



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**EKSTRAKSI PHOSPOLIPASE A2 DURI BINTANG LAUT  
*Acanthaster planci* PERAIRAN MALUKU DAN PREPARASI  
UJI AKTIVITAS ANTIVIRAL PADA HIV**

**SKRIPSI**

**KENNY LISCHER  
0806340095**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**EKSTRAKSI PHOSPOLIPASE A2 DURI BINTANG LAUT  
*Acanthaster planci* PERAIRAN MALUKU DAN PREPARASI  
UJI AKTIVITAS ANTIVIRAL PADA HIV**

**SKRIPSI**

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

**KENNY LISCHER  
0806340095**

**FAKULTAS TEKNIK  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI BIOPROSES  
DEPOK  
JULI 2012**

## HALAMAN PERSETUJUAN

Judul : Ekstraksi Phospolipase A2 Duri Bintang Laut *Acanthaster planci*  
Perairan Maluku dan Preparasi Uji Aktivitas Antiviral pada HIV

Nama : Kenny Lischer

NPM : 0806340095

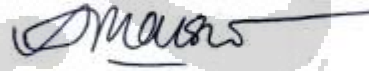
Laporan skripsi ini telah diperiksa dan disetujui,

1 Juli 2012



Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng.

Pembimbing I



Dr. Amarila Malik, M.Si. Apt.

Pembimbing II

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

**Nama : Kenny Lischer**

**NPM : 0806340095**

**Tanda Tangan : **

**Tanggal : 1 Juli 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Kenny Lischer  
NPM : 0806340095  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Judul Skripsi : Ekstraksi Phospolipase A2 Duri Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Preparasi Uji Aktivitas Antiviral pada HIV

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

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng.

Pembimbing II: Dr. Amarila Malik, M.Si. Apt.

Penguji : Dr. Tania Surya Utami, S.T. M.T.

Penguji : Dr. Muhammad Sahlan, S.Si. M.Eng

Penguji : Dr. Ing. Doni Adinata, S.T.

Ditetapkan di : Departemen Teknik Kimia

Tanggal : 1 Juli 2012

Tanggal : 1 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkah rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi "**Ekstraksi Phospolipase A2 Duri Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Preparasi Uji Aktivitas Antiviral pada HIV**". Adapun karya ilmiah ini disusun untuk diajukan ke sebagai tugas akhir mata kuliah skripsi.

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini, terutama kepada :

1. Prof. Dr. Ir Anondho Wijanarko, M.Eng, Dr. Amarila Malik, M.Si. Apt. dan Dr. Muhammad Sahlan, S.Si, M.Eng., selaku pembimbing yang telah memberikan saran-saran yang berguna bagi penulis.
2. Ibu Imelda untuk bimbingannya selama mengerjakan skripsi ini dari mulai awal hingga selesai
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. Orang tua dan keluarga penulis yang telah memberikan dukungan moral dan materi sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan makalah ini
5. Kawan satu riset grup, Muhammad Iqbal, Raditya Imamul, Pauline Leon, Yongki Suharya, Khotib Sarbini, Desi Anggarawati, dan Darul Hamdi, yang menjadi teman seperjuangan untuk menyelesaikan skripsi ini.
6. Para pengajar Rumah Belajar Kita, Naimah Lutfi Thalib, Ridhaninggar, dan Danar Anindito Mu'jizat, serta para adik-adik rumbel yang selalu memberikan keceriaan di akhir minggu dikala menyelesaikan skripsi ini.
7. Teman-teman Young On Top Campus Ambassador, Young Leaders for Indonesia, dan Forum Indonesia Muda yang selalu memberikan semangat juang baik dalam kehidupan, impian, dan kepemimpinan. Kelak Indonesia akan tersenyum karena orang-orang yang berada disini.

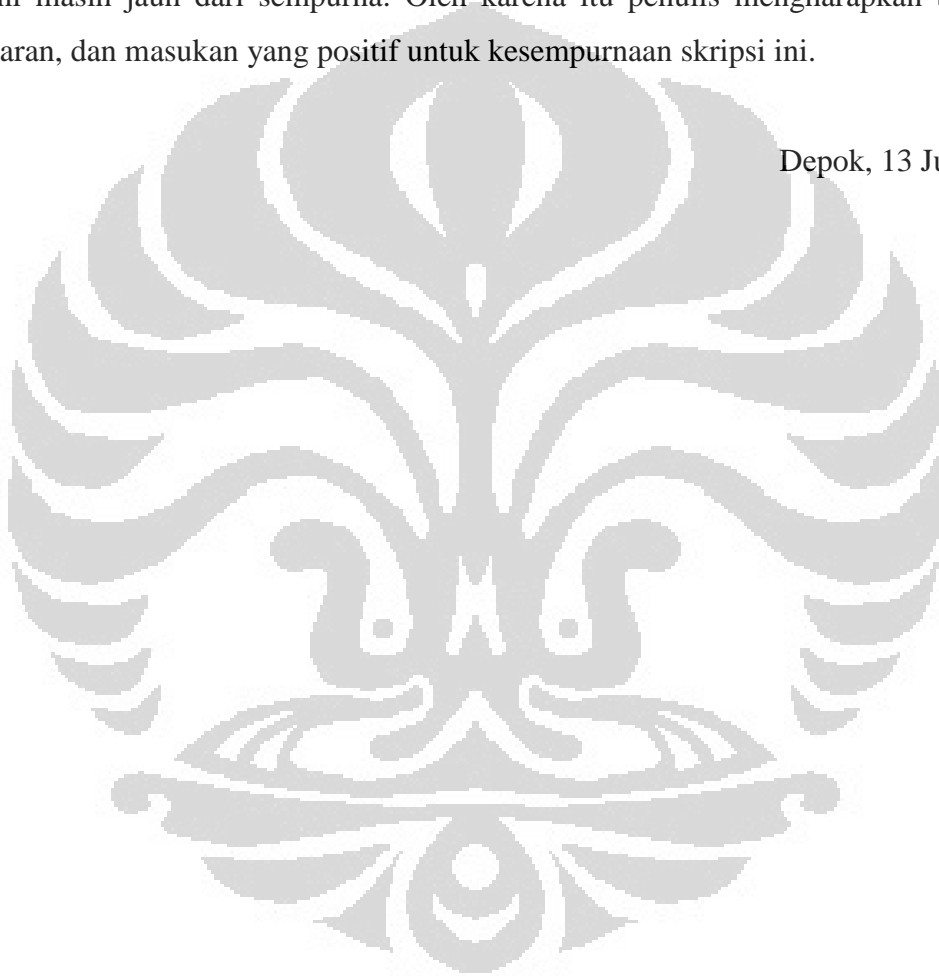
8. Teman-teman DTK UI angkatan 2008, 2009, 2010, dan 2011 yang selalu memberi semangat kepada penulis dalam kehidupan dinamika kampus yang padat.

9. Pihak lain yang mendukung yang tidak bisa disebutkan satu-persatu

Semoga karya ilmiah ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang bersangkutan, khususnya bagi penulis dan umumnya bagi para pembaca. Dengan segala kerendahan hati, penulis menyadari bahwa penulisan karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan bantuan, saran, dan masukan yang positif untuk kesempurnaan skripsi ini.

Depok, 13 Juni 2012

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Kenny Lischer  
NPM : 0806340095  
Program Studi : Teknologi Bioproses  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : Skripsi

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

**Ekstraksi Phospolipase A2 Duri Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Preparasi Uji Aktivitas Antiviral pada HIV**

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif 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 : 1 Juli 2012

Yang menyatakan



(Kenny Lischer)



(Kenny Lischer)

## ABSTRAK

Nama : Kenny Lischer

Program Studi : Teknologi Bioproses

Judul : Ekstraksi Phosfolipase A2 Duri Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Maluku dan Preparasi Uji Aktivitas Antiviral pada HIV

*A. planci* dilaporkan memiliki enzim phosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) yang memiliki aktivitas antimikroba, antikanker dan antiviral. Sementara itu, penyakit AIDS semakin menyebar yang diakibatkan oleh virus HIV atau *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Dalam penelitian ini digunakan PLA<sub>2</sub> yang berasal dari *A. planci* dapat memiliki aktivitas antiviral juga. Dalam penelitian ini dilaporkan hasil preparasi untuk uji aktivitas antiviral PLA<sub>2</sub> pada HIV. Enzim PLA<sub>2</sub> diekstraksi dan dimurnikan kemudian difraksinasi dengan amonium sulfat. Hasil dari ekstraksi, pemurnian, dan fraksinasi didapatkan sampel CV, PV, F20, F40, F60, dan F80. Sampel yang didapatkan dilakukan pengukuran uji aktivitas yang diukur melalui absorbansi pada spektrofotometer UV-VIS, uji konsentrasi dengan metode lowry, dan SDS-PAGE. Sementara itu, inkubasi virus dimulai dari persiapan PBMC dari elusi sel darah merah. PBMC yang didapatkan kemudian diinfeksi dengan darah yang mengandung virus HIV. Virus kemudian diidentifikasi dengan menggunakan PCR. Dari hasil uji aktivitas, didapatkan sampel F20 yang akan digunakan untuk uji antiviral karena memiliki aktivitas spesifik dan kemurnian 16,39 kali lebih murni dari CV. PBMC yang didapatkan mencapai  $\pm 10^7$  sel/ml. Setelah 1 bulan inkubasi, dilaporkan tidak adanya virus yang terdeteksi. Setelah ditelusuri terdapat kontaminasi bakteri pada media yang mempengaruhi pertumbuhan virus.

