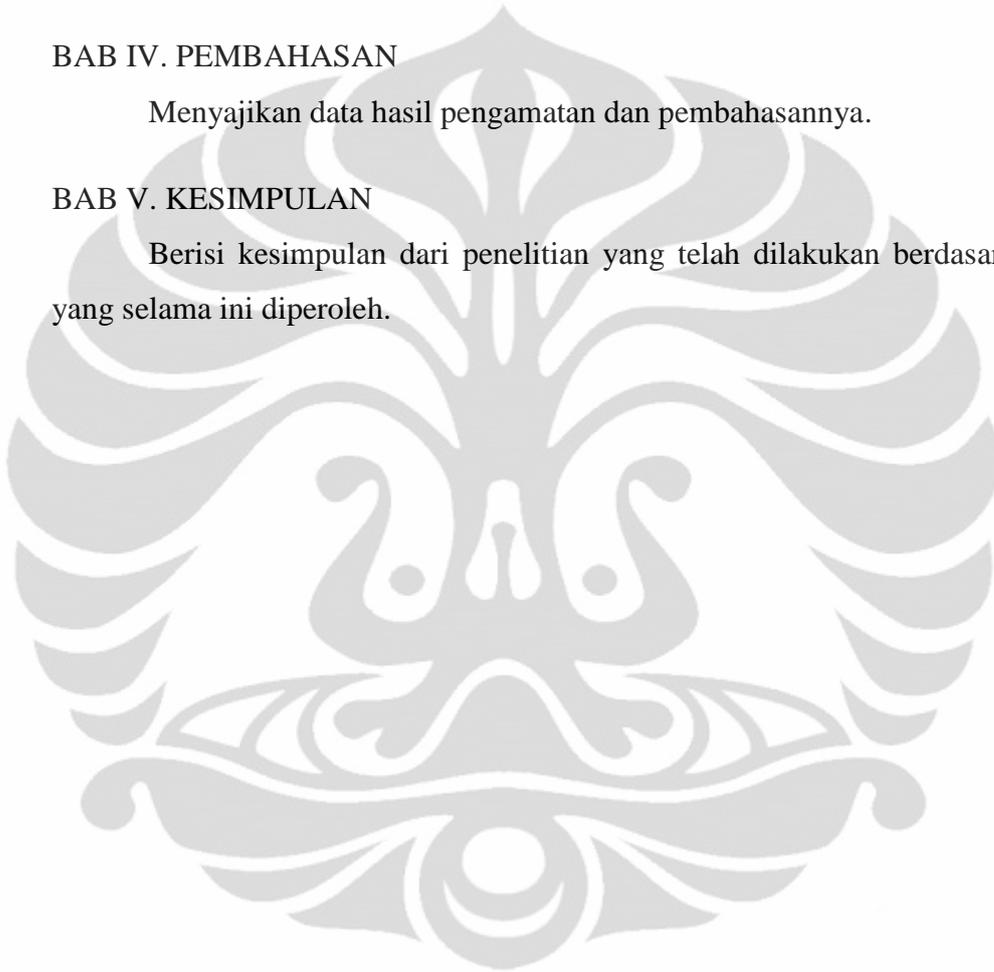
Metode penelitian berisi diagram alir penelitian, prosedur penelitian, alat dan bahan yang dipakai.

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

2.1. *Acanthaster Planci*

Acanthaster planci merupakan sejenis bintang laut yang bagian tubuhnya diselubungi duri beracun. Bintang laut jenis ini hidup di daerah yang lebih terlindungi seperti laguna, atau di perairan yang lebih dalam disepanjang daerah terumbu karang. Klasifikasi ilmiah dari *Acanthaster planci* adalah :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Asterozoa
Orde	: Spinulosida
Famili	: Acanthasteridae
Genus	: <i>Acanthaster</i>
Spesies	: <i>Acanthaster planci</i> (http://www.itis.gov)

Genus *Acanthaster* terdiri dari tiga spesies yaitu *Acanthaster planci*, *Acanthaster ellisi* dan *Acanthaster berrypinnus*. Umumnya *Acanthaster planci* memakan karang jenis *Pocilloporidae*, *Acroporidae* dan *Favidae*, dan menghindari karang yang memiliki hewan simbiosis kepinging *Trapezia* atau udang *Alpheus* yaitu karang *poritidae*.



Gambar 2. 1 *Acanthaster planci* (A) Perairan Maluku (B) Perairan Papua

Struktur tubuh *A.planci* sama dengan struktur umum dari *Asteroidea* dengan tubuh yang berbentuk radial simetris, mirip cakram bersumbu oral dan aboral yang mempunyai lengan-lengan. Bagian oral (mulut) menghadap ke bawah sedangkan bagian aboral menghadap ke atas. Di bagian aboral terdapat

madreporit dan anus. Lubang madreporit berjumlah 6-13, sedangkan lubang anus berjumlah 1-6 buah. Bintang laut *A.planci* mempunyai lengan antara 8-21 buah. Duri-duri yang beracun berukuran 2-4 cm menghiasi permukaan aboral tubuh cakram dan lengan-lengannya.

Bintang laut *A.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 di luar. Metode pencernaan ini bisa membuat bintang laut ini mencerna karang dengan area luas dalam waktu relatif singkat. Torehan luka berwarna putih 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. 1972). Di lain pihak mengurangi habitat untuk kebanyakan spesies terumbu karang dan dampak negatif sistem terumbu karang.

2.2. Bakteri

Merupakan sel prokariotik yang khas, uniselular dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran di dalam sitoplasmanya. Organisme ini sangat luas penyebarannya dalam dan pada permukaan bumi, di atmosfer, dan di lingkungan sehari - hari (Pelczar. 1986).

2.2.1. Komponen sel bakteri

Dibandingkan dengan sel eukariot, bakteri memiliki stuktur sel yang lebih sederhana, antara lain:

a. Dinding sel

Merupakan struktur yang sangat penting bagi pertahanan bentuk dan integritas sel bakteri. Fungsi primer dari dinding sel adalah menyediakan komponen yang kuat, kompleks secara struktural yang tahan terhadap tekanan osmotik yang disebabkan oleh konsentrasi ion anorganik yang tinggi dalam zat kimia. Sebagian besar bakteri memiliki dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan yang merupakan makromolekul besar mengandung rantai polisakarida bersilangan dengan jembatan peptida pendek.

b. Membran sitoplasma

Membran sitoplasma adalah fosfolipid bilayer dengan protein yang tersebar secara acak. Terlibat dalam transportasi berbagai zat dan fungsi enzim yang terhubung dengan membran.

c. Sitoplasma

Berisi 80% air, juga terdapat enzim - enzim yang membentuk ATP dengan cara oksidasi dari glukosa dan sumber karbon lainnya. Juga mengandung enzim yang terlibat untuk pembentukan peptidoglikan. Ribosom dan genom DNA (nukleoid) dan granula - granula inklusi juga terdapat di sitoplasma.

d. Plasmid

Sangat kecil, merupakan kepingan dari DNA untai ganda di luar kromosom. Mampu bereplikasi dan mengkode fungsi - fungsi yang biasanya tidak diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Salah satu fungsinya adalah untuk mengkode resistensi antibiotik. Plasmid dapat ditransfer ke organisme lain dan sesama spesiesnya.

e. Ribosom

Ribosom pada bakteri tidak terikat dengan struktur membran karena retikulum endoplasma tidak ada di dalam sel bakteri. Memiliki ukuran ribosom yang lebih kecil daripada ribosom sel eukariot.

f. Granula inklusi

Merupakan tempat penyimpanan material yang tersusun atas karbon, nitrogen, sulfur atau fosfor. Materi yang disimpan akan dibentuk kemudian digunakan di lingkungan yang memiliki nutrisi yang terbatas.

2.2.2. Struktur Dinding Sel Bakteri

Bakteri dapat dibagi atas 2 tipe berdasarkan yang ditemukan oleh Crishtian Gram pada tahun 1884. Bakteri gram positif mengikat zat warna violet dengan kuat, sedangkan bakteri gram negatif melepaskannya setelah dicuci dengan alkohol. Hal ini merupakan dasar perbedaan struktur dinding sel dari kedua tipe bakteri (Pape and Rehm. 1985).

Dinding sel bakteri mengandung kerangka polisakarida berupa molekul N-asetil Glukosamin dan N-asetil Muramic acid yang berikatan lurus melalui ikatan β -1-4. Kerangka polisakarida ini berikatan silang dengan rantai peptida yang

mengandung asam amino yang bervariasi antara satu spesies dengan spesies yang lain. Komplek yang terbentuk antara kerangka polisakarida dengan polipeptida yang terikat secara silang disebut peptidoglikan yang merupakan struktur dasar dari dinding sel bakteri.

Perbedaan struktur dinding sel menentukan penetrasi, ikatan dan aktivitas senyawa antibakteri (Jawetz dkk. 2005). Dinding sel bakteri gram positif mengandung 90% peptidoglikan sedangkan bakteri gram negatif hanya 20%. Diluar dinding sel bakteri gram negatif terdapat membran luar yang mengandung komplek lipopolisakarida-fosfolipid protein yang distabilkan oleh ion magnesium dan ion kalsium. Membran luar berfungsi melindungi sel bakteri terhadap masuknya zat kimia yang bersifat toksis seperti disinfektan atau antibiotik. Bakteri gram positif tidak memiliki membran luar sehingga tidak ada penghalang (*barrier*) yang permeable terhadap masuknya molekul antibiotik, di samping itu kompleks peptidoglikan asam teikoat atau asam teikuronat dari bakteri gram positif berupa struktur berpori sehingga memungkinkan masuknya molekul berukuran besar (Pape and Rehm. 1985)

2.3. *Bacillus subtilis*



Domain : Bacteria
 Filum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Orde : Bacillales
 Famili : Bacillaceae
 Genus : *Bacillus*
 Spesies : *B. subtilis*

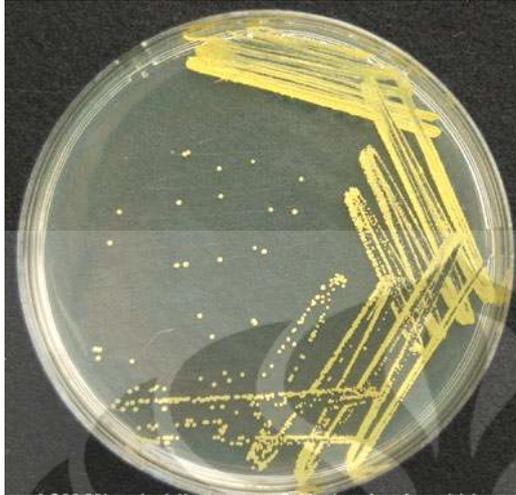
(Sumber: <http://www.uniprot.org>)

Gambar 2. 2 *Bacillus subtilis*

(Sumber: <http://www.microbelibrary.org/>)

Bacillus subtilis adalah bakteri jenis gram positif dengan bentuknya yang seperti batang. Bakteri ini umum ditemukan di tanah dan dapat digolongkan dalam bakteri obligat aerob.

2.4. *Micrococcus luteus*



Domain : Bacteria
 Filum : Actinobacteria
 Kelas : Actinobacteria
 Orde : Actinomycetales
 Famili : Micrococcaceae
 Genus : *Micrococcus*
 Spesies : *Micrococcus luteus*
 (Sumber: <http://www.uniprot.org>)

Gambar 2. 3 *Micrococcus luteus*

(Sumber: <http://www.microbelibrary.org/>)

Micrococcus luteus adalah bakteri gram positif bersifat obligat aerob berbentuk *spherical*. *M luteus* dapat ditemukan di tanah. Debu, air, dan udara. *Micrococcus luteus* merupakan mikroflora normal pada tumbuhan dan kulit mamalia. Selain itu, bakteri ini membentuk koloni di mulut manusia, mukosa, dan saluran pernafasan bagian atas.

2.5. *Staphylococcus aureus*



Domain : Bacteria
 Filum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Orde : Bacillales
 Famili : Staphylococcaceae
 Genus : *Staphylococcus*
 Spesies : *Staphylococcus aureus*
 (Sumber: <http://www.uniprot.org>)

Gambar 2. 4 *Staphylococcus aureus*

(Sumber: <http://www.microbelibrary.org/>)

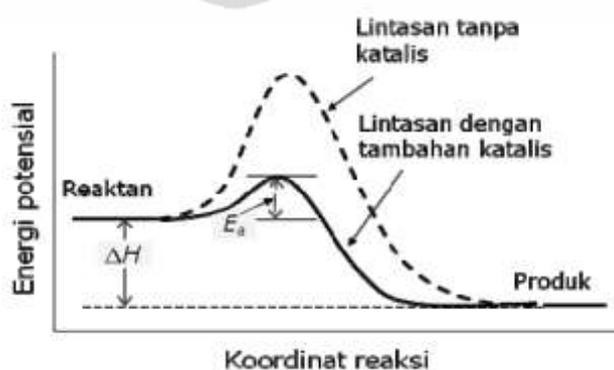
Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif berbentuk *coccus* yang bersifat patogen oportunistik. Bakteri ini menghasilkan pigmen kuning, bersifat aerob fakultatif, tidak menghasilkan spora dan tidak motil, umumnya tumbuh

berpasangan maupun berkelompok, dengan diameter sekitar 0,8 - 1,0 μ m. *Staphylococcus aureus* tumbuh dengan optimum pada suhu 37°C dengan waktu pembelahan 0,47 jam. *Staphylococcus aureus* merupakan mikroflora normal manusia. Secara normal bakteri ini terdapat pada saluran pencernaan, saluran pernafasan, bagian luar alat genital dan kulit.

Staphylococcus aureus patogen dapat menghasilkan enzim ekstraseluler yang bersifat toksis pada inangnya. Enzim ini adalah koagulase, enterotoksin dan hemolisin. Enzim ini dapat merusak sel-sel darah merah dan darah putih serta diare dan penyebab keracunan makanan. Keberadaan bakteri ini pada saluran pernafasan atas dan kulit pada individu jarang menyebabkan penyakit. Infeksi serius seperti penyakit kulit, bisul, kudis, infeksi saluran nafas seperti *pneumonia* dan *bronchitis* akan terjadi ketika resistensi inang melemah karena adanya perubahan hormon; adanya penyakit, luka, atau obat lain yang mempengaruhi imunitas sehingga terjadi pelemahan inang.

2.6. Enzim

Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi kimia. Suatu enzim mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi. Pada reaksi yang dikatalisasi oleh enzim, molekul awal reaksi disebut sebagai substrat, dan enzim mengubah molekul tersebut menjadi molekul-molekul yang berbeda, disebut produk (Campbell dkk. 2002). Lintasan suatu reaksi tanpa katalis akan memiliki energi aktivasi lebih tinggi dari pada lintasan dengan tambahan katalis (Gambar 2.5).



Gambar 2. 5 Efek Katalis Terhadap Penurunan Energi Aktivasi Reaksi

Aktivitas suatu enzim dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan umum, seperti suhu dan pH serta faktor kimiawi tertentu.

2.7. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dengan satuan unit dan definisi dalam standar internasional yang menyatakan bahwa satu unit enzim adalah jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghidrolisis satu μmol substrat per menit pada kondisi pH, komposisi buffer, dan temperatur tertentu (Deutscher. 1990).

2.8. Fosfolipase A2

Fosfolipase A2 (PLA2) merupakan salah satu enzim dari golongan fosfolipase, suatu golongan enzim yang memegang peran penting dalam proses metabolisme. Pada umumnya enzim dari golongan ini mengkatalisis hidrolisis ester dalam fosfolipid sehingga salah satu asam lemaknya terbebaskan (Sindurmata. 1989). Saat ini mamalia yang mengsekresikan PLA2 diklasifikasikan ke dalam grup I, II, V, dan X. Grup II PLA2 kemudian diklasifikasi ke dalam lima jenis (tipe IIA, IIC, IID, IIE, dan IIF) berdasarkan rangkaian utamanya (Karray *et al.* 2011).

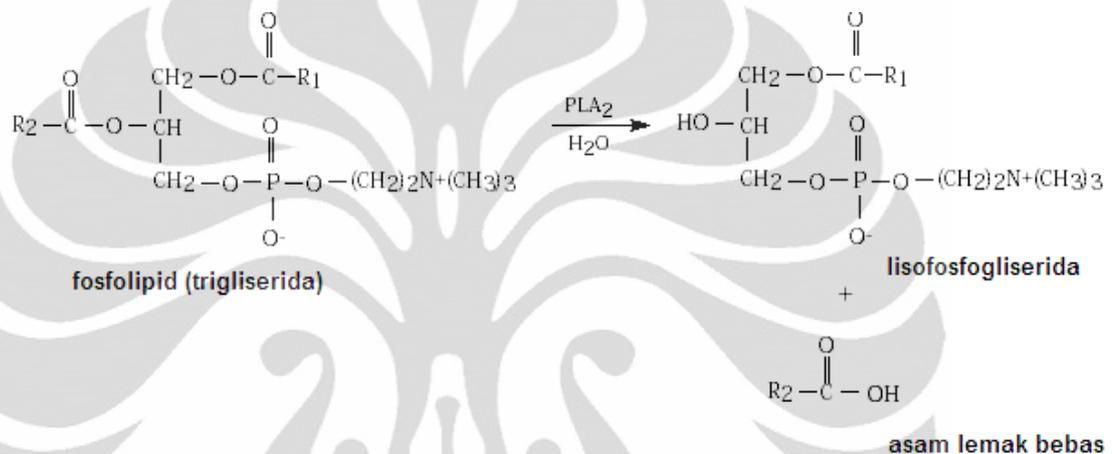
PLA2 berpotensi mengurai asam lemak pada kedudukan atom C2, menghasilkan asam lemak dan derivat liso-1-asid. Enzim ini terlibat dalam beberapa fungsi sel diantaranya mengatur laju suplai asam arakidonat terkait dengan perannya sebagai mediator inflamasi (Nevalainen *et al.* 2000), apoptosis (Capper and Marshall. 2001; Cummings *et al.* 2000; Taketo and Sonoshita. 2002) dan secara efektif membunuh bakteri secara *in vitro* (Koduri *et al.* 2002) dan *in vivo* (Laine *et al.* 1999)

PLA2 tersebar luas dalam jaringan otot hewan dan cairan tubuh (Nevalainen *et al.*, 2000) Sejauh ini purifikasi PLA2 sendiri telah banyak dilakukan menggunakan bahan yang diekstrak dari babi, pankreas kuda, racun lebah dan terutama racun berbagai jenis ular dengan berbagai variasi berat molekul dari 10 hingga 30 kDa (Tu. 1977). Aktivitas di dalam bisa ular tipe pendarahan lebih tinggi daripada yang terdapat di dalam bisa ular tipe

neurotoksik. Dari penelitian lainnya telah diketahui bahwa duri bintang laut *A.planci* pun ternyata mengandung enzim jenis ini.