Kata kunci : *A. planci*; HIV; PLA<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

Name : Kenny Lischer  
Major : Teknologi Bioproses  
Tittle : Extraction of Phospolipase A2 from Maluku Crown of Thorn Starfish Toxic and Preparation of Antiviral Test in HIV

*A. planici* has enzyme, phospolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), which has ability as antimicrobe, anti-cancer, and antiviral agent. AIDS had become big pandemic in the world cause of the spread of HIV virus. Furthermore, experiment of PLA<sub>2</sub> from *A. planici* which had antiviral activity must be identified. This report was reporting preparation result for PLA<sub>2</sub> antiviral test to HIV. Extract of venom from *A. planici* was purified by heat and amonium sulfate fractionation, resulting CV, PV, F20, F40, F60, and F80. Specific activity was measured by spectrofotometer UV-VIS, concentration of enzyme by lowry method, and purity of enzyme by SDS-PAGE. Meanwhile, virus incubation was started from PBMC preparation by elution of red blood cell. Then, PBMC would be infected by HIV virus. Identification of the presence of virus in the growth media was identified by using PCR. From the result, F20 have biggest specific activity and purity level by 16.39 times bigger than CV. Obtained PBMC was around  $\pm 10^7$  cell/ml. After one month incubation, report that there were no virus which was detected. Then, it also indicate that there are bacteria contamination in the media which affect the virus growth.

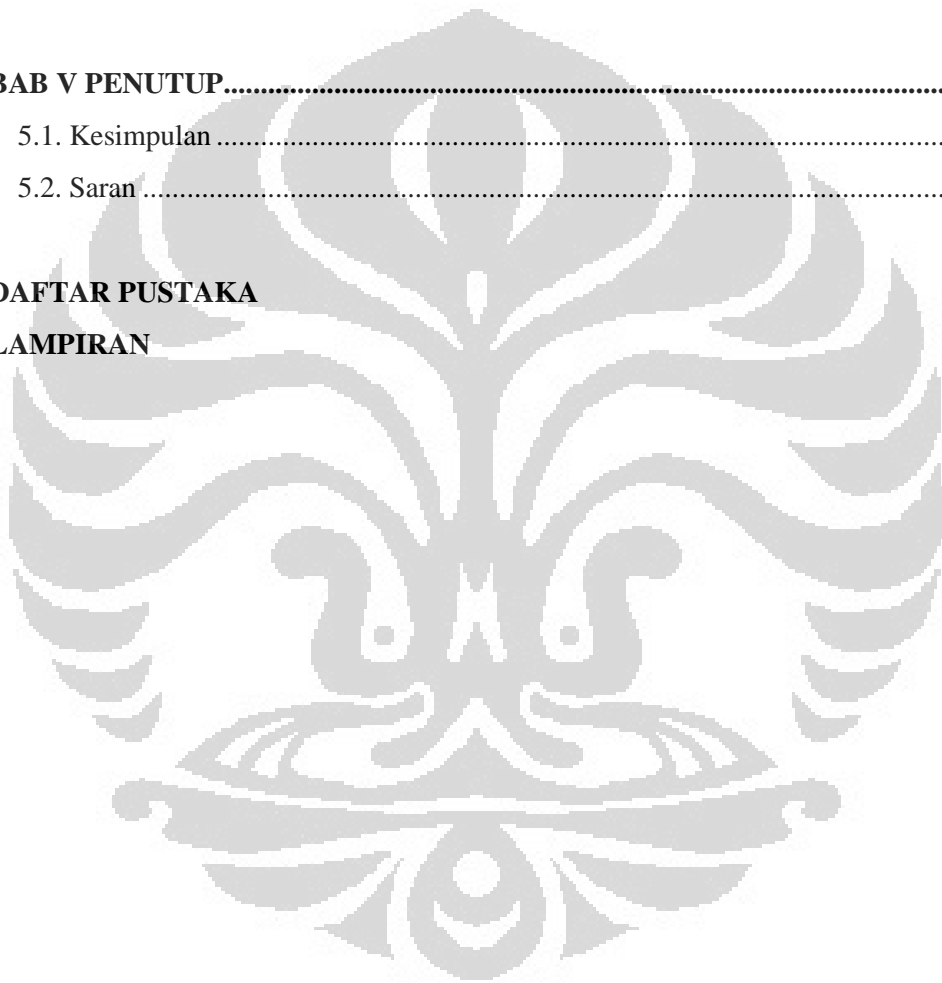
**Keywords** : *A. planici*; HIV; PLA<sub>2</sub>.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB IPENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	2
1.3. Tujuan Penulisan.....	2
1.4. Batasan Masalah .....	3
1.5. Tempat dan Waktu Penelitian.....	3
1.6. Sistematika Penulisan .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Human Immunodeficiency Virus (HIV) .....	5
2.2. <i>Acanthaster planci</i> .....	8
2.2.1. Distribusi.....	9
2.2.2. Klasifikasi dan Morfologi .....	10
2.2.3. Pertumbuhan, Reproduksi, dan Siklus Hidup .....	11
2.2.4. Peledakan, Populasi, dan Dampaknya .....	12
2.3. Racun <i>Acanthaster planci</i> .....	13

2.3.1. Phospolipase A <sub>2</sub> .....	14
2.3.2. Mekanisme Racun <i>A. planci</i> sebagai Antiviral .....	15
2.4. Gen Phospolipase A <sub>2</sub> pada Racun Ular, Lebah, dan Bintang Laut .....	17
2.4.1. Gen Phospolipase A <sub>2</sub> pada Racun Ular .....	18
2.4.2. Gen Phospolipase A <sub>2</sub> pada Racun Lebah .....	19
2.4.3. Gen Phospolipase A <sub>2</sub> pada Racun Bintang Laut .....	20
2.5. Spektroskopi UV-VIS .....	21
2.6. Metode Lowry .....	22
2.7. Elektroda SDS-PAGE .....	22
2.8. Metode Dialisis .....	23
2.10. Inkubasi Virus HIV .....	24
2.11. Metode Infektivitas Virus .....	26
2.11.1. Assay Kuantitatif .....	26
2.11.2. Assay Kuantal .....	27
2.12. State of The Art .....	29
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
3.1. Rancangan Penelitian .....	31
3.2. Alat dan Bahan .....	34
3.2.1. Alat .....	34
3.2.2. Bahan .....	34
3.3. Variabel Penelitian .....	35
3.3.1. Variabel Bebas .....	35
3.3.2. Variabel Kontrol .....	35
3.3.3. Variabel Terikat .....	35
3.4. Prosedur Preparasi Sampel .....	35
3.5. Metode Sonikasi .....	36
3.6. Prosedur Uji Aktivitas Phospolipase .....	36
3.7. Prosedur Uji SDS-PAGE .....	36
3.8. Prosedur Uji Lowry .....	38
3.9. Prosedur Inkubasi Virus HIV .....	39
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
4.1. Ekstraksi Phospolipase A <sub>2</sub> .....	41