2.9. Mekanisme Antibakteri Enzim Fosfolipase A2

Mengenai kerja PLA2 sebagai toksin, dijelaskan bahwa PLA2 dapat mengkatalisis hidrolisis fosfolipid yang merupakan komponen penyusun terbesar membran sel pada bakteri gram positif dengan menghasilkan lisofosfogliserida dan asam lemak bebas sebagai berikut (Weltzien, 1979):



Gambar 2. 6 Mekanisme Kerja PLA2

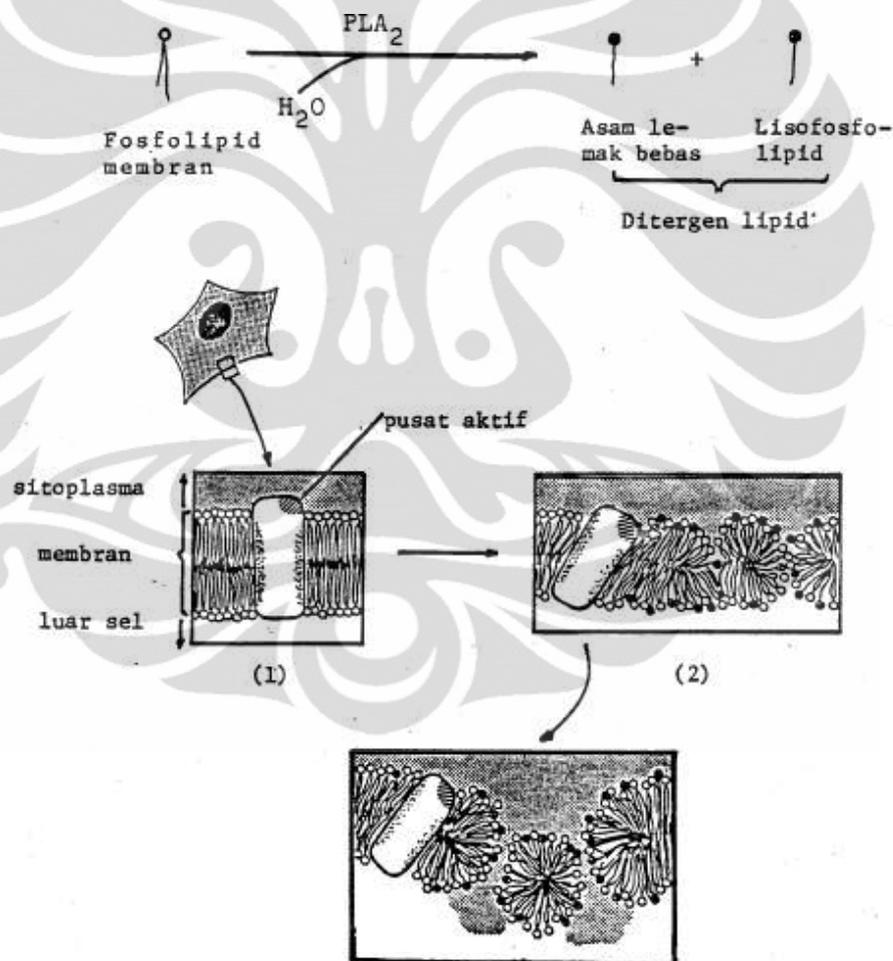
(Sumber: Sindurmata, 1989)

Kedua senyawa tersebut merupakan senyawa lipid ditergen membran aktif, dapat mengubah sifat membran dan aktivitas enzim membran, seperti PLA2 endogen yang merupakan enzim pengendali membran sel (Shier, 1981) dan terletak dalam membran. Selanjutnya senyawa lipid diterjen akan menyebabkan lisis pada membran sel menurut mekanisme berikut:

2.9.1. Mekanisme Melarutkan Komponen Membran

Diketahui bahwa lipid dan protein merupakan bagian komponen membrane sel terbesar. Kebutuhan membran akan terganggu bila terjadi perubahan pada kedua komponen membran tersebut (Shier *et al.* 1981). Pada mekanisme ini, lisis sel sel terjadi sebagai akibat pengaktifan PLA2 endogen oleh toksin PLA2 eksogen. Gambar di bawah memperlihatkan bahwa toksin merusak keteraturan susunan membran sel, karena toksin mengubah konformasi PLA2 endogen di dalam membran. Semua letak pusat aktif PLA2 endogen membran

tersembunyi dari substrat fosfolipid lapis ganda membran oleh protein, gugus polisakarida glikolipid dan interaksi lipid dengan protein membrane (Bever *et al.* 1979). Toksin dapat menyebabkan pusat aktif PLA₂ endogen membran besentuhan langsung dengan substratnya sehingga terjadi reaksi substrat fosfolipid membran dan PLA₂ endogen. Lipid lapis ganda membran terurai menjadi lipid ditergen dalam bentuk butir misel, dan keluar dari membran sel (Van Zoelen *et al.* 1978). Akibatnya, fluiditas membran sel dan luas permukaan membran sel berubah sehingga membran sel menjadi tidak stabil dan sel pecah (Zwall *et al.* 1975).



Gambar 2. 7 Mekanisme Melarutkan Komponen Membran

(Sumber: Sindurmata, 1989)

2.9.2. Mekanisme Permeabilitas Umum

Mekanisme permeabilitas umum ini menyatakan bahwa toksin lipid diterjen dapat menyebabkan membran sel permeable terhadap Ca^{2+} sampai tingkat yang melebihi kemampuan sel itu memompanya kembali ke luar sel, dalam waktu yang cukup lama (6 jam) (Schanne, 1979). Konsentrasi Ca^{2+} di dalam sitoplasma sel ($< 10^{-7}$ M) dipelihara sedemikian serupa sehingga jauh lebih rendah dari konsentrasi ion tersebut di luar sel (2×10^{-3} M) oleh suatu mekanisme sistem transport aktif yang dinamai Ca^{2+} ATPase. Konsentrasi Ca^{2+} intraseluler yang tinggi dapat mengakibatkan kematian sel, dapat diterangkan sebagai berikut:

- a. Sel kehilangan mekanisme pengendali yang diperlukan dalam kehidupan sel tersebut. Karena bila konsentrasi ion kalsium di dalam sitoplasma ($< 10^{-7}$ M) tidak dipertahankan, maka kesetimbangan antara pengambilan ion kalsium oleh mitokondria yang tergantung pada energi dan pelepasannya yang tidak tergantung pada energy, tidak dapat dipertahankan. Transport aktif intraseluler Ca^{2+} oleh mitokondria tidak dapat berlangsung. Konsentrasi Ca^{2+} di dalam sitoplasma memegang peran penting dalam mengatur sejumlah aktivitas sel.
- b. Sel kehilangan energi karena energi dalam bentuk ATP atau bentuk lainnya dipakai untuk memompa ion kalsium keluar dari dalam sel yang ternyata sia-sia, karena ion kalsium akan kembali masuk ke dalam sel.
- c. Pengaktifan proses hidrolisis fosfolipid selular. Pada proses ini ion kalsium bertindak sebagai aktivator yang mempercepat proses hidrolisis fosfolipid membran. Sehingga lipid lapis ganda lebih cepat terurai dengan adanya ion kalsium (Rittenhouse. 1977).

Pelczar & Chan (1986) menambahkan bahwa mekanisme kerja antibakteri juga dapat terjadi melalui beberapa cara lain, yaitu:

Perubahan molekul dan asam nukleat. Hidupnya suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasi protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat

mengakibatkan koagulasi (denaturasi) ireversibel (tak dapat balik) komponen-komponen selular yang vital ini.

Penghambatan kerja enzim. Setiap enzim dari beratus-ratus enzim berbeda-beda yang ada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Banyak zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimia. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel.

Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. DNA, RNA, dan protein memegang peranan yang sangat penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

2.10. Penelitian Enzim PLA2 Sebelumnya (*State of the Art*)

Berikut ini merupakan tabel berisikan penelitian-penelitian terkait enzim fosfolipase A2 yang pernah dilakukan sebelumnya,

Tabel 2. 1 Beberapa Penelitian Enzim PLA2 Sebelumnya

	Penelitian PLA2					
	Pemurnian parsial PLA2	Antibakterial PLA2	Toksistas PLA2	Karakterisasi PLA2	Inhibitor	Antikoagulan PLA2
<i>Chicken Intestinal</i>		Karray <i>et al</i> , 2011		Karray <i>et al</i> , 2011		
PLA2 Rekombinan		Dubouix <i>et al</i> , 2003 Gimenez <i>et al</i> , 2004			Gimenez <i>et al</i> , 2004	Mounier <i>et al</i> , 1996 Mounier <i>et al</i> , 2000
<i>Viperidae venom</i>		Samy <i>et al</i> , 2006	Costa <i>et al</i> , 2008 Andriaio-Escarso <i>et al</i> , 2000	Samy <i>et al</i> , 2006		Kerns <i>et al</i> , 1999 Mounier <i>et al</i> , 2001
<i>Crocodile serum</i>		Nevalainen <i>et al</i> , 2009				
<i>Acanthaster planci venom</i>	Jayaputra, 2010 Savitri <i>et al</i> , 2010	Ihtiarto, 2011	Shiomi <i>et al</i> , 1984	Shiomi <i>et al</i> , 1997		
<i>Bee Venom</i>		Boutrin <i>et al</i> , 2008 Samy <i>et al</i> , 2007				
<i>Snail Pancreas</i>				Zarai <i>et al</i> , 2010		

Pemurnian fosfolipase A2 dari *A. planci* menyebutkan dua fosfolipase A (PLA2 I dan II) dimurnikan dari racun. Kedua enzim tersebut telah dipastikan merupakan fosfolipase A2 berdasarkan hasil yang menunjukkan aktivitas hemolitik hanya dengan kehadiran fosfatidilkolin dan juga melepaskan asam lemak fluoresens dari fosfatidilkolin pada posisi sn-2. PLA2 mempunyai massa molekul sebesar 12 kDa dengan gel filtrasi atau 15 kDa dengan SDS-PAGE. Aktivitas enzim meningkat 180% dengan adanya Ca^{2+} tetapi berkurang 10-20% dengan adanya Cu^{2+} dan Zn^{2+} . (Shiomi *et al.* 1997)

Aktivitas bakterisidal PLA2 golongan IIA bergantung terhadap waktu. PLA2 rekombinan lebih efektif untuk melawan baik *S. aureus* dan *P. aeruginosa* ketika waktu inkubasi ditingkatkan. Konsentrasi minimal yang dibutuhkan untuk EC_{50} sekitar 2-8 $\mu\text{g/ml}$ saat inkubasi selama 3 jam dibandingkan 5-12 $\mu\text{g/ml}$ setelah inkubasi 1 jam. Hasil ini menunjukkan menyarankan bahwa aktivitas bakterisidal tergantung dengan waktu yang meningkatkan kontak enzim dengan *strain* bakteri. (Dubois *et al.* 2003)

Properti bakterisidal Grup IIA PLA2 tidak dipengaruhi oleh konsentrasi yang protein atau pun NaCl yang tinggi. Pengujian dilakukan dengan memodifikasi variasi protein dan garam. Efek bakterisidal yang serupa diamati untuk konsentrasi sebesar 32 $\mu\text{g/ml}$. Kondisi pengetesan sama sekali tidak memberikan pengaruh signifikan saat konsentrasi protein atau garam dalam media inkubasi ditingkatkan (Dubois *et al.* 2003).

Aktivitas bakterisidal PLA2 golongan IIA paralel terhadap hidrolisis fosfolipid. Inkubasi selama 3 jam bakteri dengan konsentrasi PLA2 5 $\mu\text{g PLA2/ml}$ memberikan degradasi 60% komponen fosfolipid. Lebih jauh lagi, peningkatan degradasi fosfolipid diamati pada konsentrasi yang lebih tinggi (10 $\mu\text{g/ml}$) hasil ini mengindikasikan kemampuan PLA2 golongan IIA untuk menghidrolisis fosfolipid yang membungkus bakteri memiliki korelasi terhadap aktivitas antibakterial bergantung konsentrasi dan waktu (Dubois *et al.* 2003).

Studi mengindikasikan bahwa enzim PLA2 yang dimurnikan (*crotoxin B*, *daboiaotoxin*) memiliki akktivitas antibakterial yang kuat melawan strain bakteri gram positif *B. pseudomallei*. Fakta bahwa viperidae (*Crotalus adamanteus*, *Daboia russelli russelli*) dan racun elapidae (*Pseudecis australis*) menunjukkan

potensi yang lebih dibanding racun jenis lain terkait kehadiran enzim PLA2. (Samy *et al.* 2006)

Observasi menunjukkan kehadiran aktivitas katalitik PLA2 dalam serum buaya. Observasi sebelumnya telah mendokumentasikan kemampuan bakterisidal PLA2 tersekresi yang efektif terutama yang tergolong PLA2 golongan IIA. Karenanya dapat dinyatakan bahwa keberadaan PLA2 dalam serum buaya terkait dengan perannya sebagai antimikrobia. (Nevalainan *et al.* 2009)

Enzim PLA2 golongan IIA berasal dari intesninal ayam yang telah dimurnikan dari mukosa memiliki aktivitas antibakterial melawan seluruh bakteri gram + yang diujikan terutama *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, dan *Bacillus cereus* namun jauh lebih kurang efektif melawan bakteri gram -. Di sisi lain, properti antibakterial PLA2 golongan IIA ini sangat erat kaitannya dengan aktivitas enzimatis dimana CaCl_2 dan MgCl_2 (0.7 mM) dibutuhkan. PLA2 ini memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap Ca^{2+} dibanding terhadap Mg^{2+} . (Karray *et al.* 2011)

Pada penelitian 2011 terkait teknik pemurnian enzim fosfolipase A2 dari beracun bintang laut *A.planci* berhasil menemukan metode cepat dan efisien untuk memurnikan PLA2 dengan kombinasi pemanasan dan fraksinasi ammonium sulfat dengan tingkat kemurnian yang dihasilkan mencapai 20 kali lipat *crude venom* (Savitri *et al.* 2011)

2.11. Isolasi Enzim

Isolasi enzim sejalan dengan isolasi protein hal ini karena enzim adalah biomolekul yang juga berupa 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. Protein yang diekstraksi hendaknya dihindarkan dari proteolisis atau dipertahankan aktivitas enzimatisnya. Sebagian besar protein merupakan molekul yang mudah rusak bila tidak berada pada kondisi fisiologisnya. Karena itu, untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein, isolasi dilakukan pada suhu rendah

(0-4°C) dalam buffer dan pH tertentu (tergantung dari jenis protein yang akan dianalisa).

2.11.1. Sonikasi

Sonikasi merupakan energi suara yang di gunakan untuk menghancurkan *suspense* vesikel multilamellar yang besar (LMV) sebuah ruang dalam sel yang dikelilingi membran. Penghancuran ini biasanya menghasilkan vesikel unilamellar yang kecil (SUV) dengan diameter berkisar antara 15-50 nm. Hal ini diperlukan karena molekul protein berada dalam sel, dan kemungkinan besar terdapat di dalam organel pada sel, oleh karena itu diperlukan usaha untuk membuka sel dan organel.

Sonikasi mengandalkan energi gelombang yang menyebabkan proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel (Ashley *et al.* 2001) sehingga mempercepat waktu kontak antara sampel dan pelarut. Pendinginan dibutuhkan untuk mencegah peningkatan panas (Koelman and Roehm, 2005).

2.11.2. Pemanasan Protein

Protein memiliki tingkat kestabilan terhadap suhu dan pH yang berbeda-beda. Ada protein yang stabil pada suhu tinggi seperti pada bakteri termofilik dan ada pula yang sebaliknya. Perbedaan tingkat kestabilan suatu protein ditentukan oleh urutan asam amino penyusun protein dan interaksi-interaksi intramolekulnya.

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. Jika suatu protein yang tidak tahan panas berada dalam lingkungan yang suhunya tinggi, maka lipatan protein yang hidrofobik akan membuka (terdenaturasi) membentuk suatu agregat dan akhirnya akan mengendap.

PLA2 merupakan enzim yang tahan panas stabil sampai suhu 75°C dalam waktu inkubasi 5 menit (Karasudani *et al.* 1996). atas dasar ini maka enzim PLA2 bisa dimurnikan menggunakan teknik pemanasan pada suhu 60°C.

2.11.3. Pemisahan Protein dengan Pengendapan oleh Garam

Pada umumnya enzim yang berada dalam cairan sel, kelarutannya sama dengan protein. Enzim akan sangat larut dalam air dalam kondisi garam, saat kekuatan ioniknya 0,15 - 0,2 pada pH netral. Kelarutan merupakan efek dari interaksi polar dengan pelarut cair, interaksi ionik dengan garam, dan tarikan elektrostatis antara molekul bermuatan (Scope. 1993). Garam yang biasa digunakan adalah amonium sulfat dan natrium klorida.

Garam ini memiliki kelarutan yang tinggi dan relatif murah. Namun terdapat hal yang perlu diperhatikan dalam presipitasi protein yaitu mencegah hilangnya efektifitas protein permanen akibat denaturasi (Wang. 2006).

Proses presipitasi menggunakan ammonium sulfat dapat dikelompokkan menjadi dua bagian yaitu *salting in* dan *salting out*. Pada *salting in*, garam yang ditambahkan tidak jenuh atau pada konsentrasi rendah sehingga protein menjadi bermuatan dan larut dalam larutan garam. Kelarutan protein akan terus meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi garam. Bila konsentrasi garam ditingkatkan terus, maka justru kelarutan protein akan turun. Bahkan pada konsentrasi garam yang lebih tinggi, protein akan mengendap. Proses penambahan garam ammonium sulfat jenuh pada isolasi protein dinamakan *salting out* (Widyarti. 2006).

Mekanisme dalam *salting out* sangat kompleks, tapi diperkirakan bahwa pengendapan terjadi karena proses persaingan antara garam dan protein untuk mengikat air. Pada konsentrasi tinggi, kekuatan ionik garam semakin kuat sehingga garam dapat lebih mengikat molekul air. Dengan demikian, tidak cukup banyak air yang terikat pada protein sehingga gaya tarik menarik antara molekul protein lebih kuat bila dibandingkan dengan gaya tarik menarik antara molekul protein dengan air, sehingga protein akan mengendap (Widyarti. 2006).