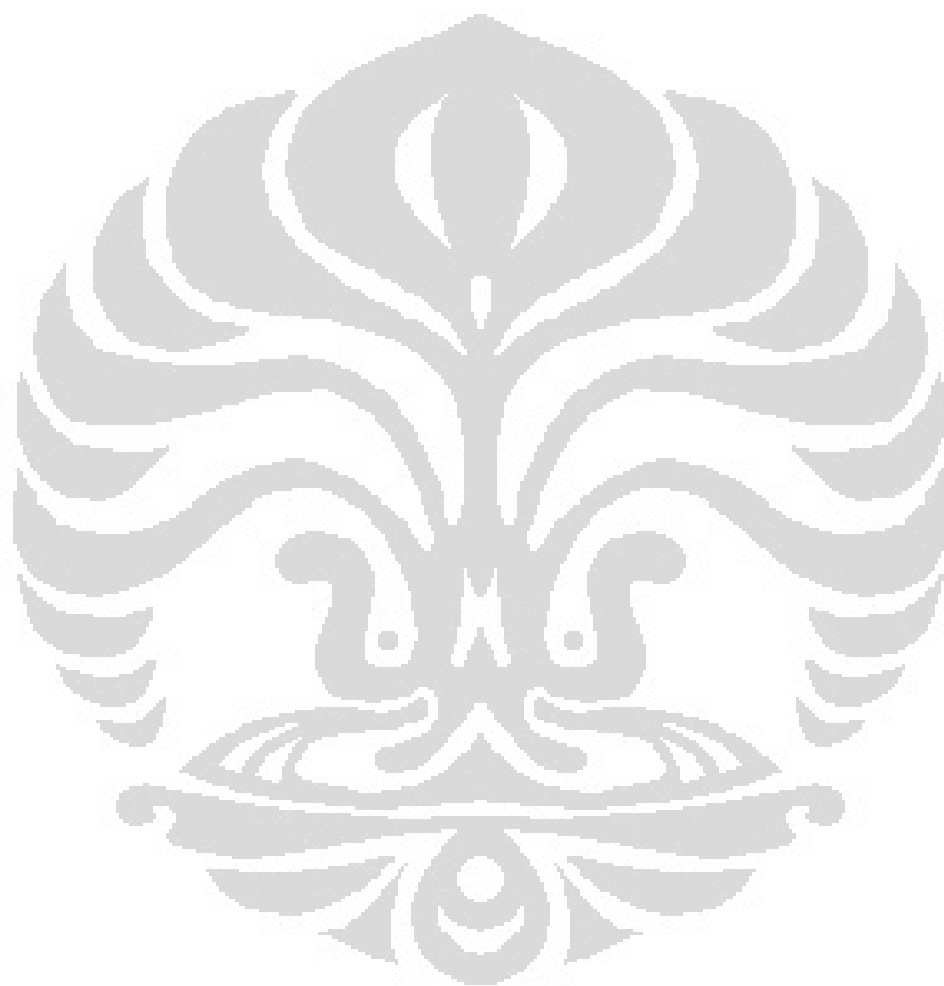
4.2. Pemurnian Phospolipase A <sub>2</sub> .....	42
4.3. Uji Metode Lowry.....	44
4.4. Uji Aktivitas Phospolipase A <sub>2</sub> .....	45
4.5. Uji SDS Page .....	50
4.6. Hasil Preparasi Inkubasi Virus HIV.....	52
4.6.1. Mendapatkan PBMC Terstimulasi.....	52
4.6.2. Infeksi PBMC .....	52
4.6.3. Hasil Identifikasi Virus dari Media.....	53
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>56</b>
5.1. Kesimpulan .....	56
5.2. Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur virus HIV.....	5
Gambar 2. 2. Siklus hidup virus HIV.....	6
Gambar 2. 3. Gambar lipid bilayer dan zat yang dikandung virus HIV .....	7
Gambar 2.4. Acanthaster planci.....	9
Gambar 2.5. Tekstur epidermis <i>A. planci</i> yang dipenuhi duri.....	11
Gambar 2.6. Kaki ambulakral <i>A. planci</i> .....	11
Gambar 2.7. Siklus hidup <i>A. planci</i> .....	12
Gambar 2.8. Perusakan karang akibat peledakan populasi <i>A. planci</i> .....	13
Gambar 2.9. Jenis-jenis phospholipase dan tempat pemotongannya.....	14
Gambar 2.10. Mekanisme Kerja PLA <sub>2</sub> .....	15
Gambar 2.11. Mekanisme melarutkan komponen membran pada selubung .....	17
Gambar 2.12. Nukleotida dan urutan asam amino PLA <sub>2</sub> dari kelenjar racun.....	19
Gambar 2.13. <i>Sequence</i> cDNA dari AccPLA <sub>2</sub> .....	20
Gambar 2.14. Penjajaran <i>sequence</i> asam amino AP-PLA <sub>2</sub> lainnya.....	20
Gambar 2. 15. Metode dialisis .....	23
Gambar 2. 16. Gambar letak PBMC setelah sel darah merah disentrifugasi.....	25
Gambar 2. 17. Kurva Pertumbuhan Virus.....	25
Gambar 2. 18. penampakan sel PBMC .....	26
Gambar 2.19. Plak virus pada cawan petri.....	27
Gambar 2. 20. Contoh assay TCID <sub>50</sub> .....	28
Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian .....	31
Gambar 4. 1. Duri <i>A. planci</i> Siap Ekstrak dari Perairan Maluku.....	41

Gambar 4. 2. Hasil ekstraksi dan pemurnian racun dari <i>A. planci</i> .....	44
Gambar 4. 3. Hasil uji aktivitas.....	46
Gambar 4. 4. Hasil SDS-PAGE .....	51
Gambar 4. 8. Gambar pertumbuhan virus pada media PBMC .....	54
Gambar A. 1 Kurva Standar Protein BSA	



## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1. Tabel komposisi fosfolipid pada virus HIV .....	8
Tabel 2.2. Contoh data hasil infeksi virus pada assay.....	28
Tabel 2.3. State of the art penelitian ini .....	30
Tabel 3. 1. Metode Penentuan Kadar Protein (Lowry) .....	39
Tabel 4. 1. Hasil Uji Metode Lowry .....	45
Tabel 4. 2. Hasil Aktivitas Spesifik dan Tingkat Kemurnian Sampel .....	48
Tabel A. 1. Kurva Protein Standar Sampel Racun Duri <i>A.planci</i> Perairan Maluku	
Tabel C. 1. Data Hasil Uji Aktivitas PLA <sub>2</sub>	



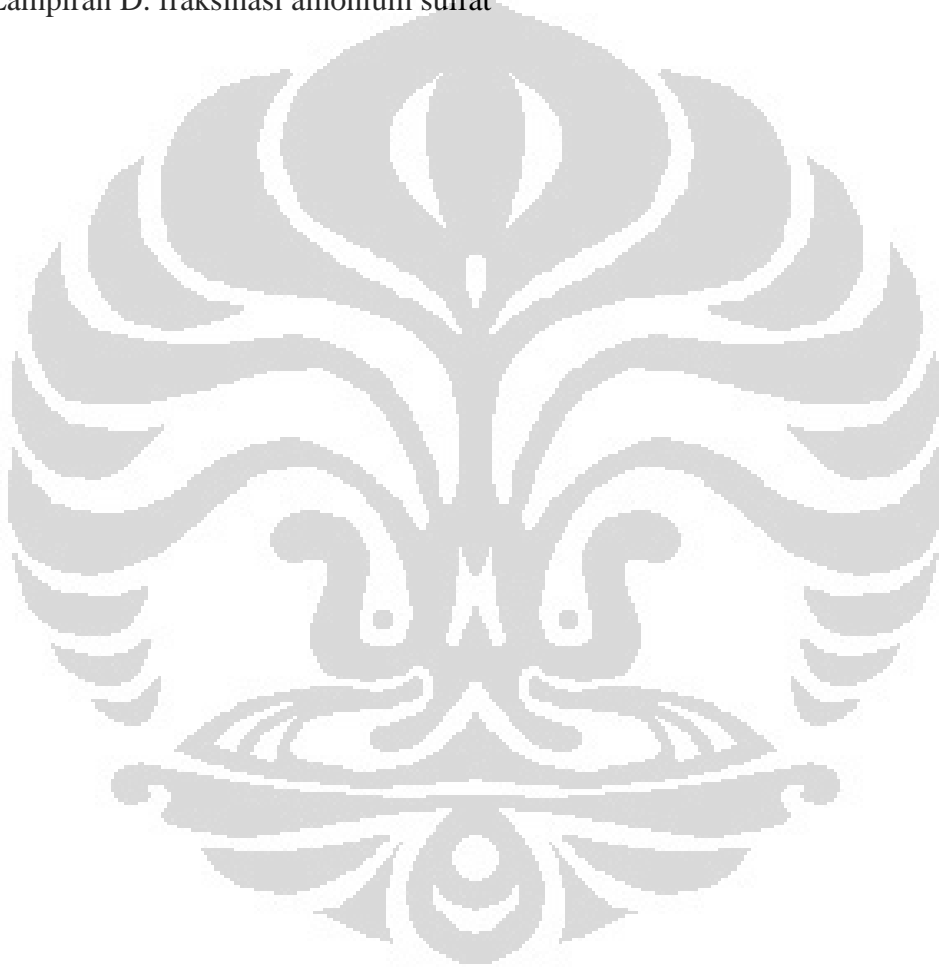
## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A Penentuan Kandungan Metode Lowry

Lampiran B. Penentuan Aktivitas Spesifik PLA<sub>2</sub>

Lampiran C. Data Hasil Uji Aktivitas PLA<sub>2</sub>

Lampiran D. fraksinasi amonium sulfat



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Bintang laut *Acanthaster planci* (*A. planci*) hidup di perairan tropis dan subtropis, tersebar pada terumbu karang sepanjang daerah Indo-Pasifik dan beberapa lokasi seperti Red Sea, Mauritius, Maldives, dan Teluk Panama. Sebaran *A. planci* di Indonesia tercatat hampir semua pulau dari Sabang sampai Merauke (Budiyanto, 2002).

Di Indonesia keberadaan *A. planci* telah dilaporkan sejak tahun 1970an oleh para peneliti LIPI, di sekitar Ambon dan Kepulauan Seribu. Pada tahun 1996 juga dijumpai adanya pemangsaan karang oleh *A. planci* yang menghabiskan hampir seluruh karang di Pulau Menjangan, Taman Nasional Bali Barat, dan Pantai Bama, Taman Nasional Baluran (Bachtiar, 2009). Pada tahun 2005, peledakan populasi bintang laut *A. planci* dilaporkan terjadi di pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan (Bachtiar, 2009).

Populasi bintang laut ini merupakan salah satu masalah potensial yang dihadapi dalam pengelolaan terumbu karang. Diantara pemangsa yang ada, *A. planci* merupakan pemangsa karang yang paling berbahaya terutama ketika terjadi peledakan populasi karena bintang laut ini hidup dengan memakan polip karang (Budiyanto, 2002) dan membuat hampir seluruh karang hidup mati karena dimangsa (Bachtiar, 2009).

Kerusakan terumbu karang yang dapat ditimbulkan oleh *A. planci* sangat besar sehingga penanggulangannya membutuhkan dana yang besar pula. Di Rukyu Islands, Jepang, kehadiran *A. planci* telah menelan biaya sebesar JPY 600 juta untuk memusnahkan 13 juta bintang laut antara tahun 1970-1983. Di perairan sekitar Cairns-Whitsunday, GBR, peledakan populasi *A. planci* telah menelan biaya 3 juta AUD untuk pengendalian populasi selama setahun pada tahun 2001.

Sementara itu, pada permukaan tubuh bagian atas *A. planci* terdapat duri beracun yang berbahaya bagi manusia. Ketika tertusuk duri *A. planci*, variasi gejala patologikal seperti perih, memar, bengkak, dan muntah dapat terjadi. Racun

kasar yang diekstrak dari duri memperlihatkan aktivitas biologis yang beragam seperti kematian pada tikus, aktivitas hemolitik, aktivitas *myonecrotic*, aktivitas *hemorrhagic*, peningkatan aktivitas permeabilitas kapiler, aktivitas pembentukan edema, aktivitas fosfolipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>) (Shiomi dkk.,1985), antikoagulan (Karasudani dkk., 1989), dan terdapat potensial *hepatotoxic* (Shiomi dkk., 1997; Watanabe, 2008). Kandungan dalam racun *Acanthaster planci* yaitu PLA<sub>2</sub> (Shiomi dkk., 1997), plancinin, dan plancitoxin (DNAse II) (Watanabe, 2008).

Beberapa penelitian mengenai racun pada ular dan lebah diketahui bahwa kedua racun tersebut memiliki kandungan yang sama yaitu PLA<sub>2</sub>, sama seperti yang dimiliki oleh racun bintang laut *Acanthaster planci* ini. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa PLA<sub>2</sub> pada racun ular dan lebah mempunyai aktivitas terhadap sebagai antivirus untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (Meenakshisundaram, 2009; Fenard, 1999).

Dari kesamaan kandungan inilah didapatkan hipotesa bahwa PLA<sub>2</sub> pada *A. planci* ini juga memiliki aktivitas sebagai antivirus untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). PLA<sub>2</sub> dari *A.planci* akan memblok penempelan v serta penginjeksian virus sel inang dan menghancurkan dinding kapsid dari HIV. Dengan demikian ekstrak racun duri *A. planci* yang mengandung PLA<sub>2</sub> diduga memiliki aktivitas sebagai antiviral. Dalam laporan skripsi kali ini akan dibahas mengenai persiapan untuk uji aktivitas antiviral. Sementara untuk uji aktivitas antiviral akan dilakukan pada penelitian selanjutnya.

## 1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penulisan skripsi ini adalah sebagai berikut,

- Bagaimana memilih sampel yang akan dilakukan uji aktivitas antiviral?
- Bagaimana cara inkubasi virus HIV untuk uji aktivitas antiviral?

## 1.3. Tujuan Penulisan

Tujuan penulisan skripsi ini adalah sebagai berikut,

- Mengekstrak dan melakukan pemurnian PLA<sub>2</sub> pada ekstrak racun *A. planci* perairan maluku

- Mencari sampel yang akan digunakan untuk uji aktivitas antiviral berdasarkan tingkat kemurnian dan aktivitas spesifik PLA<sub>2</sub>
- Melakukan inkubasi virus HIV untuk uji aktivitas antiviral.

#### 1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah :

- 1) Sampel bintang laut *A. planci* yang digunakan berasal dari perairan Ambon, Maluku bulan Desember tahun 2011.
- 2) Ekstraksi racun duri *A. planci* mengacu pada metode Imelda, 2011.
- 3) Penentuan kadar protein menggunakan metode Lowry
- 4) Identifikasi komponen protein dengan menggunakan SDS-PAGE
- 5) Sampel virus yang digunakan adalah virus HIV.

#### 1.5. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat: - Laboratorium Bioteknologi, Gedung Farmasi Lt.3, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok.  
 - Laboratorium Mikrobiologi, LIPI, Cibinong  
 - Laboratorium Virologi IHVCB (*Institute Human Virology and Cancer Biology*), Salemba.

Waktu : Februari-Juni 2012

#### 1.6. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan seminar ini adalah sebagai berikut,

##### **BAB I : PENDAHULUAN**

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

##### **BAB II : TINJAUAN PUSTAKA**

Berisi tinjauan pustaka mengenai hal-hal yang terkait dalam penelitian ini. Penjelasan terdiri dari penjelasan umum mengenai bintang laut *A. planci*, HIV, racun *A. planci* dan mekanisme antiviral, gen PLA<sub>2</sub>, metode yang digunakan dalam penelitian, metode inkubasi virus, dan state of the art.

**BAB III : METODOLOGI PENELITIAN**

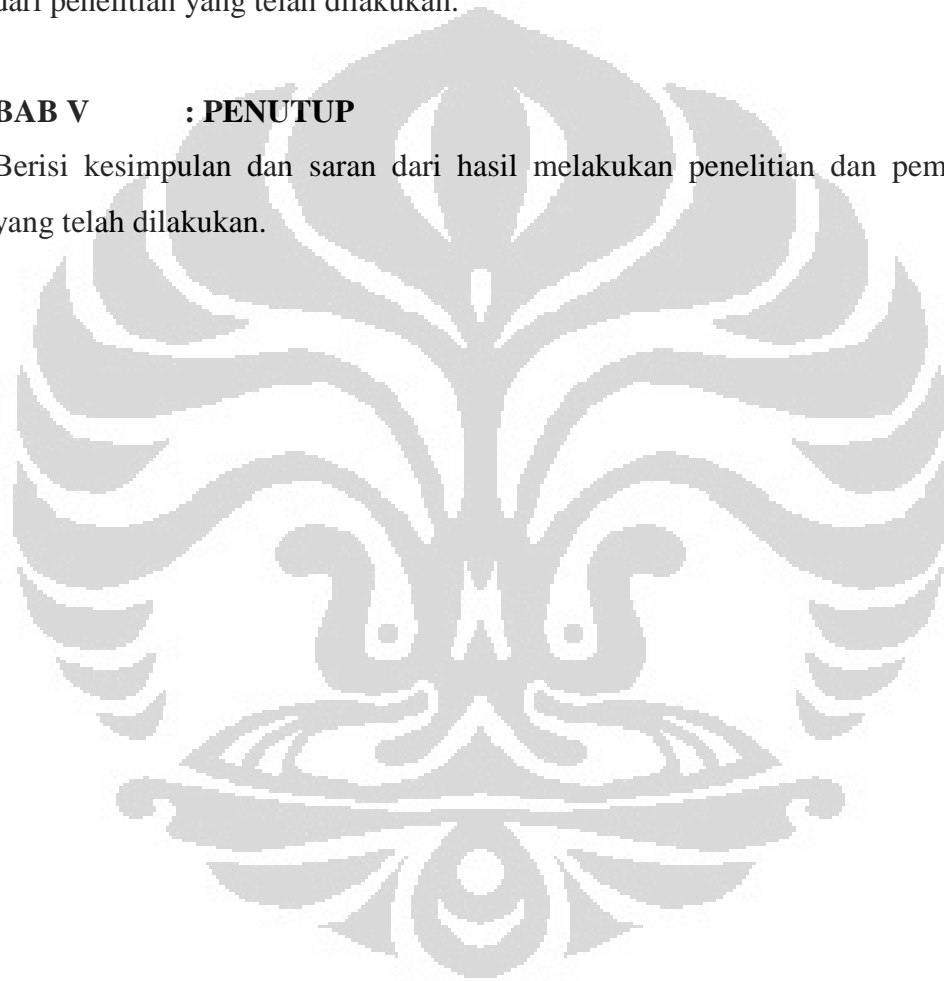
Menjelaskan langkah kerja yang akan dilakukan dalam melakukan ekstraksi racun dari duri *A. planci*, isolasi PLA<sub>2</sub> dari duri *A. planci* dan preparasi virus HIV untuk uji aktivitas antiviral.

**BAB IV : PEMBAHASAN**

Dalam bab ini akan disajikan data hasil pengamatan dan analisis dan pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan.

**BAB V : PENUTUP**

Berisi kesimpulan dan saran dari hasil melakukan penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan.

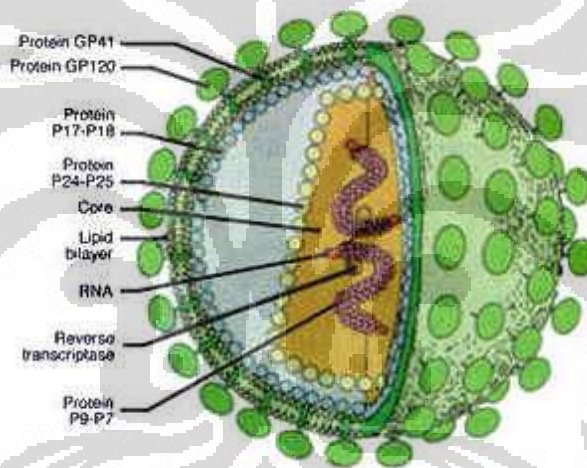


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Virus bukan merupakan sel (aseluler). Virus berupa partikel yang disebut virion dengan ukurannya bervariasi antara 20-200 nm. Bentuk dan komposisi kimianya bervariasi tetapi hanya mengandung RNA atau DNA. Virus merupakan partikel yang bersifat parasit obligat pada sel/makhluk hidup aseluler. Berukuran sangat renik. Di dalam sel inang virus menunjukkan ciri makhluk hidup, sedangkan di luar sel menunjukkan ciri bukan makhluk hidup. Virus hanya terdiri dari asam nukleat dan selubung protein.