Selama proses *salting out*, sangat penting untuk tetap menjaga konsentrasi garam agar tidak menurun dalam larutan sehingga tidak terjadi pengendapan yang

bersamaan antara protein yang ingin dimurnikan dengan protein yang tidak diinginkan. Dengan demikian selalu dilakukan pengadukan selama penambahan garam dalam prosedur *salting out* (Widyarti. 2006).

2.11.4. Sentrifugasi

Sentrifugasi dilakukan untuk meningkatkan konsentrasi dan tingkat kemurnian protein. Prinsipnya adalah kecenderungan sifat partikel makro yang terlarut untuk mengendap oleh pengaruh gravitasi bumi. Dalam medan sentrifugasi yang tinggi, larutan protein cenderung untuk mengalami sedimentasi dan melawan kecenderungan untuk berdifusi. Karena perbedaan ukuran molekul dan kecepatan sedimentasi, maka teknik sentrifugasi berguna pula untuk memisahkan protein berdasarkan ukurannya (Mathews *et al.* 2000).

Besarnya gaya yang diberikan dinyatakan dalam satuan G (gravitasi) yang bergantung pada ukuran jari - jari rotor dan kecepatan perputaran rotor. Hubungan antara gravitasi bumi (g), kecepatan perputaran rotor (N), dan jari - jari rotor (r) diungkapkan dalam persamaan berikut :

$$G = \frac{r \cdot 2\pi N^2}{g} \quad (2.1)$$

2.12. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan suatu metoda analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor *phototube*. Beberapa senyawa biologis dapat ditentukan secara semi kuantitatif dengan spektrum ultraviolet misalnya protein pada 280 nm dan asam nukleat pada 260 nm. Pengukuran protein pada 280 nm berdasarkan atas serapan tirosin dan triptofan. Oleh sebab itu masing masing jenis protein akan memiliki serapan molar yang berbeda beda pada 280 nm, maka kurva kalibrasi harus dibuat untuk masing masing jenis protein murni (Sudarmadji. 1995).

Pada spektrofotometri, konsentrasi suatu larutan ditetapkan dengan jalan mengukur banyaknya cahaya yang diserap (diabsorpsi) oleh larutan yang

bersangkutan. Hubungan antara banyaknya cahaya yang diserap dengan konsentrasi komponen yang menyerap dinyatakan oleh hukum Lambert - Beer,

$$\log P_0 / P = A = \varepsilon bC \quad (2.2)$$

Dalam persamaan diatas, P_0 (intensitas cahaya yang datang pada larutan), P (intensitas cahaya yang diteruskan oleh larutan), A (absorban = $\log P_0/P$), ε (absorptifitas molar), C (konsentrasi larutan), b (tebal kuvet, dinyatakan dalam cm).

2.13. Uji Aktivitas Enzim Fosfolipase A2

Uji aktivitas PLA2 dilakukan dengan pengukuran penjernihan kuning telur sesuai dengan metode Marinetti (1965). Kuning telur merupakan sumber protein fosfatidilkolin atau sejenis lesitin yang dapat dijadikan substrat bagi enzim PLA2, suspensi kuning telur dalam enzim akan berkurang absorbansinya pada panjang gelombang 900 nm.

2.14. 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. Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Reaksi yang terlibat adalah kompleks Cu(II)-protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I).

Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu, kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan *heteropolymolybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif dan diukur absorbansinya pada 750 nm. Kekuatan warna biru bergantung pada konsentrasi residu *tryptophan* dan *tyrosine*-nya yang menunjukkan konsentrasi total protein dalam sampel.

2.15. Elektroforesis SDS - PAGE

Elektroforesis merupakan salah satu metode mengetahui kemurnian sampel dimana sampel ditempatkan dalam medan listrik. Sampel akan

ditempatkan dalam medan listrik pada pH dan arus konstan. Protein pada setiap pH memiliki muatan bersih rata - rata selain pH isoelektrik. Hal ini menyebabkan protein bergerak dalam medan listrik. Mobilitas molekul protein akan berbanding terbalik dengan ukuran molekul. Molekul yang memiliki berat 20 kDa akan memiliki mobilitas yang berbeda dengan molekul 40 kDa. Gel poliakrilamid yang divariasikan kerapatan porinya digunakan sebagai lintasan sampel protein.

Pada elektroforesis SDS - PAGE, sampel didenaturasi terlebih dahulu dengan deterjen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). SDS akan mendenaturasi struktur sekunder protein serta ikatan non disulfida yang dihubungkan dengan struktur tersier. Senyawa ini 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 SDS.

SDS memberikan muatan negatif pada sampel protein sehingga protein dapat bergerak menuju anoda saat diberi medan listrik. Selain itu juga akan membuat agregat terlarut dan terkonversi menjadi rantai polipeptida tunggal sehingga tidak menyumbat pori-pori gel dan molekul protein memiliki muatan yang seragam sehingga pemisahan hanya bergantung pada ukuran molekul. Molekul dengan ukuran yang mirip, akan lebih mudah dipisahkan jika menggunakan teknik SDS - PAGE (Scopes. 1993). Berat molekul komponen protein pada sampel kemudian ditera berdasarkan *protein marker* yang juga di-*running*, dan sudah diketahui pasti berat molekulnya.

2.16. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. *Disc diffusion test* atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensitivitas yaitu 10^5 - 10^8 CFU/mL (Hermawan dkk. 2007).

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode

lubang/sumuran dan metode cakram kertas. Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

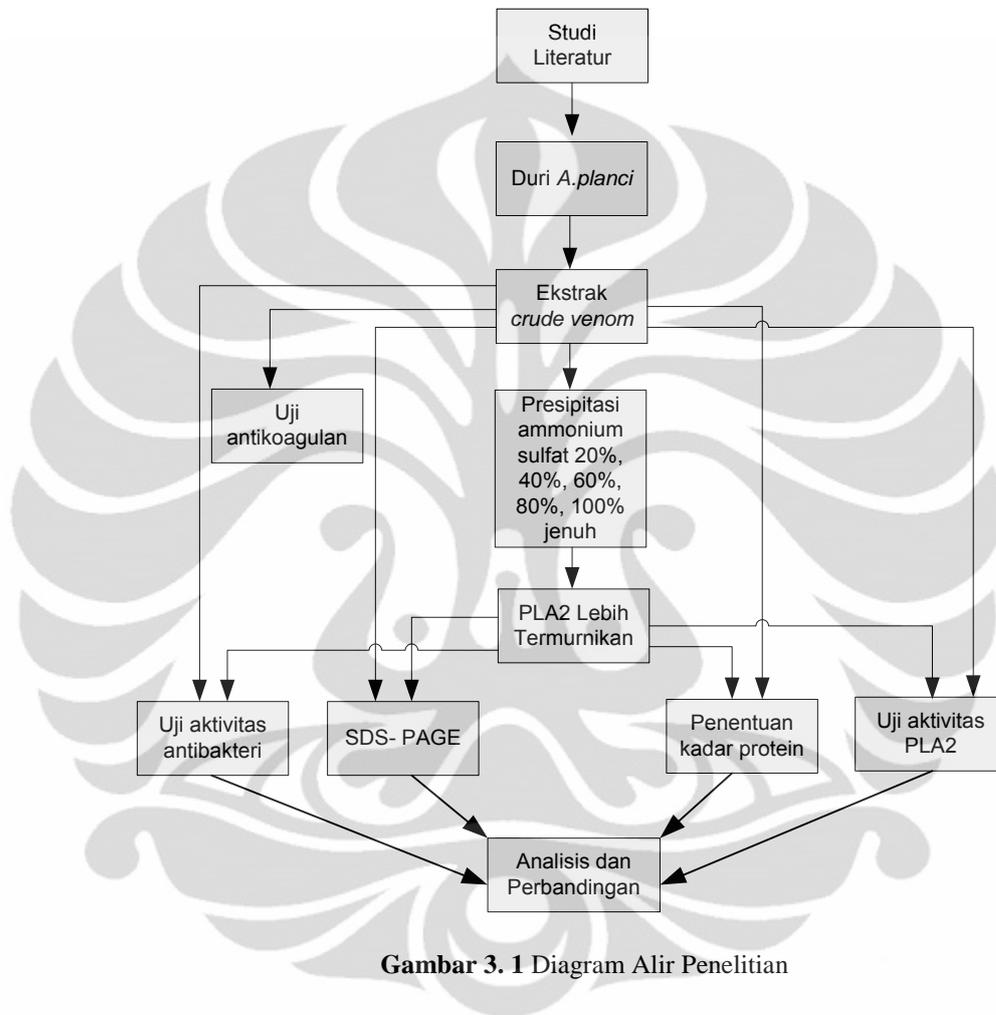
Pada metode silinder, silinder steril dengan diameter 8 mm, ditetesi larutan uji (antibakteri), dan ditempatkan pada permukaan agar yang telah ditanami bakteri uji. Daerah hambat yang terbentuk, terlihat sebagai daerah bening di sekitar silinder.

Difusi cakram merupakan cara yang paling banyak digunakan di antara kedua cara lain di atas. Sejumlah bakteri uji diinokulasi pada media agar, dan cakram yang mengandung larutan uji (larutan zat antibakteri) diletakkan pada permukaan media agar yang telah memadat. Setelah diinkubasi akan tampak daerah bening di sekeliling cakram, yang menandakan bahwa bakteri tidak dapat tumbuh (hidup) di sekitar daerah yang ditempati zat antibakteri.

Prinsip metode pengenceran adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan.

BAB III METODE PENELITIAN

Diagram alir penelitian uji aktivitas antibakteri racun duri *A.planci* yang akan dilakukan dapat digambarkan sebagai berikut.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

Tahapan awal penelitian adalah studi literatur baik dari sumber nasional maupun internasional yang dapat memberikan informasi mengenai *A.planci*, enzim fosfolipase, pemurnian enzim, dan uji aktivitas antibakteri.

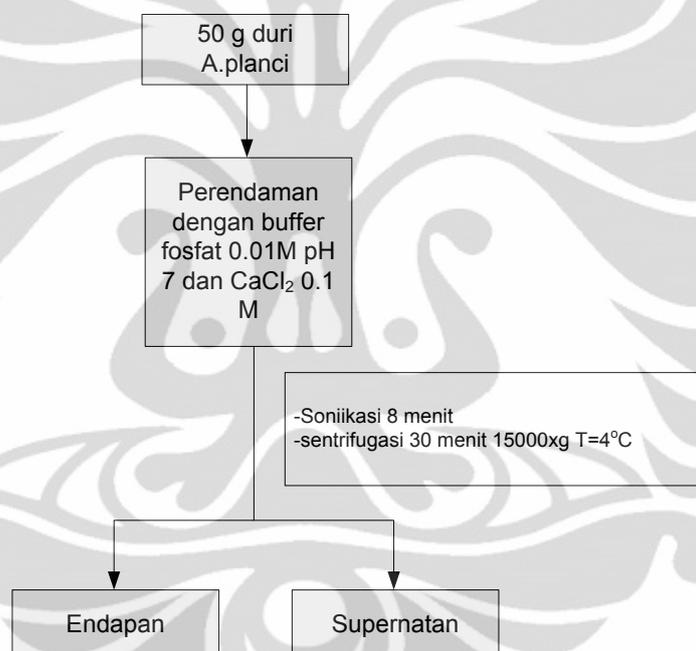
Langkah selanjutnya adalah preparasi bahan dan alat. Spesimen *A.planci* diambil dari perairan Pulau Pombo, Kec. Salahutu, Kab. Maluku Tengah dan perairan Tanjung Kasuari, Kab. Sorong, Papua. Spesimen disimpan dalam suhu rendah -20°C sampai waktunya pengguntingan duri.

Penelitian dilakukan pada kondisi suhu 4°C untuk meminimalisasi pengaruh kontaminan mikroorganisme dan mencegah denaturasi protein sampel.

Setelah sampel mengalami sonikasi dan beberapa kali sentrifugasi didapatkanlah ekstrak racun dari *A.planci*. Racun kemudian dimurnikan kandungan PLA2-nya secara parsial terdiri dari 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% fraksinasi ammonium sulfat jenuh untuk memisahkan protein menurut derajat kelarutannya (Satwika, 2010). Fraksi-fraksi yang diperoleh berfungsi sebagai pembanding pada uji-uji yang akan dilakukan di tahap selanjutnya.

3.1. Tahap Ekstraksi Racun

Prosedur ini ditujukan untuk dapat mengeluarkan racun dalam duri *A.planci*.



Gambar 3. 2 Diagram Alir Ekstraksi *Crude Venom A. planci*

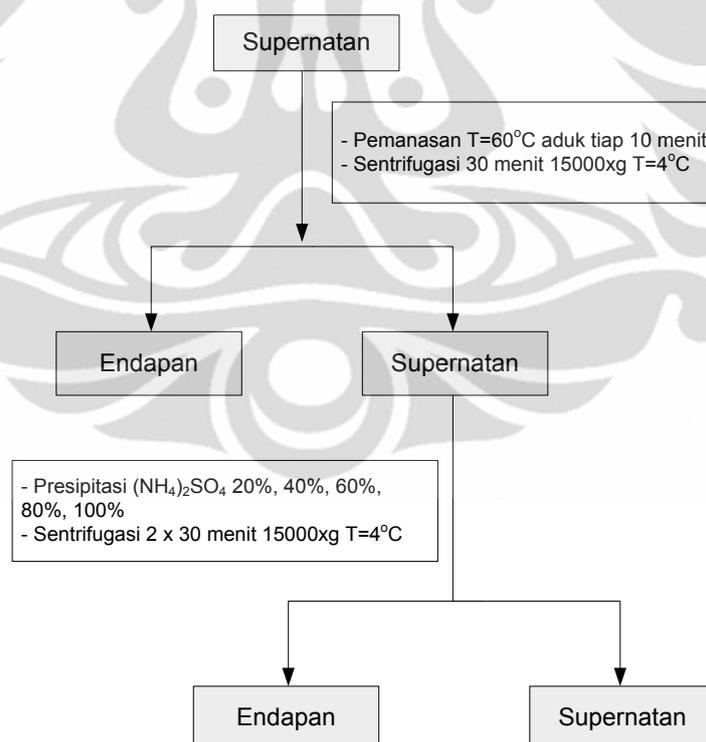
Sampel duri yang telah dikumpulkan (50 gr) direndam dalam bufer fosfat 0.01 M, pH 7.0 sebanyak 100 ml dan 10 ml CaCl_2 0,1 M lalu disonikasi selama 8 menit. Semua langkah tersebut dilakukan dalam suhu 4°C . Setelah sampel dalam bufer fosfat telah disiapkan selanjutnya di refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 30 menit untuk memisahkan endapan pengotor dari *crude venom* yang berupa supernatan

3.2. Uji Sifat Antikoagulan Racun

Uji aktivitas antikoagulasi (anti penggumpalan) darah digunakan untuk mengetahui berhasil tidaknya tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan ekstrak racun dari prosedur yang dilakukan sebelumnya. Sampel darah vena diambil sebanyak 1,5 ml dibiarkan menggumpal dan dibagi menjadi 3 masing-masing sebanyak 0,5 ml bertindak sebagai kontrol dan sampel yang diujikan. Sebanyak 0,3 ml ekstrak racun diteteskan ke darah yang telah menggumpal, selanjutnya diamati ada tidaknya efek antikoagulasi melalui perubahan gumpalan darah yang terjadi.

3.3. Fraksinasi Amonium Sulfat

Fraksinasi ammonium sulfat merupakan tahap pemurnian kandungan PLA2 dalam ekstrak racun ke dalam beberapa fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diuji aktivitasnya agar diketahui fraksi dengan kemurnian PLA2 tertinggi.



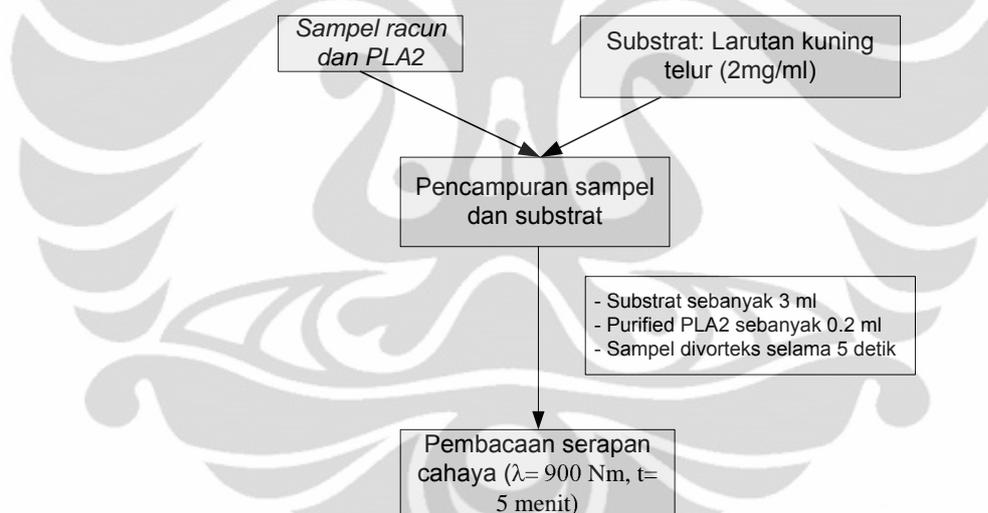
Gambar 3. 3 Diagram Alir Fraksinasi Amonium Sulfat

Supernatan yang diperoleh dari tahap sebelumnya 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. Supernatan hasil preparasi mulai diendapkan protein enzimnya dengan

melarutkan garam ammonium sulfat hingga tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% menurut derajat kelarutannya. Pengendapan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dan wadah sampel tetap direndam dalam es supaya terjaga suhunya. Pemisahan endapan dilakukan dengan sentrifuse refrigerasi 15.000g selama 30 menit sebanyak dua kali. Endapan hasil sentrifuse dilarutkan dalam bufer fosfat 0.01 M, pH 7.0 dan CaCl_2 .