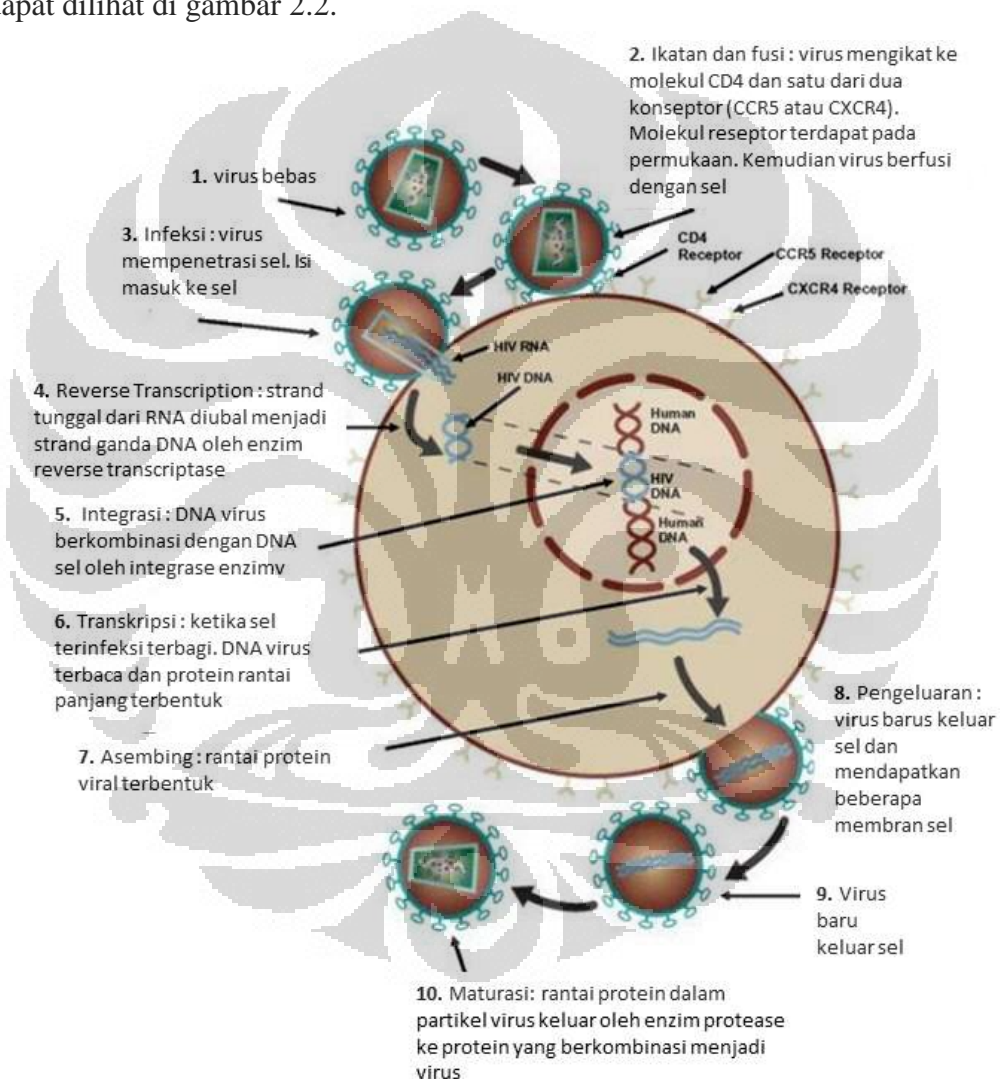


**Gambar 2.1.** Struktur virus HIV (Wulandari, 2011)

*Human Immunodeficiency Virus* (HIV) merupakan jenis retrovirus dan termasuk kedalam famili Retroviridae, berukuran 10-100 nm (Jawetz, 2007), berselubung protein dengan membawa kode genetik RNA single-stranded (Saunders, 2007). HIV dapat menginfeksi sel limfosit dan sel lain yang memiliki penanda CD4 pada permukaannya (molekul CD4 merupakan reseptor utama untuk HIV). Replikasi virus ini menggunakan siklus litik yaitu yang dapat menghancurkan sel inang setelah diinfeksi (Fritz H. Kayser, 2005).

Di Indonesia sendiri, HIV/AIDS telah menjadi epidemi bagi masyarakat. Hal-hal yang menyebabkannya adalah gaya hidup untuk melakukan seks bebas

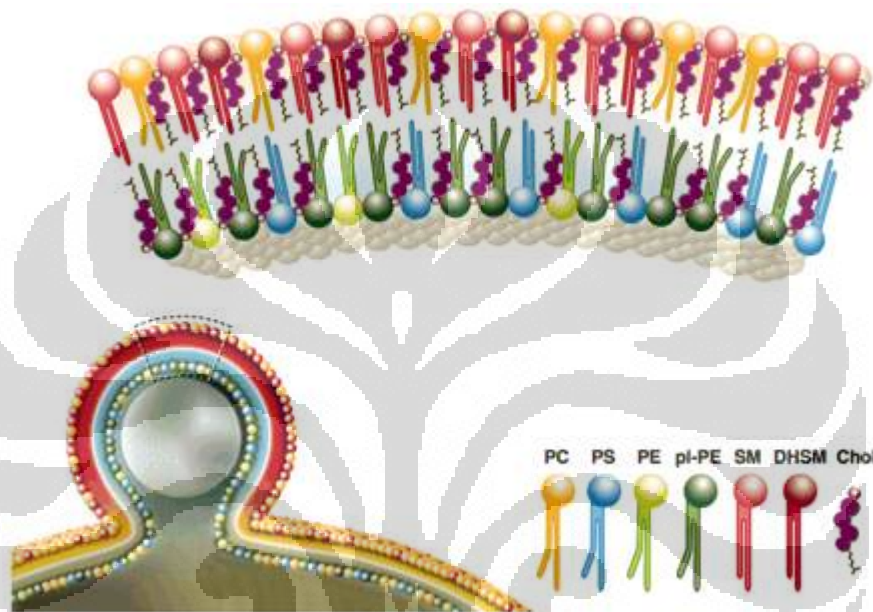
dan penggunaan jarum suntik secara bergantian. Secara kumulatif, AIDS 1987-2011, Jawa timur 4.318 kasus, Papua 4.005 kasus, DKI Jakarta 3.998 kasus, Jawa Barat 3.804 kasus, Bali 2.331 kasus, Jawa Tengah 1.315 kasus, Kalimantan Barat 1.125 kasus, Sulawesi Selatan 726 kasus, DI Yogyakarta 538 kasus, dan Sumatera Utara 509 kasus (Ant, 2011). Berdasarkan Komisi Penanggulangan AIDS (2007), mayoritas kasus-kasus tersebut dialami pemuda 20-29 tahun sebanyak 54,77% , 30-49 tahun sebanyak 35,4%, dan anak 5 tahun kebawah 1,22%. Siklus hidup dapat dilihat di gambar 2.2.



**Gambar 2. 2.** Siklus hidup virus HIV (<http://lostwords.freeblog.com/>, 10 Januari 2012)

Virus HIV berbeda dengan virus biasanya. Virus HIV tidak dilindungi oleh kapsid tetapi diselubungi oleh fosfolipid (Brita dkk., 2005). Fosfolipid ini

didapatkan dari sel inang (sel T) yang menjadi tempat untuk memperbanyak diri. Adanya fosfolipid ini akan mengelabui sel T karena akan mengenalnya sebagai virus material yang terdapat didalam tubuh bukan sebagai material yang berasal dari luar tubuh. Oleh karena itu, virus HIV dapat dengan mudah mereplikasi dirinya dan menyerang sel imun tubuh (Britta dkk., 2005).



**Gambar 2. 3.** Gambar lipid bilayer dan zat yang dikandung virus HIV (Britta dkk., 2005)

Zat-zat yang terkandung dalam lipid bilayer yang tidak lain adalah selubung yang membungkus HIV ini adalah keramid, dihidrospingomyelin, dr-membrane, fumonisin B1, monoheksosulkeramid, fosfatidikolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, dan spingomyelin. Komposisi masing-masing zat pada lipid bilayer telah diidentifikasi oleh penelitian Brita dkk., 2005 (lihat tabel 2.1.)