3.4. Uji Aktivitas PLA2

Pengujian aktivitas PLA2 ditujukan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam mengurai substrat fosfatidilkolin. Data aktivitas yang diperoleh kemudian dikonversi ke dalam bentuk aktivitas spesifik (aktivitas per miligram protein) sehingga dapat diketahui tingkat kemurnian PLA2 dalam sampel. Besarnya aktivitas spesifik umumnya sebanding dengan tingkat aktivitas antibakteri sampel



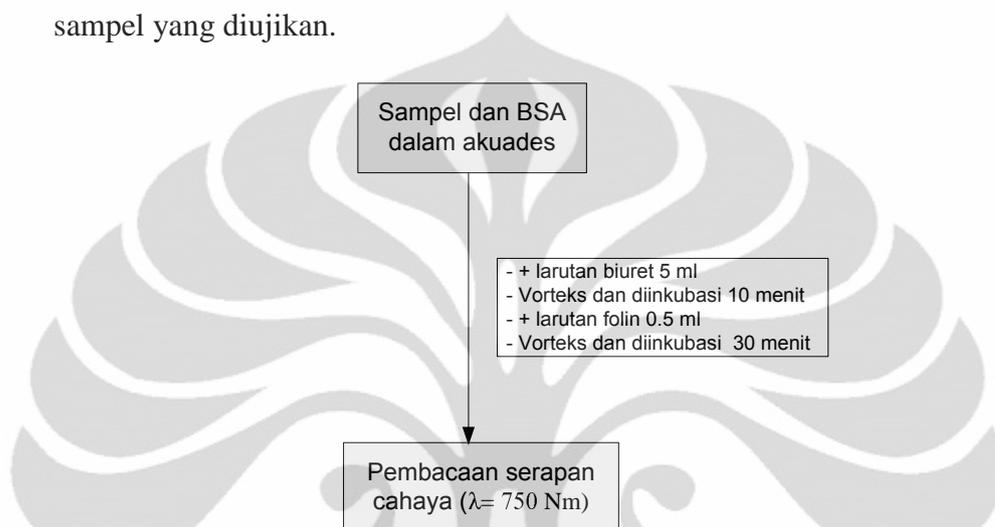
Gambar 3. 4 Diagram Alir Uji Aktivitas PLA2

Sebanyak 0,2 ml sampel mulai dari ekstrak racun awal, ekstrak racun yang dipanaskan, hingga hasil fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dimasukkan ke dalam tabung reaksi bersama dengan 3 ml substrat kuning telur. Tabung kemudian di-*vortex* dan diukur pengurangan absorbansinya selama 5 menit. Konsentrasi substrat sebesar 2 mg/ml dalam bufer Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 900 nm menggunakan spektrofotometer. Untuk blanko substrat diukur tanpa menggunakan sampel enzim. Satu unit enzim ditentukan sebagai aktivitas yang menyebabkan penurunan

0.01 absorbansi/menit (Marinetti, 1965) atau setara dengan penurunan konsentrasi substrat 1 $\mu\text{mol}/\text{menit}$ (Sindurmata, 1989, Zarai *et al.*, 2010).

3.5. Pengujian Kandungan Protein (Lowry)

Data hasil penentuan kandungan protein dalam sampel diperlukan dalam perhitungan aktivitas spesifik PLA2 (aktivitas per milligram protein) dalam sampel yang diujikan.



Gambar 3. 5 Diagram Alir Uji Lowry

Pengujian kadar protein Metode Lowry menggunakan protein standar (BSA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dicampurkan seperti dalam tabel di bawah sehingga diperoleh konsentrasi bervariasi antara 20-100 mg dalam larutan standar. Sementara blanko cukup diisi dengan larutan 1 ml akuades. Baik larutan standar, blanko, dan sampel nantinya akan dicampurkan dengan 5 ml larutan biuret (dibuat dari 1 ml larutan CuSO_4 1% (b/v) dan 1 ml larutan NaK-Tartrat 1% (b/v) dicampurkan ke dalam 100 ml larutan Na_2CO_3 2% (b/v) dalam NaOH 0.1N) serta 0.5 ml reagen Folin Fenol Ciocalteu 1N. Rentang waktu inkubasi setelah mencampurkan larutan biuret adalah 10 menit. Setelah menit ke-10 maka Folin ditambahkan lalu di-vortex. Selanjutnya lama inkubasinya adalah 30 menit. Pada menit ke-30 serapan masing-masing diukur dengan spektro pada panjang gelombang 750 nm.

Tabel 3. 1 Metode Penentuan Kadar Protein (Lowry)

	Blanko	Larutan Standar						Sampel	
No. Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Standar BSA (ml)	-	0.8	1	1.2	1.5	1.8	2	-	-
Sampel Enzim (ml)	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.02
Akuades (ml)	1	1.2	1	0.8	0.5	0.2	-	1.98	1.98
Larutan Biuret (ml)	5								
Folin Ciocalteu (ml)	0.5								

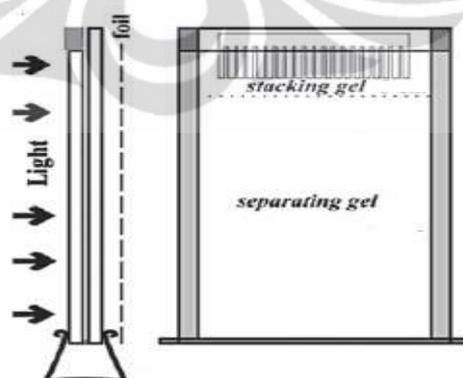
Titik-titik hasil pembacaan absorbansi protein standar kemudian di-plot untuk menghasilkan kurva linear protein standar sehingga dihasilkan suatu persamaan

$$y = mx + c$$

Dengan y adalah nilai absorbansi sampel dan x adalah nilai kadar protein dalam μg . Konsentrasi protein dalam sampel kemudian dihitung menggunakan persamaan yang diperoleh setelah dikurangi dengan absorbansi blanko.

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

Uji SDS-PAGE dilakukan untuk memastikan kebenaran adanya komponen protein dengan berat molekul tertentu diantaranya adalah protein enzim PLA2 dengan berat molekul 15 kDa. Dari hasil SDS-PAGE juga dapat dipastikan keberadaan komponen protein non PLA2 yang masih terbawa selama proses pemurnian.

**Gambar 3. 6** Penyusunan Plate pada SDS-PAGE

(Sumber: *guide to protein purification 2nd ed*)

Susun *Plate* pembentuk gel sesuai instruksi manual penggunaan alat seperti dalam gambar di atas. *Separating gel* 15% dibuat dengan cara menyiapkan tabung

polipropilen 10 ml. Sebanyak 5 ml stok akrilamid/bis, 2.5 ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8, akuades 2.4 ml, dan 0.1 ml SDS 10% dimasukkan ke dalam tabung. Selanjutnya ditambahkan dengan 50 µl APS 10% dan 10 µl TEMED lalu goyang perlahan. Larutan sesegera mungkin dituang ke dalam *plate* pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml hingga batas yang terdapat pada *plate*. Akuades perlahan ditambahkan di atas larutan gel dalam *plate* untuk mengusir gelembung udara yang masih tertinggal. 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. *Stacking gel* 5% selanjutnya dibuat dengan mencampurkan Sebanyak 1.7 ml stok akrilamid/bis, 2.5 ml 1.5M Tris-HCl pH 8.8, akuades 5.7 ml, dan 0.1 ml SDS 10% dimasukkan ke dalam tabung. Selanjutnya ditambahkan dengan 50 µl APS 10% dan 20 µl TEMED lalu goyang perlahan. Sebelum gel penumpuk dimasukkan, sisir perlu diletakkan di atasnya terlebih dahulu. Tunggu hingga *Stacking gel* mengeras kurang lebih 15 menit.

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis. Elektroda buffer dituang sampai bagian atas dan bagian bawah gel terendam dan pastikan tidak ada gelembung yang tertinggal di bawah *chamber*. 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 40 mA selama kurang lebih 90 menit atau sampai *tracking dye* mencapai 0.5 cm dari dasar gel. Bila pemisahan telah selesai, elektroda buffer dituang dan gel diambil dari *plate*.

Gel kemudian direndam selama 1 jam dalam larutan *fixed buffer* untuk menghindari terjadi hilangnya protein dengan berat molekul rendah dari dalam gel dalam proses pewarnaan selanjutnya. Larutan *fixed buffer* terdiri atas 40% (w/v) metanol dan 10% (w/v) *trichloroacetic acid*. Larutan *staining* untuk pewarnaan 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 400 ml, Asam asetat 100 ml, dan akuades sebanyak 500 ml. Larutan *destaining* 1 liter terdiri atas

metanol sebanyak 400 ml, asam asetat sebanyak 100 ml, dan akuades sebanyak 500 ml. Gel direndam dalam 20 ml larutan *staining* selama kurang lebih 15 menit dan dioven 1 menit pada suhu *medium-high*. 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. Persiapan dan Pengujian Aktivitas Antibakteri

Sebelum dapat dilakukan pengujian antibakteri ekstrak racun dari *A.planci* perlu dilakukan tahap preparasi bakteri uji, media, dan alat-alat steril yang akan digunakan.

3.7.1. Peremajaan Bakteri

Media padat dibuat dengan cara melarutkan *nutrient* agar dalam akuades dan dipanaskan hingga larutan menjadi bening. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer, mulut botol disumbat dengan kapas berlemak lalu ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan benang kasur untuk disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Agar dituang ke dalam tabung reaksi, diletakan secara miring, dan dibiarkan dingin serta memadat. Bakteri dari peremajaan sebelumnya diambil sebanyak 1 ose secara aseptis dan digoreskan ke media agar miring yang telah memadat. Selanjutnya agar miring segera ditutup dengan menggunakan sumbat. Bakteri yang telah digoreskan di agar miring diinkubasi kurang lebih 24 jam hingga siap digunakan.

3.7.2. Pembuatan *Nutrient* Agar dan Cair

Nutrient agar yang digunakan terdiri atas agar 2% dan agar 1%. *Nutrient* agar 2% dibuat dengan komposisi bahan *peptone bacteriological* 2.5 g, *beef extract* 1.5 g, *agar bacteriological* 8 g yang selanjutnya ditambahkan akuades sebanyak 500 ml. *Nutrient* agar 1% dibuat dengan komposisi bahan yang serupa namun dengan jumlah *agar bacteriological* sebanyak 4 g. Sedangkan *nutrient* cair dibuat dengan tidak sama sekali menambahkan *agar bacteriological* ke dalamnya. Semua larutan kemudian dipanaskan hingga mendidih dan terlihat bening yang artinya semua bahan telah terlarut sempurna. Larutan tersebut dimasukkan ke

dalam Erlenmeyer. Bibir Erlenmeyer disumbat dengan kapas sumbat lalu ditutup dengan kertas dan plastik dan diikat untuk disterilisasi.

3.7.3. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit untuk mensterilisasi *nutrient* agar dan cair, tabung reaksi, cawan petri, kertas cakram, tip mikropipet, pinset dan peralatan yang digunakan lainnya.

3.7.4. Pemeliharaan Mikroba Uji dalam *Nutrient* Cair

Sebanyak 20 ml *nutrient* agar 2% dapat dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan dingin serta memadat. Selanjutnya masing-masing *strain* bakteri hasil peremajaan dalam agar miring dapat dipanen dan dipindahkan sebanyak satu ose ke dalam 20 ml *nutrient* cair untuk selanjutnya diinkubasi dalam shaker berkecepatan 120 rpm selama 24 jam dalam suhu 37°C.

3.7.5. Penanaman Mikroba Uji ke dalam Cawan Petri

Strain bakteri yang telah tumbuh di *nutrient* cair diambil sebanyak volume tertentu untuk dipindahkan ke dalam 20 ml *nutrient* agar 1% yang masih berwujud cair dan suhunya sudah tidak terlalu tinggi. Untuk *B. subtilis* diambil sebanyak 0.1 ml volume untuk 100 ml *nutrient* agar 1%, *M. luteus* 0.5 ml volume, *S. aureus* 0.1 ml volume. *Nutrient* cair berisikan strain tertentu yang telah diambil digoyang perlahan untuk meratakan konsentrasi mikroba di dalam media. Ambil sebanyak 4 ml campuran *nutrient* tersebut dengan tip yang steril lalu masukan dalam cawan petri yang sebelumnya telah diisi *nutrient* agar 2%. Cawan Petri digoyang perlahan-lahan agar suspensi bakteri tersebar merata dan didiamkan sampai memadat sehingga menciptakan lapisan agar kedua.

3.7.6. Pengujian Aktivitas Antibakteri Racun

Setelah agar memadat, siapkan kertas cakram berukuran kecil untuk menampung sampel sejumlah 20µl masing-masing cakram diisi dengan sampel racun atau hasil fraksinasi racun yang dengan kemurnian enzim PLA2 paling tinggi dengan konsentrasi yang divariasikan. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik *cloramphenicol* 30µg/cakram (samy *et al*, 2006) sedangkan kontrol negatif adalah kertas cakram kosong. Cawan Petri didiamkan dalam inkubator selama 24 jam pada temperatur 37°C. Setelah inkubasi, aktivitas

antibakteri dapat diamati dengan terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram sampel.

3.8. Alat dan Bahan

3.8.1. Peralatan

Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. Tabung reaksi | 13. Termometer |
| 2. <i>Beaker glass</i> | 14. <i>Waterbath</i> |
| 3. <i>Vortex mixer</i> | 15. Sentrifuse refrigerasi |
| 4. SDS-PAGE | 16. Sonikator |
| 5. Mikropipet(1000 μ ,200 μ , 20 μ) | 17. Spektrofotometer |
| 6. Labu ukur | 18. <i>Shaker</i> |
| 7. Cawan petri | 19. Inkubator |
| 8. Oven | 20. Ose |
| 9. Autoklaf suhu 121°C | |
| 10. Gelas ukur | |
| 11. Neraca massa | |
| 12. Spatula | |

3.8.2. Bahan-bahan

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

Ekstraksi PLA2:

1. Buffer fosfat 0.01M pH 7.0
2. Garam ammonium sulfat
3. Akuades
4. CaCl₂ 0.1 M

Penentuan Kadar Protein Lowry :

1. BSA 200 μ g/mL
2. dH₂O
3. CuSO₄ 1% (CuSO₄.5H₂O 1,56 gr + dH₂O)
4. NaK-Tartrat 1% (NaK-Tartrat 2,37 gr + dH₂O)
5. Na₂CO₃ 2% (NaOH 2 gr + Na₂CO₃ 10 gr + dH₂O)
6. Larutan Biuret (5 ml larutan CuSO₄ 1% dan larutan 5 ml NaK-Tartrat 1% dimasukkan ke dalam 500 ml larutan Na₂CO₃ 2%)

7. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N

Uji Aktivitas PLA2

1. Kuning telur 2 mg/ml
2. Buffer Tris-HCl pH 8 0.1 M

Bahan-bahan SDS-PAGE

- | | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Aquades | 9. Glisin |
| 2. Akrilamid | 10. Bromofenol biru (BPB) |
| 3. (bis)akrilamid | 11. <i>Coomassie Brilliant Blue</i> |
| 4. Sodium Dedosil Sulfat 10% | 12. Metanol absolut |
| 5. Larutan HCl | 13. Asam asetat glasial |
| 6. Ammonium persulfat (APS) | 14. TEMED |
| 7. 2-mercaptoetanol | 15. <i>Tris Base</i> |
| 8. Gliserin | 16. Protein standar |

Bahan-bahan uji aktivitas antibakteri

1. Bakteri *Bacillus subtilis*
2. Bakteri *Escherichia coli*
3. Bakteri *Micrococcus luteus*
4. Bakteri *Staphylococcus aureus*
5. Antibiotik *Chloramphenicol*
6. *Agar bacteriological*
7. *Peptone bacteriological*
8. *Beef extract*
9. Kertas cakram kapasitas 20µl dan 50 µl

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Ekstraksi Racun *Acanthaster planci*

Teknik ekstraksi dan pemurnian yang digunakan dalam penelitian ini merujuk pada metode pemurnian parsial enzim PLA2 yang dilakukan oleh Savitri *et al*, 2011 yang telah berhasil memurnikan enzim ini untuk spesimen dari tempat asal yang sama dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi LIPI Cibinong.

Sampel bintang laut *A.planci* yang diekstrak diambil dari perairan Pulau Pombo, Kec. Salahutu, Kab. Maluku Tengah dan perairan Tanjung Kasuari, Kab. Sorong, Papua. Keduanya diambil pada bulan Maret-April 2011 bertepatan dengan angin musim timur. Karakteristik luar *A.planci* perairan Maluku dan Papua sendiri terlihat berbeda dari corak warna yang ada. *A. planci* Papua berwarna gelap kehitaman sedangkan *A. planci* Maluku berwarna coklat kemerahan. Selain itu, duri yang dihasilkan dari individu yang berasal dari Papua berukuran lebih panjang sehingga untuk diameter yang sama *A. planci* perairan Papua menghasilkan total massa duri yang lebih besar.

Duri *A.planci* diguntingi dari badannya lalu dibilas terlebih dahulu dengan menggunakan larutan buffer fosfat pH 7 sebelum melalui proses ekstraksi, lalu dibasuh dengan akuades murni untuk menghilangkan pengotor yang masih tertinggal dan sisa-sisa garam air laut yang terbawa selama proses preparasi sampel duri bintang laut. Larutan hasil bilasan duri berwarna keruh kecoklatan berbau amis dengan banyak busa di permukaannya.



Gambar 4. 1 Duri *A. planci* Siap Ekstrak. Asal Perairan Ambon (1), Papua (2)

Dalam pemurnian kandungan enzim PLA2 yang ada dalam racun duri *A.planci*, keberhasilannya sangat ditentukan oleh faktor-faktor pH, suhu, dan

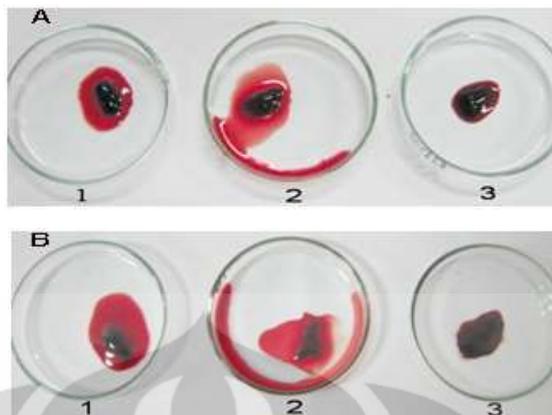
kontaminasi. Maka dari itu peranan dari bufer yaitu untuk mempertahankan pH, dimana enzim umumnya stabil dan mempunyai aktivitas pada pH netral. Faktor lainnya yaitu suhu, enzim mempunyai batas ketahanan suhu yang bisa diterima untuk menjaga struktur proteinnya masing-masing. Enzim yang pada dasarnya merupakan protein akan sangat rentan mengalami kerusakan selama proses pemurnian berlangsung akibat adanya protease. Protease merupakan enzim peptidase yang dapat menghidrolisis ikatan peptida protein sehingga struktur protein menjadi berubah dan rusak. Untuk itu, selama proses pemurnian berlangsung suhu perlu dijaga di kisaran 4°C dimana pada suhu ini aktivitas enzim secara umum menurun.

Tahap ekstraksi dimulai dengan merendam 50 g duri yang telah dibilas ke 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 Ca²⁺ akan menambah aktivitas enzim fosfolipase A2 sebanyak 180% (Shiomi, 1997). Selanjutnya komponen-komponen pengotor yang masih terbawa, materi-materi tak terlarut yang berbobot molekul besar seperti organel sel dipisahkan dengan disentrifugasi refrigerasi dengan kekuatan 15.000g pada suhu 4°C selama 30 menit, endapan kemudian dipisahkan sementara supernatan merupakan ekstrak *crude venom*.

Tahap selanjutnya adalah memastikan berhasil tidaknya ekstraksi kandungan racun dalam duri *A.planci* dengan menggunakan uji antikoagulasi darah.

4.3. Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan

Uji aktivitas antikoagulasi (anti penggumpalan) darah digunakan untuk mengetahui berhasil tidaknya tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan ekstrak racun yang terlarut dalam larutan bufer fosfat. Hal ini mengacu kepada penelitian Karasudani, 1996 dan Koyama *et al*, 1998 yang menyatakan bahwa dalam racun duri bintang laut *A.planci* terdapat senyawa peptida *placinin* dengan berat molekul 7500 Da yang menunjukkan aktivitas antikoagulasi dan memperpanjang lamanya waktu pendarahan pada pengujianya. Hasil pengamatannya diperlihatkan pada gambar 4.2.



Gambar 4. 2 Aktivitas Antikoagulan Ekstrak Racun Duri *A. planci*. Sampel Maluku (A), Papua (B). (3) Darah Tanpa Apa pun, (2) Darah dengan Bufer Fosfat, (1) Darah dengan Ekstrak Racun

Pengamatan dilakukan pada 3 substrat darah baik untuk ekstrak racun duri *A.planci* Perairan Maluku atau pun Papua. Pada cawan 1 darah tidak diberi oleh apapun, sedangkan pada cawan 2 darah sebanyak 0.5 ml ditetesi dengan dengan bufer fosfat pH 7 sebanyak 0.3 ml. Pada cawan 3, 0.5 ml darah ditetesi dengan 0.5 ml ekstrak racun.

Hasil uji ini menunjukkan bahwa pada cawan 3, darah yang dijadikan substrat mempunyai kemampuan untuk menggumpal sehingga bisa dijadikan substrat pada uji aktivitas ini. cawan dua tidak membuktikan adanya aktivitas antikoagulan karena darah yang menggumpal masih terlihat padat, sedangkan cairan disekelilingnya terlihat encer karena hanya merupakan campuran serum dan bufer fosfat. Pada cawan tiga terlihat aktivitas antikoagulan yang ditandai dengan adanya gumpalan darah yang kembali mencair sehingga menjadikan cairan berwarna lebih gelap dan lebih kental. Dengan kata lain proses ekstraksi yang telah dilakukan berhasil mengeluarkan kandungan racun yang ada pada spesimen duri *A.planci* Maluku dan Papua sehingga proses pemurnian selanjutnya dapat dilakukan.

4.3. Pemurnian Kandungan Enzim Fosfolipase A2

Prosedur pemurnian PLA2 dalam racun duri *A.planci* yang dilakukan mengacu ke metode Savitri *et al*, 2011. Metode ini merupakan kombinasi teknik pemanasan dan pemurnian secara parsial menggunakan presipitasi garam

ammonium sulfat 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% kejenuhan. Hasil yang diperoleh bukan merupakan enzim yang benar-benar murni.

4.3.1. Tahap Pemanasan

Tahap selanjutnya adalah memurnikan ekstrak racun dari kandungan-kandungan protein lain selain PLA2 melalui cara pemanasan. Ekstrak *crude venom* dipanaskan di dalam *waterbath* dengan suhu 60°C. Suhu ini berada di bawah batas ketahanan enzim PLA2 yang berada pada suhu 75°C (Karasudani *et al.*, 1997). Pemanasan ini akan menyebabkan lipatan-lipatan protein yang tidak tahan panas dalam ekstrak racun akan membuka (terdenaturasi) dan bagian-bagian residu yang tersikap keluar (pelarut) saling berinteraksi dengan protein terdenaturasi lain membentuk suatu agregat yang akhirnya mengendap. Larutan sampel akan terlihat lebih pucat disebabkan protein-protein lain yang tidak diinginkan terdenaturasi membentuk emulsi halus. Ekstrak racun yang telah melalui proses pemanasan diambil sebagian kecil sebagai sampel yang kemudian disebut sebagai PV. Emulsi halus yang sebelumnya terbentuk kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan pada 15000 g pada suhu 4°C selama 30 menit. Tujuan dilakukannya pengambilan sampel sebelum tahap sentrifugasi adalah untuk lebih melihat sensitifitas dan stabilitas PLA2 terhadap *treatment* pemanasan.

4.3.2. Fraksinasi Ammonium Sulfat

Sejumlah garam ammonium sulfat untuk menghasilkan tingkat kejenuhan 20%, 40%, 60%, dan 80% dan 100% dilarutkan ke dalam ekstrak racun. Hal ini akan berpengaruh terhadap kelarutan protein (termasuk enzim PLA2 di dalamnya) dalam ekstrak racun. Ini disebabkan kemampuan ion-ion garam untuk berikatan dengan air lebih besar sehingga membuat ikatan antara protein dan air terputus sehingga molekul-molekul protein mengendap (*salting out*). Pengadukan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* untuk menghindarkan penumpukan kadar elektrolit pada satu tempat dan meningkatkan kontak pengendapan dengan enzim sambil dijaga suhunya tetap dingin. Saat pengadukan dengan *magnetic stirrer* perlu diperhatikan agar tidak terlalu cepat karena dapat merusak protein enzim yang di dalam larutan yang dapat diindikasikan dengan munculnya

gelembung. Pemberian ammonium sulfat dilarutkan sedikit demi sedikit agar enzim mengendap dengan baik. Setelah diendapkan lalu disentrifuse dengan kekuatan 15.000g, 4°C, selama 30 menit sebanyak dua kali. Endapan lalu diresuspensi dengan bufer fosfat pH 7.0 dan CaCl₂ 0.1 M sebanyak 1.65 ml. Dari hasil fraksinasi terlihat bahwa fraksi 40%, 60%, dan 80 % berwarna oranye pekat untuk sampel baik dari Maluku atau pun Papua. Sedangkan untuk fraksi 20% dan 100% terlihat berwarna lebih muda.

4.4. Hasil Uji Kandungan Protein (Lowry)

Setiap sampel hasil fraksinasi kemudian diuji kandungan proteinnya menggunakan metode Lowry dengan protein standar berupa larutan BSA (*bovine serum albumin*) berkonsentrasi 200µg/ml. Tujuan dari mengetahui kadungan protein dalam sampel adalah untuk menjadi standar konsentrasi protein pada pengetesan sifat antibakteri, selain itu juga menjadi penentu bagi tingkat aktivitas spesifik serta kemurnian enzim PLA₂ di dalam sampel ekstrak racun.

Pengujian dilakukan dengan pengulangan (n=2) untuk masing-masing sampel. Hasil uji kandungan protein dapat dilihat dalam tabel 4.1 dan 4.2. Ekstrak awal racun, Ekstrak terpanaskan, Fraksi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% selanjutnya diberi label CV, PV, F20, F40, F60, F80, dan F100. Data kandungan protein selanjutnya digunakan untuk menentukan fraksi dengan kandungan enzim PLA₂ yang paling besar.

Tabel 4. 1 Kandungan Protein Sampel Racun Duri *A.planci* Papua

Sampel	Absorbansi rata-rata	Berat protein rata-rata/20 µl (µg)	Kadar protein rata-rata (mg/ml)
CV	0.073	35.25	1.76
PV	0.074	36	1.8
F20	0.032	4.5	0.74
F40	0.212	179.5	5.24
F60	0.211	104.5	5.2
F80	0.361	104.75	9.0
F100	0.408	405.5	20.28

Tabel 4. 2 Kandungan Protein Sampel Racun Duri *A.planci* Maluku

Sampel	Absorbansi rata-rata	Berat protein rata-rata/20 µl (µg)	Kadar protein rata-rata (mg/ml)
CV	0.049	39.5	1.98
PV	0.046	37	1.85
F20	0.284	275	0.2
F40	0.386	376.5	26.85
F60	0.324	314.5	11.23
F80	0.266	257	19.8
F100	0.123	114	6.03

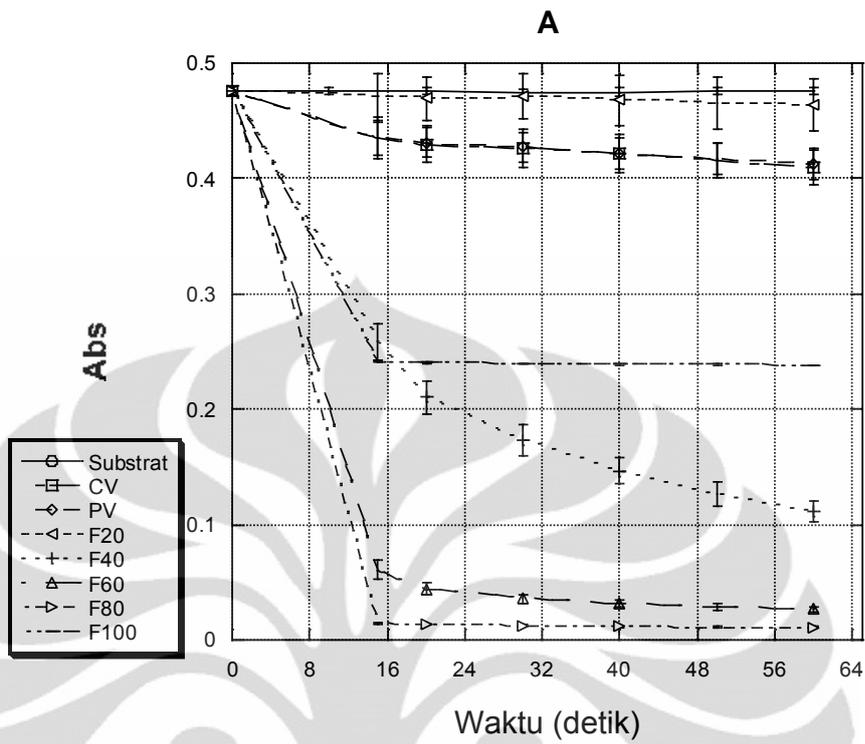
Dari hasil uji kandungan protein yang diperoleh dapat dipastikan bahwa kandungan protein yang berhasil diekstrak dari masing-masing sampel duri *A. planici* sebanyak 50 g baik dari perairan Maluku atau pun Papua tidak berbeda jauh. Sementara itu, sampel *crude venom* (CV) dan sampel *crude venom* yang telah dipanaskan (PV) pun menunjukkan konsentrasi yang hampir serupa. Hal ini disebabkan proses pemanasan hanya akan mendenaturasikan komponen protein yang tidak tahan suhu tinggi sedangkan kandungan protein yang terdenaturasi itu akan tetap terbaca dalam uji Lowry. Perbedaan konsentrasi PV dan CV di masing-masing sampel duri *A. planici* kemungkinan disebabkan oleh ketidakhomogenan kelarutan protein dalam sampel mengingat sampel diambil dari volume total yang besar.

Konsentrasi protein meningkat pada sampel F40 hingga F80 menandakan bahwa kehadiran garam dalam larutan protein-buffer mulai efektif mengendapkan sejumlah besar komponen protein. Besarnya konsentrasi protein terendapkan pada fraksi ini tidak dapat ditentukan polanya terkait efek dari garam ammonium sulfat yang juga secara acak berikatan dengan air menyebabkan protein terendapkan atau pun sifat dari kandungan-kandungan protein yang terdapat dalam *crude venom* itu sendiri. Hal ini ditunjukkan Pada F100 untuk masing-masing sampel. Pada *crude venom A.planci* perairan Maluku, konsentrasi yang diendapkan menurun disebabkan larutan buffer yang telah berada di kondisi sangat jenuh dan sebagian besar protein telah terendapkan di fraksinasi-fraksinasi sebelumnya sedangkan pada *crude venom A.planci* Papua yang terjadi adalah secara tiba-tiba konsentrasi protein yang diendapkan meningkat drastis.

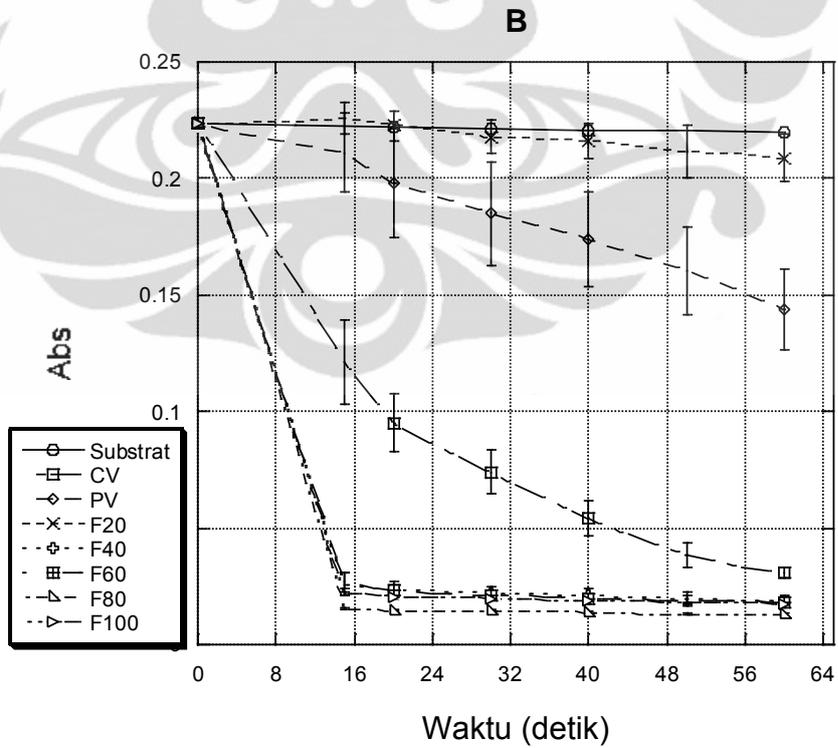
4.5. Hasil Uji Aktivitas Fosfolipase A2 (PLA2)

Pengujian aktivitas PLA2 ditujukan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam mengurai substrat fosfatidilkolin. Secara teoretis kemampuan ini akan sebanding dengan kemampuan sampel dalam mengurai membran sel bakteri nantinya. Semakin besar aktivitas maka semakin kuat kemampuan antibakteri yang dimiliki dan begitu juga berlaku sebaliknya

Uji aktivitas PLA2 dilakukan berdasarkan penjernihan substrat suspensi kuning telur (Marinetti, 1965). Penambahan sampel ekstrak racun CV, PV, hasil fraksinasi F20, F40, F60, F80, F100 yang memiliki kandungan enzim PLA2 di dalamnya akan menjernihkan suspensi kuning telur yang terbaca pada λ 900 nm. Hal ini disebabkan oleh enzim PLA2 menghidrolisis kandungan lesitin dalam kuning telur (fosfatidilkolin) dalam substrat menjadi lisolesitin (lisofosfatidilkolin) dan melepaskan produk lain berupa asam lemak (lihat tinjauan pustaka sub bab 2.9). Dalam penelitian Marinetti, satu unit enzim didefinisikan sebagai pengurangan 0,01 abs/menit, pengurangan dilakukan pada inisial waktu 5 menit dimana satu unit setara dengan penurunan konsentrasi substrat sebesar $1\mu\text{mol}$ untuk setiap menitnya (Sindurmata, 1989; Zarai *et al*, 2010). Pengujian dilakukan dengan pengulangan ($n=2$) untuk masing-masing sampel uji.



Gambar 4.3 Penurunan Absorbansi Substrat (Sampel Papua).



Gambar 4.4 Penurunan Absorbansi Substrat (Sampel Maluku)

Dalam uji aktivitas PLA2 ini digunakan substrat kuning telur dengan konsentrasi 2 mg/ml (Marinetti, 1965). Konsentrasi substrat yang sama dapat memberikan tingkat absorbansi substrat awal yang berbeda terkait kualitas dari kuning telur yang digunakan. Namun hal ini tidak menjadi masalah selama parameter yang digunakan untuk pengujian ini adalah besarnya penurunan absorbansi pada substrat. Selain itu, lamanya waktu pengamatan penurunan absorbansi yang pada awalnya 5 menit direduksi hanya menjadi 1 menit. Ini disebabkan reaksi pada beberapa sampel berjalan cepat dimana hanya dalam beberapa detik reaksi telah mencapai kondisi stasionernya.

Pada kurva kurva A, penurunan absorbansi antara *crude venom* (CV) dan ekstrak racun yang dipanaskan (PV) berada di sepanjang titik yang sama menunjukkan enzim PLA2 pada sampel dari perairan papua memiliki ketahanan pada suhu tinggi (60°C) sehingga tetap terjaga aktivitasnya meskipun telah dipanaskan dengan tujuan untuk mendenaturasikan komponen protein lain yang tidak tahan suhu tersebut.

Dari kedua grafik di atas diketahui bahwa fraksi hasil presipitasi ammonium sulfat 80% tingkat kejenuhan (F80) memiliki aktivitas PLA2 tertinggi sementara hasil fraksinasi ammonium sulfat 20% tingkat kejenuhan (F20) memberikan penurunan absorbansi terendah. Tingkat aktivitas enzim PLA2 pada masing-masing fraksi memiliki keterkaitan dengan konsentrasi protein pada masing-masing fraksi. Konsentrasi protein yang besar dalam sampel uji aktivitas memungkinkan konsentrasi PLA2 dalam sampel yang lebih besar.

Dari prosedur perhitungan pada Lampiran B, aktivitas spesifik PLA2 dan tingkat kemurnian masing-masing sampel dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan 4.4.