**Tabel 2. 1.** Tabel komposisi fosfolipid pada virus HIV

<b>Molekul lipid</b>	<b>Jumlah rata-rata Molekul</b>
PC (fosfatidikolin)	26.000
DHSM (dihidrospingomyelin)	17.000
PE (fosfatidiletanolamin)	13.000
SM (spingomyelin)	37.000
PE (fosfatidiletanolamin)	44,000
PS (fosfatidilserin)	25,000
Chol (kolerin)	134,000
Cer (Keramid)	160
HC (monoheksosilkeramid)	600

Sumber : Brita dkk., 2005

## 2.2. *Acanthaster planci*

Bintang laut merupakan biota yang merupakan bio-indikator dalam ekosistem terumbu karang. Hewan ini bersifat *nocturnal* yang merupakan salah satu pemangsa terumbu karang yang potensial yang dapat mengganggu pengelolaan terumbu karang.

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* dilaporkan pertama kali dari contoh hewan di Indonesia oleh George Rumphius pada tahun 1705, yang 50 tahun kemudian dideskripsikan Linnaeus pada tahun 1758, sehingga diperkirakan *A. planci* merupakan biota asli Indonesia (Setyastuti, 2009). Genus terdiri atas tiga spesies, dua spesies lainnya adalah *A. ellisi* dan *A. berrypinus*. *A. ellisi* merupakan bintang laut pemakan karang yang populasinya sangat jarang dan hanya dilaporkan

terdapat di perairan Filipina. *A. brevipinmus* adalah bintang laut pemakan detritus (sampah organik). Ketiga spesies tersebut mempunyai genetik yang sangat mirip sehingga kadang terjadi hibrid di antara mereka. Di dalam evolusi, *A. planci* berasal dari *A. brevipinmus* yang mendapatkan kemampuan untuk memakan karang. (Bachtiar, 2009).



**Gambar 2.4.** *Acanthaster planci* (Sumber : Zubi, 2007)

### 2.2.1. Distribusi

Keberadaan *A. planci* di Indonesia telah dilaporkan sejak tahun 1970-an oleh para peneliti LIPI, di sekitar Ambon, Kepulauan Seribu serta terdapat juga di perairan Bakauheni. Dalam laporan tersebut menunjukkan adanya *A. planci* dalam jumlah kecil atau dalam kondisi masih kecil (belum dewasa). Peneliti LIPI lainnya telah mengamati adanya populasi *A. planci* di Kepulauan Seribu dari tahun 1991-1993 dan dilaporkan tidak ada peledakan populasi. Pada tahun 1996, juga dijumpai hampir seluruh karang di Pulau Menjangan, Taman Nasional Bali Barat, dan Pantai Bama, Taman Nasional Baluran (Bachtiar, 2009). Pada tahun 2005, peledakan populasi (*outbreak*) bintang laut *A. planci* dilaporkan terjadi di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan.

*Acanthaster planci* biasa dijumpai antara puncak karang dalam laguna atau daerah lereng terumbu dan jarang ditemukan di daerah rata-rata terumbu, karena temperatur di daerah ini umumnya lebih tinggi. Temperatur yang baik untuk habitat *A. planci* berkisar antara 28-29°C. Hal ini dapat ditemukan dari beberapa tempat seperti di lereng terumbu Pulau Pari Kepulauan Seribu pada kedalaman 1-

15 meter. Binatang ini dapat bertahan arus pasang dengan kekuatan mencapai 6 knot pada tempat sempit di bagian kanal yang dalam di antara karang penghalang (Budianto, 2002).

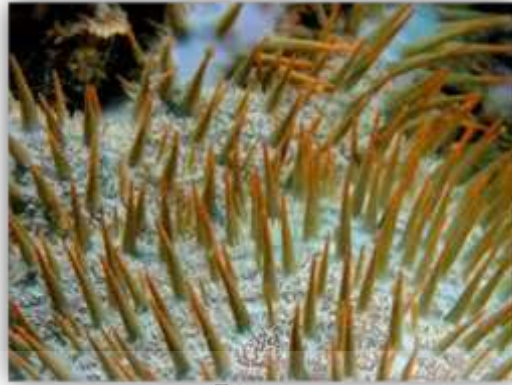
### 2.2.2. Klasifikasi dan Morfologi

Taksonomi dari *A. planci* (Setyastuti, 2009) adalah sebagai berikut,

Kingdom	: Animalia
Filum	: Echinodermata
Kelas	: Stelleroidea
Orde	: Valvatida
Family	: Acanthasteridae
Genus	: <i>Acanthaster</i>
Spesies	: <i>Acanthaster planci</i>

*Acanthaster planci* masuk ke dalam filum Echinodermata karena memiliki duri pada permukaannya, termasuk kedalam kelas Asteroidea karena bentuknya seperti bintang, termasuk ke dalam filum Valvatida karena memiliki kelopak penutup. Binatang ini memiliki julukan sebagai *Crown of Thorn Starfish* karena biota ini termasuk ke dalam famili Acanthasteridae karena seluruh permukaan tubuhnya yang bagian aboral dipenuhi dengan duri-duri tajam dan beracun (Setyastuti, 2009).

Struktur tubuh *A. planci* sama dengan struktur umum dari Asteroidea. Badan berbentuk radial simetris, dengan tubuh mirip cakram bersumbu oral dan aboral yang mempunyai lengan-lengan. Di bagian aboral terdapat madreporit dan anus. Bintang laut *A. planci* mempunyai legan antara 8-21 buah dengan duri-duri yang beracun berukuran 2-4 cm menghiasi permukaan aboral tubuh cakram dan lengan-lengannya (Bachtiar, 2009).



**Gambar 2.5.** Tekstur epidermis *A. planici* yang dipenuhi duri (<http://www.starfish.ch/>, 2012)

Hewan ini mempunyai ciri yaitu sistem saluran air dalam rongga tubuhnya yang disebut sistem ambulakral yang berfungsi untuk mengatur pergerakan tubuh dengan dibantu oleh bagian yang menjulur keluar tubuh yaitu kaki ambulakral. Dengan sistem ini memungkinkan *A. planici* untuk bergerak lambat di atas substrat untuk mencari mangsa.



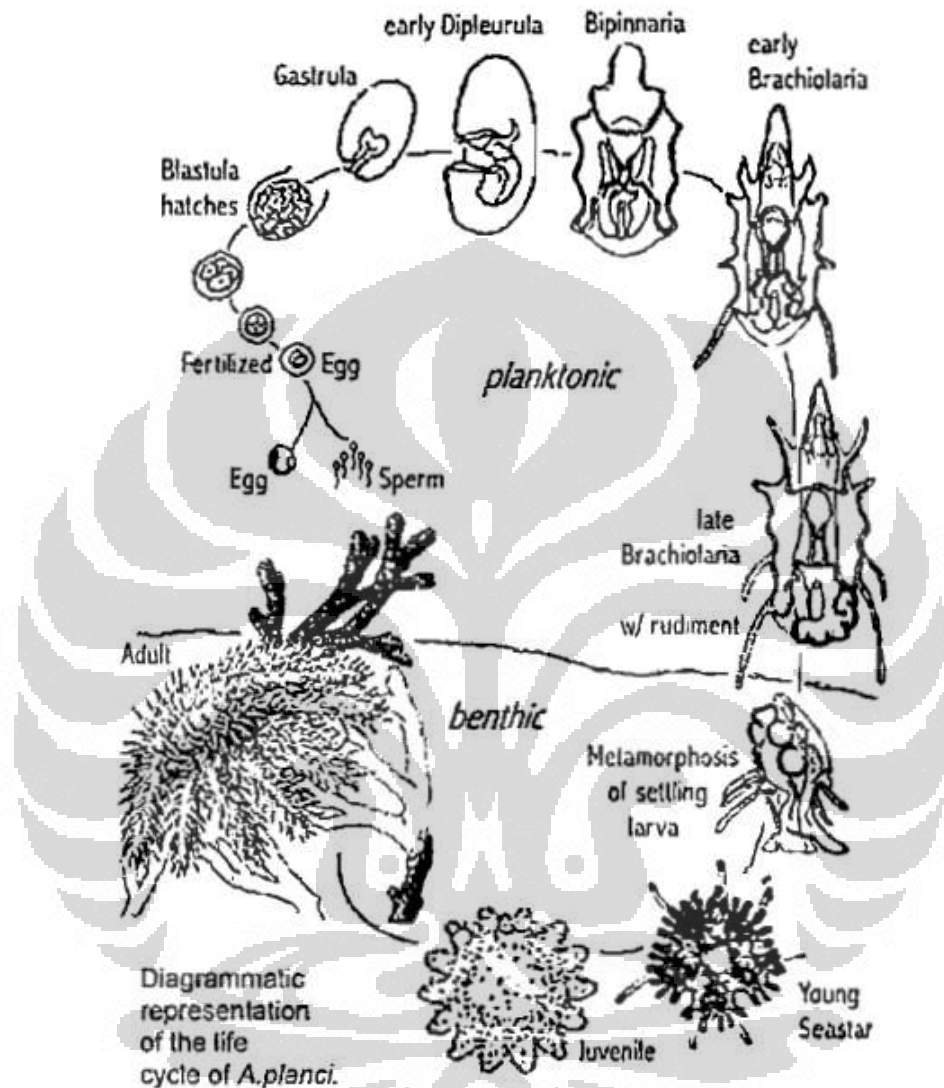
**Gambar 2.6.** Kaki ambulakral *A. planici* (<http://www2.fiu.edu/>, 2012)

### 2.2.3. Pertumbuhan, Reproduksi, dan Siklus Hidup

Seperti bintang laut lainnya dalam kelas Asteroidea, *A. planici* memiliki organ reproduksi jantan dan betina yang terpisah dalam individu yang berbeda (dioseus). Proses fertilisasi berlangsung secara eksternal dan musim kawinnya adalah sekitar pertengahan musim panas (Madl, 2002).