Tabel 4. 3 Aktivitas Spesifik Fraksi Pemurnian Racun Duri *A. planci*

Sampel	<i>A.planci</i> Papua		<i>A.planci</i> Maluku	
	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purification factor</i>	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purification factor</i>
CV	3.74	1	9.6	1
PV	3.5	0.94	4.11	0.43
F20	1.63	0.44	5.55	0.58
F40	6.94	1.85	0.75	0.08
F60	8.59	2.29	1.8	0.19
F80	5.18	1.38	1.05	0.11
F100	1.17	0.31	3.37	0.35

Aktivitas spesifik PLA2 merupakan aktivitas enzim PLA untuk setiap satuan massa protein yang dikandung oleh sampel. Perhitungannya merupakan kombinasi dari hasil uji aktivitas dan uji kandungan protein (Lowry). Aktivitas spesifik PLA2 untuk *crude venom* (CV) untuk sampel perairan Papua dan Maluku berturut-turut sebesar 3.74 unit/mg dan 9.6 unit/mg. Besarnya kandungan protein lain non PLA2 dalam CV menjadikan aktifitas spesifik masing-masing sampel kecil nilainya. Dari data aktivitas yang diperoleh menunjukkan bahwa CV *A.planci* perairan Maluku memiliki potensi kandungan PLA2 yang lebih besar.

Pada sampel berasal dari perairan Papua (grafik A), tingkat kemurnian kandungan PLA2 tertinggi diperoleh pada hasil presipitasi ammonium sulfat 60% tingkat kejenuhan (F60). Meskipun tingkat kemurnian yang dihasilkan berada pada rentang yang tidak berbeda jauh, ini tetap dapat menunjukkan bahwa teknik pemurnian parsial ini berhasil memurnikan kandungan PLA2 ke tingkat yang lebih tinggi. Sementara itu, CV dan ekstrak yang telah dipanaskan (PV) menunjukkan terjadinya hanya sedikit penurunan aktivitas spesifik. Ini menegaskan sifat ketahanan enzim PLA2 dalam sampel berasal dari perairan Papua terhadap suhu tinggi 60°C sehingga pada tahap selanjutnya setelah pemisahan protein yang terdenaturasi dan fraksinasi pertama aktivitas PLA2 mampu meningkat melebihi aktivitas *crude venom*.

Pada sampel berasal dari perairan Maluku (grafik B) berlaku hal yang berlawanan, sampel ekstrak racun yang melalui pemanasan (PV) mengalami penurunan aktivitas spesifik yang signifikan dibandingkan dengan aktivitas mula-mula sebelum dilakukan pemanasan (CV). Sebagai akibatnya, fraksi-fraksi

setelahnya yang merupakan hasil pemurnian dengan presipitasi ammonium sulfat memiliki tingkat kemurnian PLA2 yang lebih kecil dibanding CV sendiri. Hal ini kemudian memunculkan hipotesis bahwa jenis enzim PLA2 yang dikandung dalam sampel duri *A.planci* asal perairan Maluku pada bulan April berbeda dari PLA2 umumnya yang memiliki ketahanan pada suhu hingga 75°C (Karasudani *et al*, 1996). Namun hal ini masih perlu diteliti lebih lanjut pada kesempatan penelitian-penelitian lain.

Pada penelitian ini, secara umum hasil pemurnian parsial dengan metode Savitri *et al*, memberikan tingkat kemurnian PLA2 yang masih sangat rendah dibandingkan penelitian sebelumnya.

Tabel 4. 4 Komparasi Aktivitas Spesifik Ekstrak Racun Duri *A.planci* Maluku. Dibandingkan terhadap Hasil Penelitian Savitri *et al* (2011)

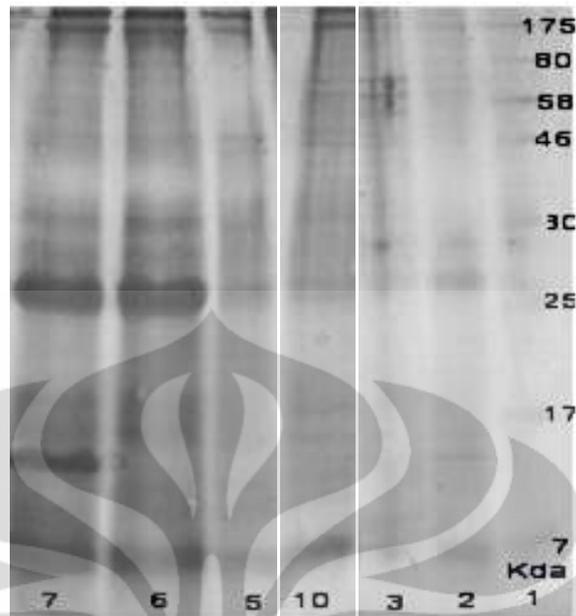
Sampel	Penelitian Savitri <i>et al</i> (2011)		Penelitian ini	
	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purification factor</i>	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	<i>Purification factor</i>
CV	5.23	1	9.6	1
PV	6.22	1.19	4.11	0.43
F20	108.48	20.75	5.55	0.58
F40	16.45	3.15	0.75	0.08
F60	2.91	0.56	1.8	0.19
F80	2.31	0.44	1.05	0.11

Pada hasil pemurnian menggunakan metode Savitri *et al* sebelumnya diperoleh kemurnian PLA2 dalam ekstrak racun sebesar 20.75 kali CV sedangkan untuk fraksi yang sama dalam penelitian ini tingkat kemurnian turun menjadi 0.58 kali CV. Hal ini disebabkan faktor perbedaan individu *A.planci* itu sebagai akibat perbedaan geografis, dan waktu pengambilan sampel. Ekosistem laut sangat dipengaruhi faktor geografis, angin musim dimana dapat menyebabkan perubahan distribusi plankton, ikan kecil, pemangsa, suhu laut, dll. Perbedaan ini memungkinkan terjadinya perubahan faktor genetik *A.planci* (Benzie, 1999). Ada kemungkinan tingkat sekresi enzim PLA2 pada makhluk ini menjadi ikut terpengaruh.

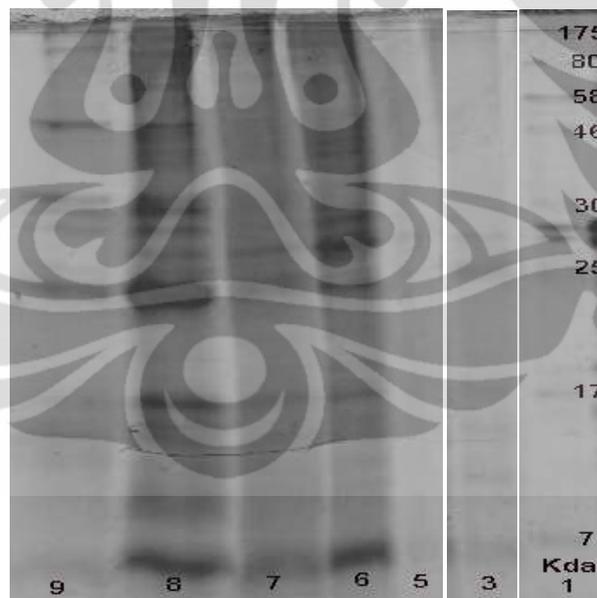
4.6. Hasil Uji SDS-PAGE

Uji SDS-PAGE dilakukan untuk mengidentifikasi kebenaran keberadaan protein-protein dengan berat molekul tertentu dalam sampel termasuk di dalamnya protein enzim PLA2 dan protein-protein lain non PLA2 yang masih terbawa selama proses pemurnian.

Uji SDS-PAGE menggunakan gel poliakrilamid dengan konsentrasi 15% untuk bagian *resolving* sementara bagian *stacking* menggunakan gel poliakrilamid dengan konsentrasi 5%. Protein *marker* yang digunakan adalah jenis *broad range* dengan berat molekul mencakup mulai dari 7 kDa hingga 175 kDa. Sebelum dimasukkan ke dalam lapisan *stacking*, sampel yang akan diujikan (CV, F20, F40, F60, F80, F100) dari perairan Maluku dan Papua didenaturasikan terlebih dahulu dengan merebus di air mendidih selama 5 menit. Kehadiran protease dalam uji SDS-PAGE akan sangat mempengaruhi hasil dimana protease akan menyebabkan terpotongnya band-band protein sehingga pembacaan berat molekul sampel akan sulit dilakukan. Selain itu, konsentrasi protein yang akan diujikan serta volumenya juga akan sangat mempengaruhi pembacaan hasil. Konsentrasi protein yang tinggi serta volume yang cukup besar (25 μ l) sangat dianjurkan untuk memudahkan pengamatan band-band protein yang terbentuk nantinya. Begitu semua sampel telah masuk ke dalam *stacking gel* maka alat dihidupkan dan ditunggu berkisar antara 90 hingga 150 menit. Proses dinyatakan selesai saat indikator pada *sample buffer* yang berwarna biru telah berjalan melewati garis batas bawah *resolving gel*.



Gambar 4. 5 Hasil SDS-PAGE Racun Duri *A.planci* Perairan Papua. (1) Protein Marker, (2) CV, (3) F20, (10) F40, (5) F60, (6) F80, (7) F100



Gambar 4. 6 Hasil SDS-PAGE Racun Duri *A.planci* Perairan Maluku. (1) Protein Marker, (3) CV, (5) F20, (6) F40, (7) F60, (8) F80, (9) F100

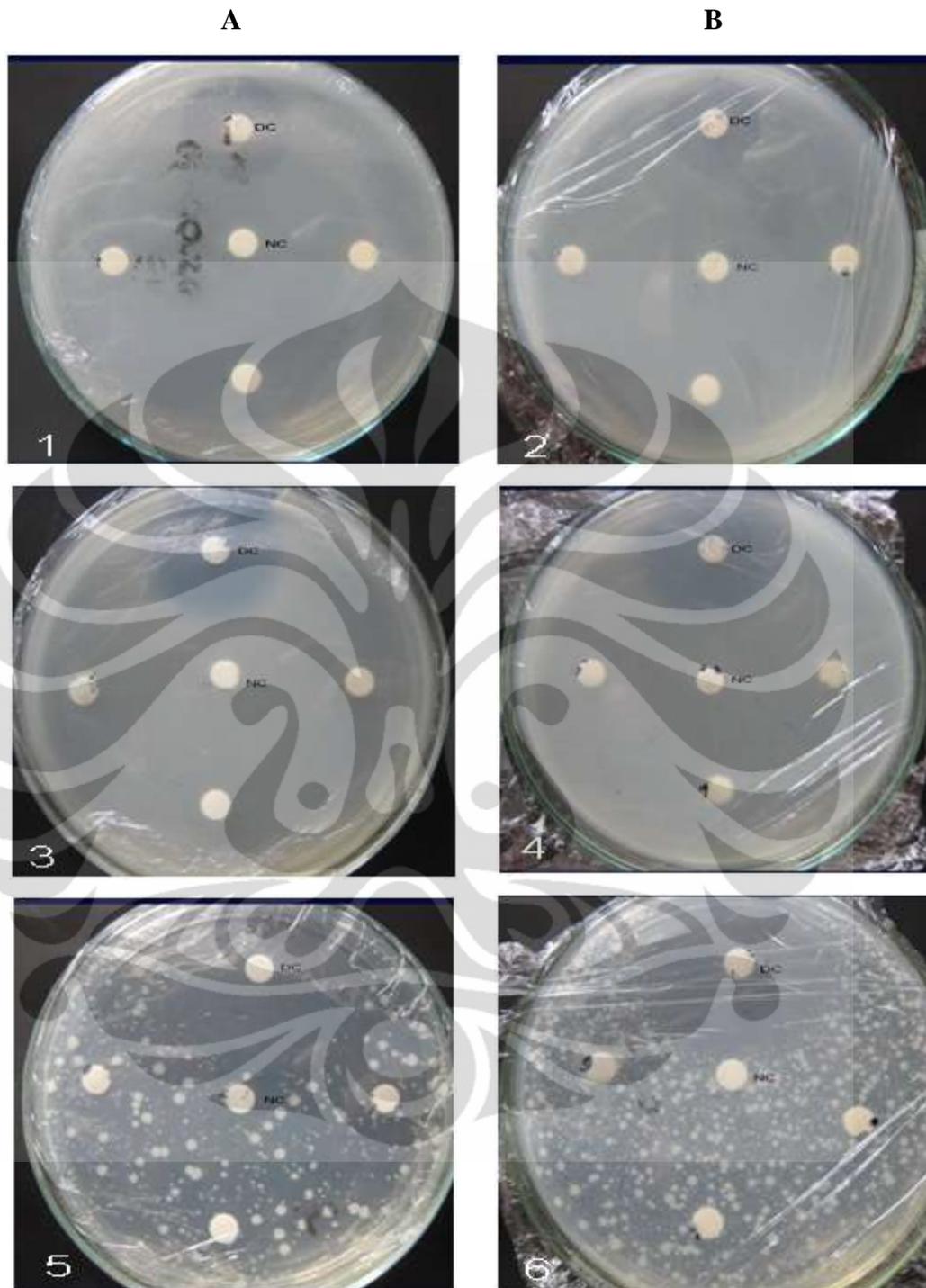
Dari hasil SDS-Page dapat diketahui bahwa hasil teknik pemurnian parsial yang dilakukan tidak menghasilkan enzim PLA2 yang diharapkan dalam keadaan yang tidak benar-benar murni. Proses pemanasan *crude venom* belum mampu mendenaturasikan protein lain selain PLA2 dalam jumlah besar sehingga

kemurnian enzim PLA2 dalam fraksi-fraksi hasil presipitasi ammonium sulfat menjadi sangat rendah. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi awal sampel sangat menentukan berhasil tidaknya teknik pemurnian secara parsial ini. Teknik pemurnian parsial akan sangat tepat bila *crude venom* memang memiliki komponen protein penyusun terbesar berupa PLA2. Baik untuk sampel dari *A.planci* perairan Maluku dan Papua keduanya memiliki banyak komponen protein yang kurang lebih sama berat molekulnya. Hal ini dapat dilihat dari band-band yang dihasilkan dimana tidak jauh berbeda satu dengan yang lainnya.

Sementara itu, gradien tingkat kejelasan warna mulai dari CV hingga F100 disebabkan oleh besarnya konsentrasi protein sampel yang diujikan. Fosfolipase A2 yang mempunyai band protein 15 kDa (Shiomi *et al.*, 1997) tampak pada setiap sampel yang diujikan meskipun samar-samar. Hal ini membuktikan bahwa jelas terdapat kandungan PLA2 yang menjadi target untuk diperoleh. Selain itu terdapat band-band protein lain dalam sampel, salah satunya adalah *placinin* dengan berat molekul kisaran 7.5 kDa.

4.7. Hasil Uji Antibakteri

Penentuan sifat antibakterial ekstrak racun dari *A.planci* dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap bakteri gram positif *Basillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi sampel divariasikan sesuai dengan konsentrasi awal dari ekstrak racun yang diperoleh, hingga konsentrasi berdasarkan pengujian sifat antibakteri ekstrak racun dengan kandungan PLA2 (racun ular) yang sebelumnya pernah diujikan yaitu sebesar 100µg/ml (Samy *et al.*, 2006) untuk kapasitas cakram 20µl. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik *chloramphenicol* dengan dosis 30µg/cakram sedangkan kontrol negatif yaitu berupa cakram yang tidak ditetesi oleh apapun. Pengujian yang dilakukan adalah sebatas uji kualitatif terbentuk tidaknya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang telah ditetesi sampel setelah diinkubasi selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan sebanyak triplo (n=3) untuk masing-masing jenis bakteri uji.



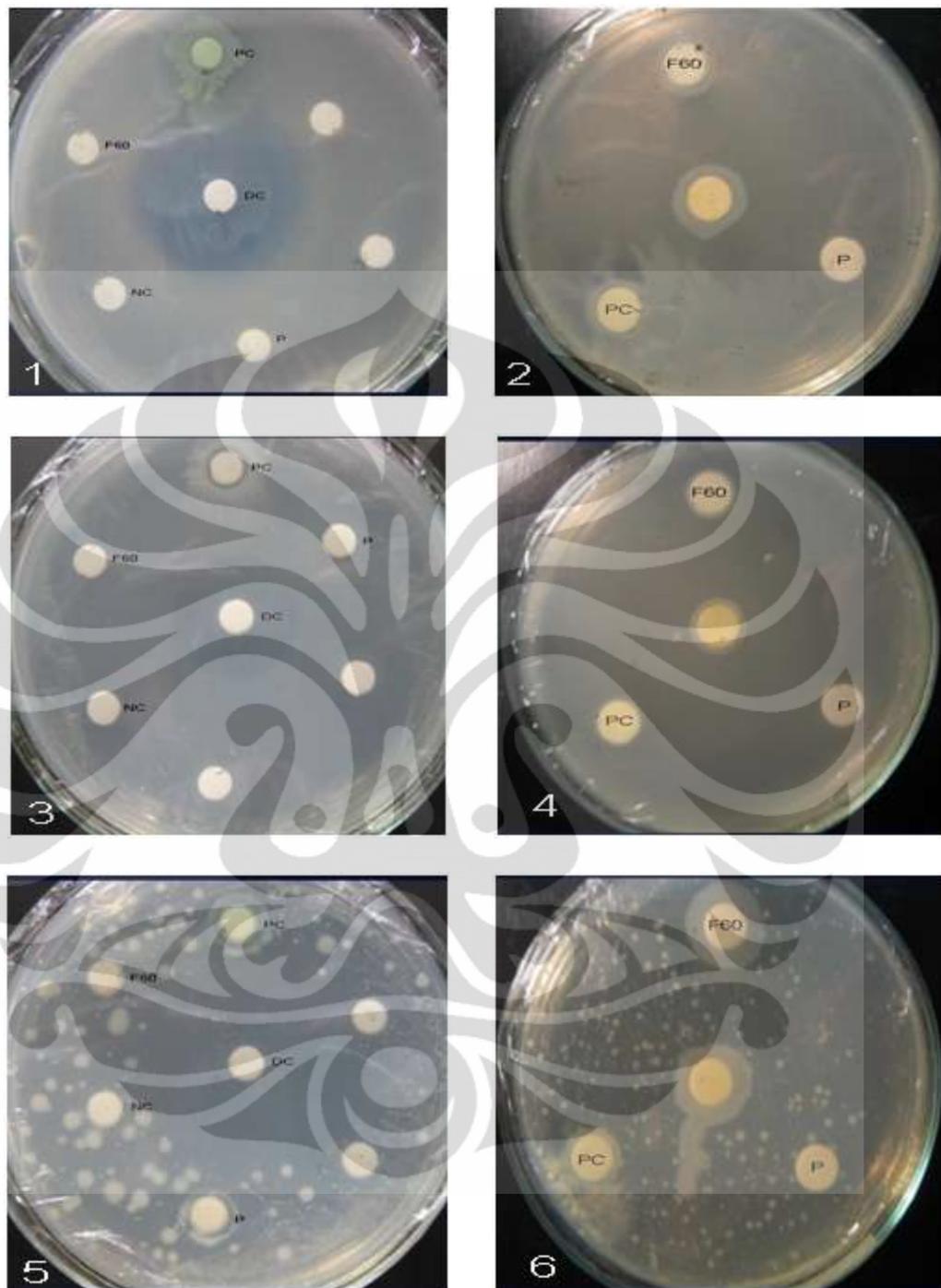
Gambar 4. 7 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Racun (CV). Konsentrasi Diujikan 100µg/ml, 850µg/ml, dan 1700µg/ml. Kontrol Positif (DC) *Chloramphenicol* 30µg/cakram, Kontrol Negatif (NC) Kosong. (B) Sampel Papua, (A) Sampel Maluku. (1 dan 2) *Micrococcus luteus*, (3 dan 4) *Staphylococcus aureus*. (5 dan 6) *Bacillus subtilis*

Menurut Humprey dan Lightbrown pada tahun 1952, zona bening yang dihasilkan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti tebal lapisan agar, konsentrasi

zat uji, waktu difusi, dan koefisien difusi. Media agar yang tebal akan menghambat difusi zat uji sehingga zona bening yang dihasilkan kecil sedangkan waktu difusi yang lama dan koefisien difusi yang tinggi menyebabkan zona bening yang besar. Konsentrasi zat uji tinggi akan menyebabkan gradien konsentrasi yang tinggi antara zat uji dengan media agar sehingga difusi meningkat dan zona bening yang dihasilkan besar. Selain itu, difusi juga dipengaruhi oleh viskositas; semakin tinggi viskositas suatu zat uji maka difusinya akan semakin kecil sehingga zona bening yang dihasilkan juga kecil.

Pada uji antibakteri menggunakan metode difusi cakram ini diketahui bahwa *crude venom* dari *A.planci* perairan Maluku atau pun Papua pada bulan April 2011 tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif yang diujikan (*B. subtilis*, *M. luteus*, dan *S. aureus*). Hal ini terlihat dari tidak adanya zona hambat bakteri di sekeliling cakram yang telah ditetesi sampel ekstrak racun pada berbagai konsentrasi. Kemungkinan ini disebabkan oleh kecilnya aktivitas spesifik enzim PLA2 pada ekstrak racun bila dibandingkan dengan ekstrak racun yang telah banyak diujikan di penelitian sebelumnya dimana rentang aktivitas berada di kisaran lebih dari 100-1000 unit/mg protein ekstrak racun (Samy *et al*, 2006; Samy *et al*, 2007). Banyak terdapatnya komponen protein lain dalam ekstrak racun menjadikan konsentrasi PLA2 dalam ekstrak racun menjadi sangat kecil. Kontrol positif pada uji ini berupa antibiotik *chloramphenicol* memberikan zona hambat yang besar di setiap bakteri uji, sementara kontrol negatif tidak memberi zona hambat sedikitpun.

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakterial untuk hasil fraksinasi ekstrak racun dengan aktivitas spesifik PLA2 tertinggi untuk dijadikan sebagai pembanding ada tidaknya zona hambat yang terbentuk. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi sampel 500µg/ml untuk jenis sampel PLA2 pada dosis 20µl (samy *et al*, 2006) sebanyak tiga kali (n=3) untuk masing-masing bakteri uji..



Gambar 4. 8 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fraksinasi dan Propolis. Ekstrak Racun Fraksi Ammonium Sulfat 60% jenuh (F60), Propolis tanpa *Casein* (P), Propolis dengan *Casein* (PC). Kontrol Positif (DC) *Chloramphenicol* 30 μ g/cakram, Kontrol Negatif (NC) Kosong. (1 dan 2) *Micrococcus luteus*, (3 dan 4) *Staphylococcus aureus*. (5 dan 6) *Bacillus subtilis*

Dari uji yang dilakukan diperoleh hasil bahwa ekstrak racun duri *A.planci* asal perairan Maluku fraksi 60% ammonium sulfat (F60) dengan faktor

kemurnian PLA2 2.29 kali ekstrak racun kasar mampu memberikan zona hambat untuk setiap jenis bakteri uji meskipun sangat kecil. Selain itu, terdapatnya sejumlah besar protein lain dalam ekstrak racun yang kemudian berdifusi ke media agar menjadikan bakteri yang ada di sekeliling zona hambat tumbuh lebih cepat dibanding bakteri yang jauh dari zona hambat. Hipotesis ini didukung dengan uji aktivitas antibakteri yang sama namun dalam dosis atau pun konsentrasi beberapa kali lebih kecil maka tidak terjadi pertumbuhan bakteri yang lebih cepat di sekeliling zona hambat. Sedangkan pada dosis dan konsentrasi protein yang lebih besar dihasilkan pertumbuhan bakteri di sekeliling zona hambat yang lebih cepat lagi.

Hasil uji aktivitas antibakteri ini memberikan titik terang bahwa PLA2 yang berasal dari racun dari *A.planci* dapat dimanfaatkan sebagai agen antibakteri dengan teknik pengolahan yang tepat dan pemurnian yang lebih baik.

Tabel 4. 5 Komparasi Aktivitas Spesifik PLA2 dan antibakteri dalam Berbagai Ekstrak Racun

No.	Sampel	Berat Molekul (kDa)	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	Penelitian	Sifat Antibakteri
1.	Racun dari <i>A.planci</i> Maluku, September 2010	15	5.23	Savitri <i>et al</i> , 2011	
2.	Racun dari <i>A.planci</i> Maluku, April 2011	15	9.6	Penelitian ini	Tidak ada
3.	Racun dari <i>A.planci</i> Papua, April 2011	15	3.74	Penelitian ini	Perlu pemurnian lanjut
4.	Racun dari <i>A. planci</i> Pulau Kuroshima, Oktober 1989	15	830	Shiomi <i>et al</i> , 1997	
5.	<i>hepatopancreas</i> siput laut (<i>H. trunculus</i>)	30	0.72	Zarai <i>et al</i> , 2010	
6.	Racun lebah madu <i>Apis mellifera</i>	19	20.5	Samy <i>et al</i> , 2006	Ada
7.	Racun ular <i>Pseudechis australis</i>	13.2	3949	Samy <i>et al</i> , 2006	Ada
8.	Racun Kalajengking <i>Buthotus hottenlota</i>	-	10.4	Samy <i>et al</i> , 2006	Tidak ada

Perbandingan dengan penelitian sebelumnya menunjukkan hubungan yang linear antara aktivitas spesifik PLA2 dengan ada tidaknya sifat antibakteri. Semakin besar aktifitas spesifik menjadikan sifat antibakteri semakin kuat. Besarnya aktivitas spesifik PLA2 dalam ekstrak racun bergantung pada organisme penghasil racun. Racun ular umumnya memiliki aktivitas PLA2 yang jauh lebih tinggi dibanding organisme lain tanpa memerlukan proses pemurnian terlebih dahulu. Berat molekul PLA2 sendiri spesifik untuk masing-masing organisme.

BAB V

KESIMPULAN

Metode ekstraksi dan pemurnian parsial yang digunakan dalam penelitian ini mengacu kepada penelitian sebelumnya yang dilakukan Savitri *et al* pada tahun 2011 yaitu kombinasi teknik sonikasi, pemanasan, dan fraksinasi ammonium sulfat.

Pada penelitian ini, teknik yang diterapkan telah berhasil mengekstrak racun duri bintang laut *Acanthaster planci* asal perairan Maluku dan Papua yang diambil pada bulan April 2011. Teknik pemurnian kandungan fosfolipase A2 (PLA2) yang digunakan hanya berhasil pada ekstrak racun duri *A. planci* asal perairan Papua dengan kemurnian tertinggi 2.29 kali dibanding *crude venom* pada fraksinasi 60% ammonium sulfat jenuh (F60) dengan aktivitas spesifik 8.59 unit/mg protein. Ketidakberhasilan pemurnian pada ekstrak racun duri *A. planci* asal perairan Maluku disebabkan PLA2 ikut terdenaturasi saat dipanaskan pada suhu 60°C. Diduga Kandungan PLA2 pada sampel perairan Maluku ini merupakan jenis baru yang tidak tahan suhu tinggi. Keberadaan enzim ini pun selanjutnya telah dibuktikan dengan uji SDS-PAGE.

Dapat disimpulkan bahwa teknik pemurnian yang belum mampu memurnikan kandungan PLA2 dalam *crude venom* secara optimal Perbedaan waktu pengambilan sampel yang diujikan diduga menjadi penyebab pada ketidakberhasilan pemurnian.

Selain itu, dari hasil pengujian antibakteri dapat disimpulkan bahwa *crude venom* duri *A.planci* perairan Maluku atau pun Papua pada bulan April 2011 tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif yang diujikan. Namun hasil pemurnian *crude venom* duri *A.planci* asal perairan Papua pada F60 mampu memberikan aktivitas antibakteri kepada setiap bakteri uji meskipun sangat kecil. Faktor kemurnian PLA2 diduga mendasari tingkat kemampuan sifat antibakteri yang dimiliki.

Penelitian ini membuktikan bahwa enzim PLA2 duri bintang laut *Acanthaster planci* memiliki sifat antibakteri terhadap strain bakteri uji (*B. subtilis*, *M. luteus*, dan *S. aureus*). Penggunaan metode pemurnian yang cocok dengan kondisi sampel menjadi hal yang perlu diperhatikan untuk dapat

mengoptimalkan potensi racun bintang laut berduri *Acanthaster planci* sebagai agen antibiotik.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. <<http://www.microbelibrary.org/>> diakses pada 8/6/2011
- Anonim. Integrated Taxonomy Information System. <<http://www.itis.gov>> diakses pada 8/6/2011.
- Anonim. Taxonomy. <<http://www.uniprot.org>> diakses pada 8/6/2011
- Ashley K, Andrews RN, Cavazosa L, Demange M. 2001. *Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 16:1147-1153.
- Benzie, John A.H. 1999. *Major Genetic Differences between Crown-of-Thorns Starfish (Acanthaster planci) Populations in the Indian and Pacific Oceans*. Evolution. 53(6). pp. 1782-1795
- Bevers, E.M., H.H. Wang, J.A.F. Op den Kamp and L.L.M.van Deenen. 1979. *On the Interaction Between Intrinsic Proteins and Phosphatidylglycerol in the membrane of Acholeplasma laidlawii*. Arch. Biochem. Biophys. 193., 502.
- Bornomo RA. 2000. *Multiple antibiotic-resistant bacteria in longterm- care facilities: an emerging problem in the practice of infectious diseases*. Clin Infect Dis, 31:1414-1422.
- Boutrin, M.-C.F., Foster, H.A., and Pentreath, V.W. 2010. *The Effect of Bee (Apis mellifera) venom phospholipase A2 on Trypanosoma brucei brucei and enterobacteria*, Experimental Parasitology. Acta. 119.,246-251.
- Campbell, Reece & Mitchell. 2002. *Biologi, Edisi Kelima – Jilid 1*. Penerbit Erlangga : Jakarta. Hal : 98 – 102.
- Capper EA, Marshall LA. 2001. *Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis*. Prog Lipid Res 40:167–197.
- Costa, T.R., Menaldo, D.L., Oliveira, C.Z., Santos-Filho, N.A., Teixeira, S.S., Nomizo, A., Fuly, A.L., Monteiro, M.C., de Souza, B.M., Palma, M.S., Stabeli, R.G., Sampaio, S.V., and Soares. M.A. 2008. *Myotoxic Phospholipases A2 Isolated from Bothrops brazili Snake Venom and Synthetic Peptides Derived from Their C-terminal Region: Cytotoxic Effect on Microorganism and Tumor Cells*, Peptides. 29: 1645-1656.

- CRC. 2003. *Crown-of-thorns starfish in the Great Barrier Reefs: Current State of Knowledge*. Cooperative Research Centers (CRC) Reef Research Center. Townsville, Australia.
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. 2000. *Phospholipase A(2)s in cell injury and death*. J Pharmacol Exp Ther 294:793– 799.
- Deutscher, Murray. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington : University of Connecticut Health Center.
- Duboix, A., Campanac, C., Fauvel, J., Simon, Marie-Francoise., Salles, Jean-Pierre., Roques, C., Chap, H., Marty, N. 2003. *Bactericidal properties of group IIA secreted phospholipaseA2 against Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*, Journal of Medical Microbiology, 52, 1039–1045.
- Elsbach, P., Weiss, J., Franson, R.C., Beckerdite- Quangliata, S., Schneider, A., Harris, L. 1979. *Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes: observations on their relationship*. J. Biol. Chem. 25: 11000-11009.
- Gimenez, A.P., Wu, Y-Z., Paya, M., Delclaux, C., Touqui, L., and Goossens, P.L. 2004. *High Bactericidal Efficiency of Type IIA Phospholipase A2 against Bacillus anthracis and Inhibition of Its Secretion by the Lethal Toxin*, J. Immunol. 173: 521-530.
- Hermawan, A., Hana, W., dan Wiwiek, T. 2007. *Pengaruh Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus dan Escherichia coli dengan Metode Difusi Disk*. Universitas Erlangga.
- Humphrey, J.H., and Lightbown, J.W. 1952. *A General Theory for Plate Assay of Antibiotics with some Practical Applications*, J . gen. Microbiol. 7 ,1 29-143.
- Ismailova, Mayna. 2008. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Daun Kitoloid (Laurentia longiflora (L.) peterm.) Terhadap Bakteri yang Diisolasi dari Pasien Penderita Konjungtivitis*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung.
- Jawetz. E., J. Melnick, L. Adelberg, E.A. 2005. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. (Terjemahan Huriati dan Hartanto). Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.

- 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.
- Karray, A., Ali, Y. B., Gargouri, Y., Bezzine, S. 2011. *Antibacterial properties of chicken intestinal phospholipase A2*. *Lipids in Health and Disease*. 10-4.
- Kerns, R.T., Kini, R.M., Stefansson, S., and Evans, H.J. 1999. *Targeting of Venom Phospholipases: The Strongly Anticoagulant Phospholipase A2 from *Naja nigricollis* Venom Binds to Coagulation Factor Xa to Inhibit the Prothrombinase Complex*, *Biochim. Biophys.* 369: 107-113
- Koduri, R.S., Grönroos, J.O., Laine, V.J.O., le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J., Gelb, M.H. 2002. *Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X and XII secreted phospholipases A2*. *J. Biol. Chem.* 277: 5849-5857.
- Koelman J, and Roehm KH. 2005. *Color Atlas Biochemistry. 2nd ed.* Marburg: Thieme
- Koyama, T., Noguchi, K., Aniya, Y., and Sakanashi, M. 1998. *Analysis for Sites of Anticoagulant Action of Plancinin, a New Anticoagulant Peptide Isolated from the Starfish *Acanthaster planci*, in the Blood Coagulation Cascade*, *Gen. Pharmac.* Vol. 31, No. 2, pp. 277–282.
- Kusmayati dan Agustini, N. W. R. 2007. *Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentum*)*. *Biodiversitas*. 8(1) : 48-53.
- Laine, V.J.O., Grass, D.S., Nevalainen, T.J. 1999. *Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus**. *J. Immunol.* 162: 7402-7408.
- Marinetti, G. V. 1965. *The action of phospholipase A on lipoproteins*. *Biochim. Biophys. Acta* 98, 554±565.
- Mathews C. K., Van Holde, K. E., & K. G. Ahem. 2000. *Biochemistry 3rd Edition*. Addison – Wesley Pub. Co., San Fransisco, pp. 340 – 375
- Moran PJ (1990) *planci (L.): biographical data*. *Coral Reefs* 9:95-96
- Mounier, C.M., Bon, C., and Kini, R.M. 2001. *Anticoagulant Venom and Mammalian Secreted Phospholipases A2: Protein- versus Phospholipid-Dependent Mechanism of Action*, *Haemostasis*. 31: 279-287.

- Mounier, C.M., Franken, P.A., Verhejj, H.M., and Bon,C. 1996. *The Anticoagulant Effect of the Human Secretory Phospholipase A2 on Blood Plasma and on a Cell-free System is Due to a Phospholipid-independent Mechanism of Action Involving the Inhibition of Factor Va*, Eur J. Biochem. 237: 778-785.
- Mounier, C.M., Luchetta, P., Lecut, C., Koduri, R.S., Faure, G., Lambeau, G., Valentin, M., Singer, A., Ghomashchi, F., Suzette, B., Gelb, M.H., and Bon, C. 2000. *Basic Residues of Human Group IIA Phospholipase A2 Are Important for Binding to Factor Xa and Prothrombinase Inhibition*, Eur J. Biochem. 267: 4960-4969.
- Nevalainen, T. J., Kanchanapangka, S., Youngprapakorn, P., Webb, G.J.W., Manolis, S.C., and Scott. K. F. 2009. *Phospholipase A2 activity of crocodile serum*. Amphibia-Reptilia 30: 119-125
- Nevalainen, T.J., Haapamäki, M.M., Gronroos, J.M. 2000. *Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma*. Biochim. Biophys. Acta 1488: 83- 90.
- Nila. 2008. *Pengembangan Formula Krim Propolis dan Minyak Lavender serta Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Propionibacterium acnes*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung
- Pape, H. and H.J. Rehm. 1985. *Biotechnology*, Vol. 4, Academic Press, London, hlm. 249-275.
- Pelczar, M. J. Jr. and E. C Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi terjemahan dari Elements of Microbiology* Jilid 1. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, 42-49.
- Pelczar, Michael J.1986. *Dasar - Dasar Mikrobiologi*, Vol.1, Ed.1, Jakarta, Penerbit Universitas Indonesia, 46.
- Porter, J.W. 1972. *Predation by Acanthaster and its Effect on Coral Species Diversity*. *The American Naturalist*. 106(950): 487-492.
- Rittenhouse, S. and D. Deykin, *The Mobilization of Arachidonic Acid in Platelets Exposed to Thrombin or Ionophore A23187*, J. Clin. Invesi., 60, 1977, 495.
- Sahlan, Muhamad. 2002. *mksplorasi Enzim Fibrinolitik dari Cacing Tanah Pheretima sp. Galur Lokal*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung.