Siklus hidup bintang laut jenis *A. planici* pada prinsipnya sama dengan pola siklus hidup Asteroidea lainnya. Sel telur dan sel sperma dilepaskan ke air dan

terjadi fertilisasi. Hasil fertilisasi akan membentuk zigot yang kemudian berkembang menjadi larva bersilia. Larva menetap di pasar laut dan memakan plankton, selanjutnya larva mengalami metamorphosis menjadi individu dewasa.



Gambar 2.7. Siklus hidup *A. planici* (Madl, 2002)

#### 2.2.4. Peledakan, Populasi, dan Dampaknya

Kehadiran sejumlah besar bintang laut ini mengakibatkan kehancuran pada terumbu karang hidup disekeliling Pulau Mikronesia. Namun, tidak semua terumbu karang di Pasifik mengalami ledakan populasi oleh *A. planici*. Di Jepang, tahun 1957, pemerintahan Ryukyus mengadakan kampanye dimana 220.000 ekor *A. planici* berhasil dibinasakan karena populasinya yang melimpah. Ledakan

populasi *A. planci* telah beberapa kali terjadi dan yang terakhir dilaporkan terjadi di Great Barrier Reef pada kurun waktu 1981-1989 (Budianto, 2002).

Umumnya terumbu karang yang diserang *A. planci* adalah yang kondisinya rusak. Kerusakan ditandai dengan matinya koloni karang, berbentuk spot-spot putih atau koloni karangnya retak-retak. Kerusakan terumbu karang karena padatnya *A. planci* merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan perluasan terumbu karang.



**Gambar 2.8.** Perusakan karang akibat peledakan populasi *A. planci*  
(<http://www.oceanwideimages.com/>, 2012)

Besarnya ledakan populasi *A. planci* yang menyerang terumbu karang dapat membuat kerusakan terhadap komunitas ikan atau biota laut yang menggantungkan hidupnya pada terumbu karang, baik sebagai tempat mencari makan ataupun sebagai tempat berlindung.

### **2.3. Racun *Acanthaster planci***

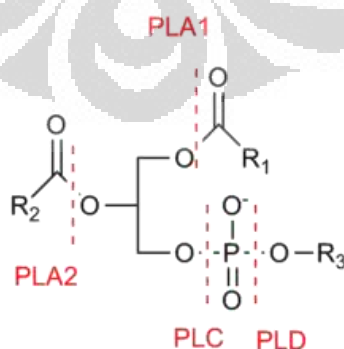
*Acanthaster planci* merupakan satu-satunya spesies dari kelas asteroidea yang beracun. Racunnya terdapat pada duri yang terletak di bagian atas seluruh tubuhnya. Duri bintang laut ini diketahui beracun karena mengeluarkan neurotoksin dan juga berpotensi menyebabkan *hepatotoxic*.

Beberapa akibat dari racun duri ini telah dilaporkan. Tidak hanya menyebabkan luka yang serius bila terkena kulit manusia tetapi juga mengakibatkan rasa pusing disertai mual dan muntah (Brian Lin, 2008). Biasanya bagian yang terluka karena duri akan berubah warna menjadi kebiruan dan kemudian meradang. Kemungkinan akan terjadi bengkak selama beberapa hari sampai beberapa minggu. Duri yang masuk ke dalam kulit, kemungkinan akan tertanam di dalam kulit. Hal ini akan menyebabkan terjadinya infeksi dan meningkatkan toksisitas (Setyastuti, 2009).

Berdasarkan penelitian, telah diketahui bahwa racun dari *A. planci* itu adalah protein *phosphatidylcholine 2-acylhydrolase 2* atau sering disebut *phospholipase-A2* (PLA<sub>2</sub>), *plancitoxin* (DNase II), dan *plancinin*. Ketiga kandungan racun tersebut yang memiliki peranan untuk menyebabkan luka pada organisme lain.

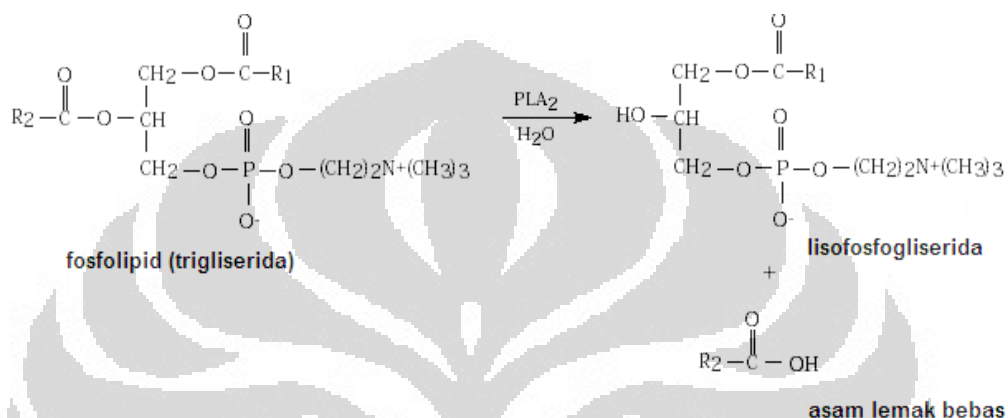
### 2.3.1. PhospholipaseA<sub>2</sub>

Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) merupakan salah satu enzim dari golongan phospholipase, 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 PLA<sub>2</sub> diklasifikasikan ke dalam grup I, II, V, dan X. Grup II PLA<sub>2</sub> kemudian diklasifikasi ke dalam lima jenis (tipe IIA, IIC, IID, IIE, dan IIF) berdasarkan rangkaian utamanya (Karray dkk., 2011).



Gambar 2.9. Jenis-jenis phospholipase dan tempat pemotongannya (Britta, 2005)

PLA<sub>2</sub> berpotensi mengurai asam lemak pada kedudukan atom C<sub>2</sub>, menghasilkan asam lemak dan derivat liso-1-asil. Enzim ini terlibat dalam beberapa fungsi sel diantaranya mengatur laju suplai asam arakidonat terkait dengan perannya sebagai mediator inflamasi (Nevalainen dkk., 2000), apoptosis (Capper and Marshall. 2001; Cummings dkk., 2000; Taketo and Sonoshita. 2002) dan secara efektif membunuh bakteri secara *in vitro* (Koduri dkk., 2002) dan *in vivo* (Laine dkk., 1999).



**Gambar 2.10.** Mekanisme Kerja PLA<sub>2</sub> (Sindurmata, 1989)

PLA<sub>2</sub> tersebar luas dalam jaringan otot hewan dan cairan tubuh (Nevalainen dkk., 2000) Se jauh ini purifikasi PLA<sub>2</sub> 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). Dari penelitian lainnya telah diketahui bahwa duri bintang laut *A.plancipun* ternyata mengandung enzim jenis ini (Shiomi dkk., 1997).

### 2.3.2. Mekanisme Racun *A. plancisebagai* Antiviral

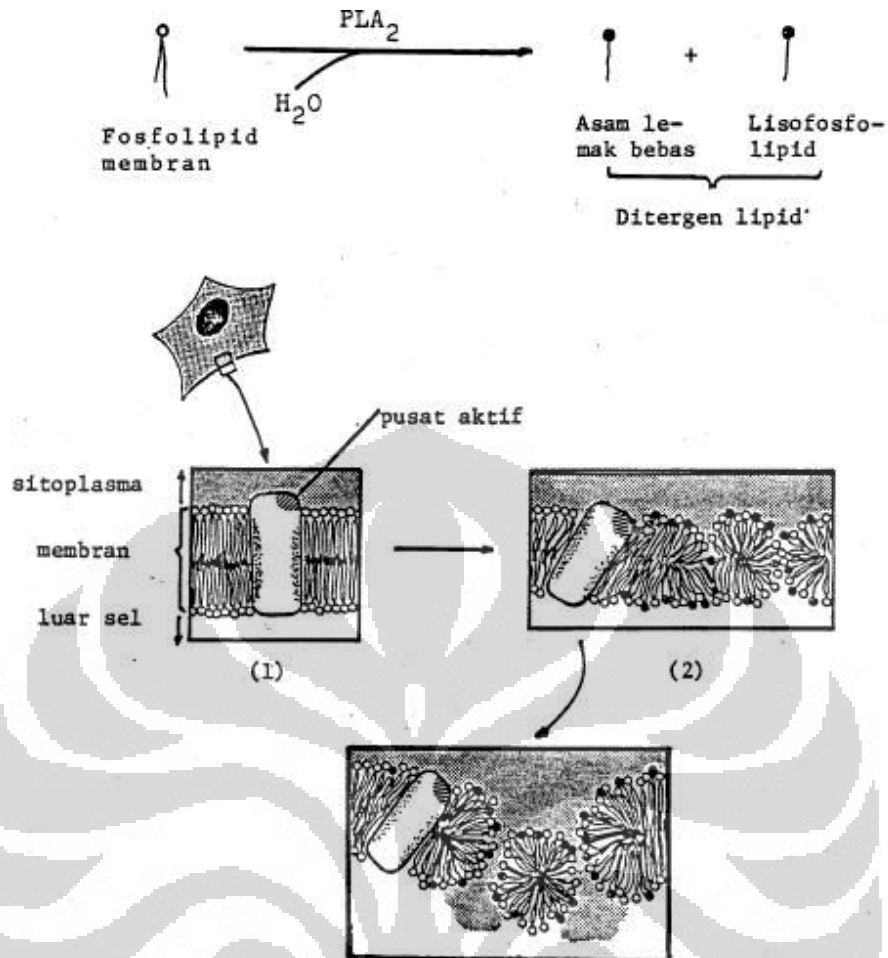
Telah ada beberapa penelitian tentang pemanfaatan PLA<sub>2</sub> sebagai antiviral. PLA<sub>2</sub> yang telah diteliti yaitu berasal dari ular dan lebah (Ramadan, Mohamed, & El-Daim, 2009; Fenard, 2001). Dari penelitian sebelumnya, disebutkan bahwa yang berperan dalam mekanisme antiviral adalah PLA<sub>2</sub>. Mekanisme proses PLA<sub>2</sub> terhadap virus yaitu dengan memblok penempelan serta penginjeksian virus pada sel inang. Selain itu, PLA<sub>2</sub> juga ditemukan dapat melindungi sel terutama sel