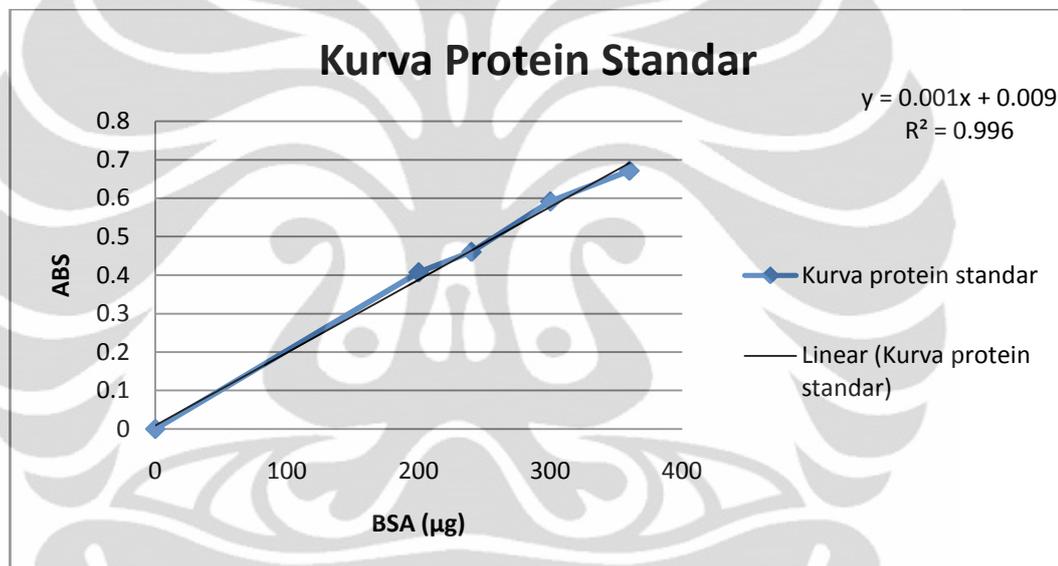
- Samy, R. P., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Chow, V. T., Bow, H., Yap, E.H., and Thong, T.W.J. 2007. *Antibacterial Activity of Snake, Scorpion and Bee Venoms: a Comparison With Purified Venom Phospholipase A2 Enzymes*. Journal of Applied Microbiology. 102. 650-659.
- Samy, R. P., Pachiappan, A., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Hian, Y. E., Chow, V. T. 2006. *In Vitro Antimicrobial Activity of Natural Toxins and Animal Venoms*. BMC Infectious Diseases. 6.100.
- Saputra, Y. E. 2009 . Spektrofotometri. <<http://www.chem-is-try.org>> diakses pada 8/6/2011.
- Satwika, Respatiphala A. 2010. *Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A2 dari Acanthaster planci*. Skripsi. Universitas Indonesia
- Savitri I.K.E., Ibrahim, F., Sahlan, M., Wijanarko, A. 2011. *Rapid and Efficient Purification Method of Phospholipase A2 from Acanthaster planci*. International Journal of Pharma and Bio Sciences Vol. 2,
- Schanne, F.A.X., A.B. Kane, E.E. Young and J.L. Farber, Calcium Dependence of Toxic Cell Death: A final Common Pathway, Science, 206, 1979, 700.
- Scope, R. K. 1993. *Protein Purification, Principles, and Practice, 3rd Edition*. Springer Veriag Newyork. Page : 15 - 21, 44 - 48, and 71 - 92.
- Shier, W.T., D. Eaker and T. Wadstrom. 1981. *Natural Toxin Stimulates Endogenous Phospholipase A2 Activity and Prostaglandin Synthesis in Fibroblast*, Biochim. Biophys. Acta. 663., 467.
- Shiomi, K., Kazama, A., Shimakura, K, and Nagashima, Y. P. 1997. *Purification and Properties of Phospholipases A2 From the Crown-of-Thorns Starfish (Acanthaster planci) venom*. Toxicon Vol. 36, No. 4, pp. 589±599.
- Sindurmata, Mulyawati. 1989. *Isolasi dan Beberapa Sifat Fosfolipase A2 dari Bisa Calloselasma rhodostoma (Boei)*. Desertasi. Institut Teknologi Bandung
- Sudarmadji, S. 1995. *Tehnik Analisa Biokimiawi*. Liberty. Yogyakarta
- Sweatman, H. *Commercial fishes as Predators of Adult Acanthaster planci*. 1997. Proc 8th Int Coral Reef Sym 1:617-620.
- Taketo MM, Sonoshita M. 2002. *Phospholipase A2 and apoptosis*. Biochim Biophys Acta 1585:72–76.

- Thomas, S.W. 1982. *Cytolytic Mechanism: Self-destruction of mammalian Cells by Activation of Endogenous Hydrolytic Enzymes*, J. Toxicol. Toxin Rev. 1.No. 1, 1.
- Tu, A. T. 1977. in *Venoms: Chemistry and Molecular Biology* (Tu, A. T., ed.), pp. 23-63, John Wiley and Sons, New York.
- Van Zoelen, E.J.J., B. de Kruijff and L.L.M. van Deenen. 1978. *Protein Mediated Transbilayer Movement of Lysophosphatidylcholine in Glycophorin Containing Vesicles*, Biochim. Biophys. Acta. 508., 97.
- Wang, S. 2006. *Enzyme Purification By Salt (Ammonium Sulfate) Precipitation*. <http://www.glue.umd.edu.htm>.
- Weltzien, H.U. 1979. *Cytolytic and Membrane Pertubing Properties of Lysophosphatidylcholine*, Acta. 559., 259.
- Widyarti, S. 2006. *Prinsip-Prinsip Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Laboratorium Biologi Molekuler. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yamaguchi M. 1986. *planci infestations of reefs and coral assemblages in Japan: a retrospective analysis of control efforts*. Coral Reefs 5:23-30.
- Yusuf S. 2008. *Fenomena Ledakan Populasi Acanthaster planci dan Pola Pemangsaan Pada Karang Keras di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan*. Simposium Terumbu Karang Nasional, Jakarta 18-20 N.
- Zarai, Z., Bacha, A.B., Horchani, H., Bezzine, S., Zouari, N., Gargouri, Y., and Mejdoub, H. 2010. *A Novel Hepatopancreatic Phospholipase A2 from Hexaplex trunculus with Digestive and Toxic Activities*, Biochim. Biophys. 494., 121-129.
- Zwall, R.F.A., B. Roelofsen, P. Comfurius and L.L.M. van Deenen. 1975. *Organization of Phospholipids in the Human red Blood Cell Membrane as Detected by Action of Various Purified Phospholipases*, Biochim. Biophys. Acta. 406., 83.

LAMPIRAN A
PENENTUAN KANDUNGAN PROTEIN (METODE LOWRY)

Tabel A.1 Kurva Protein Standar Sampel Racun Duri *A.planci* Perairan Maluku

Tabung	BSA (μg)	Ab ₇₅₀
1	0	0.049
3	200	0.456
4	240	0.509
5	300	0.64
6	360	0.72



Gambar A.1 Kurva Standar Protein BSA

Penentuan Kadar Protein Sampel

Kurva standar protein antara absorbansi pada panjang gelombang 750 nm dan kadar protein (μg) didapat persamaan garis

$$y = 0,001x + 0,009$$

Dengan y adalah nilai absorbansi sampel dan x adalah nilai kadar protein dalam μg .

Contoh perhitungan :

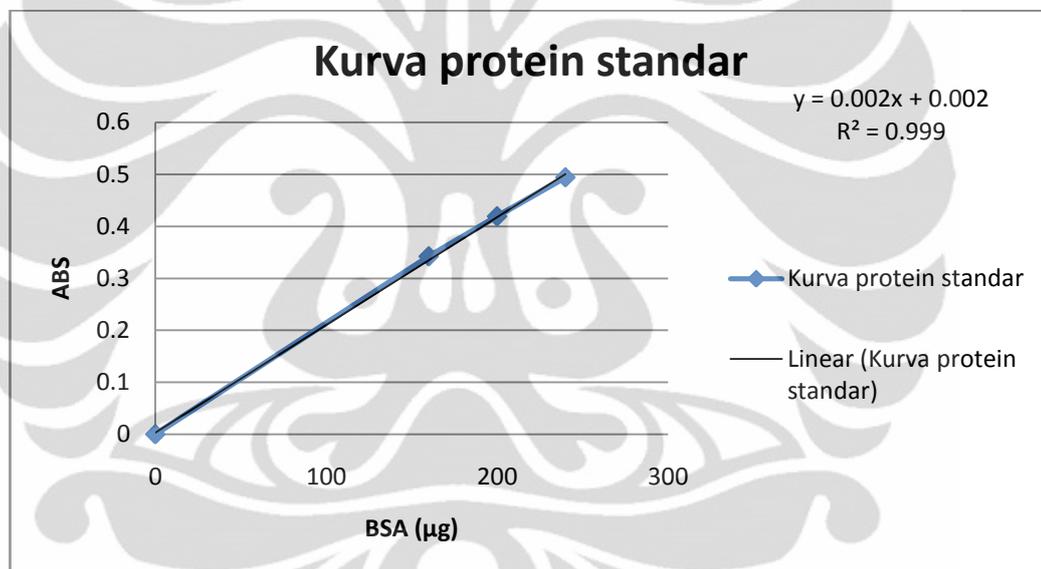
Absorbansi sampel *crude venom* (CV) setelah dikurangi blanko sebesar 0.0485, maka kadar proteinnya

$$x = \frac{0,0485 - 0,009}{0,001}$$

Maka didapat kadar CV sebesar 39.5 µg, karena sampel yang digunakan sebesar 20 µl, maka 39.5 µg/20 µl = 1.97 mg/ml

Tabel A.2 Kurva Protein Standar Sampel Racun Duri *A.planci* Perairan Papua

Tabung	BSA (µg)	Ab _{S750}
1	0	0.051
2	160	0.393
3	200	0.47
4	240	0.545



Gambar A.2 Kurva Standar Protein BSA

LAMPIRAN B

PENENTUAN AKTIVITAS SPESIFIK PLA₂

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 1 menit berkurang 0,013 absorbansi, sehingga $0,013 \text{ absorbansi} / (1 \text{ menit} \cdot 0.01) = 1.32 \text{ unit}$

$1.32 \text{ unit} - 0 \text{ unit}$ (blanko substrat yang *steady* tanpa ada penurunan abs) = 1,32 unit

Aktivitas Enzim (unit/ml)

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai unit per ml sampel enzim PLA₂ yang digunakan.

Contoh : aktivitas sampel CV = $1,32 \text{ unit} / 0,2 \text{ ml} = 6.6 \text{ unit/ml}$

Unit Total (unit)

Merupakan aktivitas keseluruhan sampel enzim PLA₂ yang didapat.

Contoh : unit total sampel CV = aktivitas x volume total sampel enzim = $6.6 \text{ unit/ml} \times 220 \text{ ml} = 1452 \text{ unit}$

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 = $1,76 \text{ mg/ml} \times 220 \text{ ml} = 387.75 \text{ mg}$

Aktivitas Spesifik (unit/mg)

Aktivitas spesifik didefinisikan sebagai aktivitas per satuan protein (mg).

Contoh : aktivitas spesifik CV = $1425 \text{ unit} / 387.75 \text{ mg} = 3.74 \text{ unit/mg}$

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 3.74 unit/mg dan 3.5 unit/mg, maka tingkat kemurnian sampel PV adalah $3.5/3.74 = 0.94$



Tabel B.1 Hasil Pemurnian Enzim PLA2 untuk Sampel Racun *A.planci* Perairan Papua

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	1.76	220	1.32	6.6	1452	387.75	3.74	1
PV	1.8	210	1.26	6.3	1324.05	378	3.5	0.94
F1	0.74	3.3	0.69	3.44	11.35	2.43	4.66	1.25
F2	5.24	3.3	7.27	36.36	119.97	17.28	6.94	1.85
F3	5.2	3.3	8.97	44.865	148.05	17.24	8.59	2.29
F4	9.0	3.3	9.3	46.5	153.43	29.62	5.18	1.38
F5	20.28	3.3	4.74	23.72	78.26	66.91	1.17	0.31

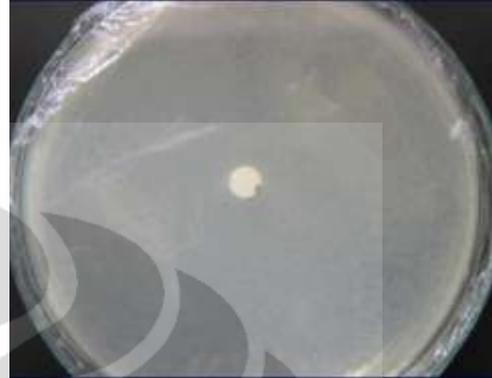
Tabel B.2 Hasil Pemurnian Enzim PLA2 untuk Sampel Racun *A.planci* Perairan Maluku

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	1.98	110	3.786	18.93	2082.3	217.25	9.58	1
PV	1.85	100	1.521	7.61	760.5	185	4.11	0.43
F1	0.2	1.65	0.222	1.11	1.8315	0.33	5.55	0.58
F2	26.85	1.65	4.036	20.18	33.297	44.3025	0.75	0.08
F3	11.23	1.65	4.035	20.18	33.28875	18.52125	1.8	0.19
F4	19.8	1.65	4.144	20.72	34.188	32.67	1.05	0.11
F5	6.03	1.65	4.058	20.29	33.4785	9.94125	3.37	0.35

LAMPIRAN C
DOKUMENTASI PENELITIAN



Gambar C.1 Protein Standar dalam Uji Kandungan Protein (Lowry)



Gambar C.4 Alkohol 70% pada *S.aureus*



Gambar C.2 Alkohol 70% pada *B.subtilis*



Gambar C.5 Penampakan Hasil Uji Aktivitas. (dari kiri ke kanan) Substrat+ammonium sulfat, Substrat+ekstrak racun, Substrat, Larutan Buffer



Gambar C.3 Alkohol 70% pada *M.luteus*

LAMPIRAN D
DATA PENGAMATAN

Tabel D.1 Data Pengamatan Aktivitas PLA2 Racun Duri *A.planci* Perairan Papua

waktu substrat (detik)	waktu substrat+sampel (detik)	Abs substrat 1	Abs substrat2	Abs CV Papua 1	Abs CV Papua 2	Abs CV Papua 3	Abs PV Papua 1	Abs PV Papua 2	Abs F20 Papua 1	Abs F20 Papua 2	Abs F40 Papua 1	Abs F40 Papua 2	Abs F60 Papua 1	Abs F60 Papua 2	Abs F80 Papua 1	Abs F80 Papua 2	Abs F100 Papua 1	Abs F100 Papua 2
0	15	0.4751	0.4763	0.4391	0.4014	0.465	0.4484	0.4209	0.4507	0.4915	0.2745	0.2428	0.0687	0.0527	0.0156	0.0135	0.224	0.224
10	20	0.4729	0.4788	0.4348	0.3998	0.4554	0.4447	0.418	0.4507	0.4878	0.2251	0.1956	0.0494	0.0386	0.014	0.0134	0.224	0.224
20	30	0.4728	0.4785	0.4304	0.3962	0.4532	0.4402	0.4144	0.4521	0.4913	0.1868	0.1603	0.0399	0.032	0.0117	0.0132	0.224	0.224
30	40	0.472	0.478	0.4255	0.3922	0.4487	0.4355	0.4086	0.4464	0.4896	0.158	0.135	0.0344	0.0283	0.0112	0.0117	0.224	0.224
40	50	0.4714	0.4788	0.4196	0.3876	0.4404	0.4304	0.4037	0.4425	0.4884	0.1367	0.1166	0.0322	0.0261	0.0106	0.0117	0.224	0.224
50	60	0.4723	0.4791	0.4125	0.3828	0.4338	0.426	0.3993	0.4413	0.486	0.1212	0.1031	0.0294	0.0247	0.01	0.0115	0.224	0.224
60	70	0.473	0.4792	0.4054	0.3777	0.4286	0.4207	0.3948	0.4388	0.4847	0.109	0.0934	0.0278	0.024	0.01	0.0106	0.224	0.224

Tabel D.1 Data Pengamatan Aktivitas PLA2 Racun Duri *A.planci* Perairan Maluku

waktu substrat (detik)	waktu substrat+sampel (detik)	Abs Substrat	Abs CV ambon 1	Abs CV ambon 2	Abs PV ambon 1	Abs PV ambon 2	Abs F20 ambon 1	Abs F20 ambon 2	Abs F40 ambon 1	Abs F40 ambon 2	Abs F60 ambon 1	Abs F60 ambon 2	Abs F80 ambon 1	Abs F80 ambon 2	Abs F100 ambon 1	Abs F100 ambon 2
0	15	0.2235	0.1029	0.1392	0.2284	0.1941	0.2192	0.2329	0.0208	0.0306	0.024	0.0306	0.0157	0.0149	0.0208	0.0226
10	20	0.2227	0.0826	0.1074	0.2213	0.1748	0.2163	0.2289	0.0201	0.027	0.0208	0.0254	0.0153	0.0137	0.0199	0.0206
20	30	0.2222	0.0649	0.0835	0.2073	0.1625	0.2107	0.225	0.0189	0.0247	0.019	0.0234	0.0153	0.0133	0.019	0.0208
30	40	0.2216	0.0464	0.0616	0.1943	0.1536	0.2087	0.2239	0.0176	0.0239	0.0176	0.0221	0.0142	0.0129	0.0194	0.0186

waktu substrat (detik)	waktu substrat+sampel (detik)	Abs Substrat	Abs CV ambon 1	Abs CV ambon 2	Abs PV ambon 1	Abs PV ambon 2	Abs F20 ambon 1	Abs F20 ambon 2	Abs F40 ambon 1	Abs F40 ambon 2	Abs F60 ambon 1	Abs F60 ambon 2	Abs F80 ambon 1	Abs F80 ambon 2	Abs F100 ambon 1	Abs F100 ambon 2
40	50	0.2207	0.0331	0.0435	0.179	0.1414	0.2007	0.2227	0.0168	0.0226	0.017	0.0209	0.0133	0.0125	0.0183	0.0176
50	60	0.2206	0.0283	0.0331	0.1613	0.1266	0.1986	0.2192	0.0156	0.0208	0.0161	0.0204	0.0135	0.0121	0.0172	0.017
60	70	0.22	0.0259	0.0286	0.1475	0.1121	0.1951	0.2147	0.0154	0.0201	0.0156	0.0193	0.0145	0.0117	0.0177	0.0162