limfosit T manusia dari virus (Ferrad, 2001). PLA<sub>2</sub> dapat memblok virus khususnya yang memiliki selubung luar yang mengandung fosfolipid.

Fosfolipid biasa terdapat pada membran sel dan bakteri. Suatu membran akan terganggu apabila terjadi perubahan komponen didalamnya (Shier, dkk., 1981). Dengan menggunakan PLA<sub>2</sub> dan memanfaatkan transfer CA<sup>2+</sup> dari dalam selubung keluar, PLA<sub>2</sub> akan aktif dan menyebabkan proses lisis pada fosfolipid.

Pada mekanisme ini, lisis sel terjadi sebagai akibat pengaktifan PLA<sub>2</sub> endogen oleh toksin PLA<sub>2</sub> eksogen. Gambar di bawah memperlihatkan bahwa toksin merusak keteraturan susunan membran sel, karena toksin mengubah konformasi PLA<sub>2</sub> endogen di dalam membran. Semua letak pusat aktif PLA<sub>2</sub> endogen membran tersembunyi dari substrat fosfolipid lapis ganda membran oleh protein, gugus polisakarida glikolipid dan interaksi lipid dengan membran protein (Bever dkk., 1979). Toksin dapat menyebabkan pusat aktif PLA<sub>2</sub> endogen membran besentuhan langsung dengan substratnya sehingga terjadi reaksi substrat fosfolipid membran dan PLA<sub>2</sub> endogen. Lipid lapis ganda membran terurai menjadi lipid ditergen dalam bentuk butir misela, dan keluar dari membran sel (Van Zoelen dkk., 1978). Akibatnya, fluiditas membran sel dan luas permukaan membran sel berubah sehingga membran sel menjadi tidak stabil dan sel pecah (Zwall dkk., 1975).



**Gambar 2.11.** Mekanisme melarutkan komponen membran pada selubung membran (Sindurmata, 1989)

Hal ini juga akan terjadi pada uji aktivitas antiviral pada HIV. Dilaporkan, virus HIV mengandung fosfolipid (Brita dkk., 2005). Fosfolipid ini akan mengalami proses lisis oleh PLA<sub>2</sub>. Struktur hidrofobik dari glikolipid akan menyatu membentuk menyerupai lipid detergen. Lipid tersebut akan terlepas dari struktur phospholipase. Ketika terlepas, cairan-cairan yang terdapat didalam virus akan keluar sehingga dapat membuat virus tersebut menjadi tidak aktif. Jadi, PLA<sub>2</sub> selain akan melindungi sel T dan memblok virus meninjeksi RNA-nya ke sel, PLA<sub>2</sub> juga diharapkan memiliki aktivitas untuk melakukan lisis sel.

#### 2.4. Gen Phospholipase A2 pada Racun Ular, Lebah, dan Bintang Laut

Keluarga besar enzim phospholipase A2 terbagi menjadi 15 grup berdasarkan struktur, lokasi, dan sumber termasuk pankreas mamalia, racun reptil,

dan serangga serta cairan sinovial (Li-rong, 2010). Terdistribusikan diantara grup ini terdapat macam-macam bentuk dari PLA<sub>2</sub> yang tersekresi (sPLA<sub>2</sub>s – grup I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII, dan XIV), PLA<sub>2</sub>s sitosolik (cPLA<sub>2</sub> – grup IV), Ca<sup>2+</sup> - *independen intraselular* PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub> – grup VI), faktor aktivasi platelet asetilhidrolase (PAF – AH – grup VII dan VIII) dan PLA<sub>2</sub>s lisosomal (grup XV) (Guarnieri, 2009).

PLA<sub>2</sub> yang tersekresi ditemukan pada jamur, tanaman, marine sponge, chinaria, moluska, bintang laut, serangga, reptil, dan mamalia. Untuk grup I yaitu berasal dari racun kobra/krait serta pankreas mamalia. Grup II dari racun crotalid dan ular. Grup III dari racun lebah, kadal., atau kalajengking (Li-rong, 2010). Pada ketiga jenis racun ular, lebah, dan bintang laut *A. planci* terdapat kesamaan kandungan yaitu phospholipase A<sub>2</sub>. Dari perbedaan sumber ini mengakibatkan gen pembawa phospholipase A<sub>2</sub> yang berbeda.

#### **2.4.1. Gen Phospholipase A<sub>2</sub> pada Racun Ular**

PLA<sub>2</sub> yang berasal dari racun ular berbisa masuk kedalam subgrup II bersama enzim mamalia yang diisolasi dari limpa, sel mast, makrofag, cairan arthritic sinovial, dan serum pasien dengan penyakit inflamasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Danse, dkk. (1997), grup I terbagi menjadi lima subgrup dan grup II terbagi menjadi enam subgrup. Dari klasifikasi tersebut, PLA<sub>2</sub> yang berasal dari racun ular masuk kedalam IA, IA', IB'', IIA, IIA', dan IIB (Takahiko J. Fujimi, 2002). Contoh *sequence* gen PLA<sub>2</sub> didapatkan dari spesies ular *Crotalus durissus cascavella*. *Sequence* asam amino yang lengkap dari Cdc-PLA<sub>2</sub> diprediksi dari cDNA *sequence* (Guarnieri, 2009).

```

>cDNA:Clone 4.8_ Cdc PLA2
.....tctctgccttaccgaacgacgagcg
cagcgagtcagtgagcgaggaagcggccgcataacttcgtatagcatacattatacgaag
ttatcagtcgacgggtaccggacabatgccccgggaattcggccattacggccgggggggag
atgaggactctctggatagtggccgtattgctgctggcgctcgaggggagcctgttggac
M R T L W I V A V L L L G V E G S L L D
tttgagatgatgatcattaaagtggcaaaagaaagcggtttgctttggtacagcgcttac
F B M M I I K V A K K S G L L W Y S A Y
ggatgctactgcggctggggggccaagcggaccacaggttgccaactgaccgctgctgc
G C Y C G W G G Q G R P Q V A T D R C C
tttgctcagcactgctgttaaggaaaagtgaaccgactgcaacccccaaatgggtcagctat
F V H D C C Y G K V T D C N P K H V S Y
acctacagcgtgaaaaacggggaaatcctctgcaagaagcagaccgctgcaagaagcag
T Y S V K N G E I I C E D D D P C K K Q
acttgtagtgatgaggggtogcggcagctctgcttccgagacaataacccctacacgac
T C E C D G V A A V C F R D N I P S Y D
aagaagtataggcagttcccgccgaaaattgcccgggaggaaccagagccatgctaaagtc
K K Y R Q F P A E N C R E E P E P C -
tctgcagggccccggaaaaaacctcaaatatcaccaattgtagttgtgttactctattattct
gaatgcatactgagtaataaacaggtgccagctttggacttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

**Gambar 2.12.** Nukleotida dan urutan asam amino PLA<sub>2</sub> dari kelenjar racun dari *C. d. Cascavella* (Cdc) (Guarnieri, 2009)

#### 2.4.2. Gen Phosfolipase A<sub>2</sub> pada Racun Lebah

PLA<sub>2</sub> racun lebah (BvPLA<sub>2</sub>) merupakan anggota sPLA<sub>2</sub> grup III dan merupakan peptida paling mematikan dalam racun lebah madu (Li-rong, 2010). Bereaksi sebagai alergen yang bekerja sama dengan komponen lain untuk melindungi koloni dari pemangsa predator dan pengganggu. Aktivitas BvPLA<sub>2</sub> dapat ditingkatkan dengan melittin, konstituen yang paling melimpah dari racun lebah madu. BvPLA<sub>2</sub> memiliki berbagai macam sifat farmakologis termasuk aktivitas anti-Human Immunodeficiency Virus (anti-HIV), neurotoksisitas, myo-toksisitas, dan induksi perkembangan berlebihan dari neurit.

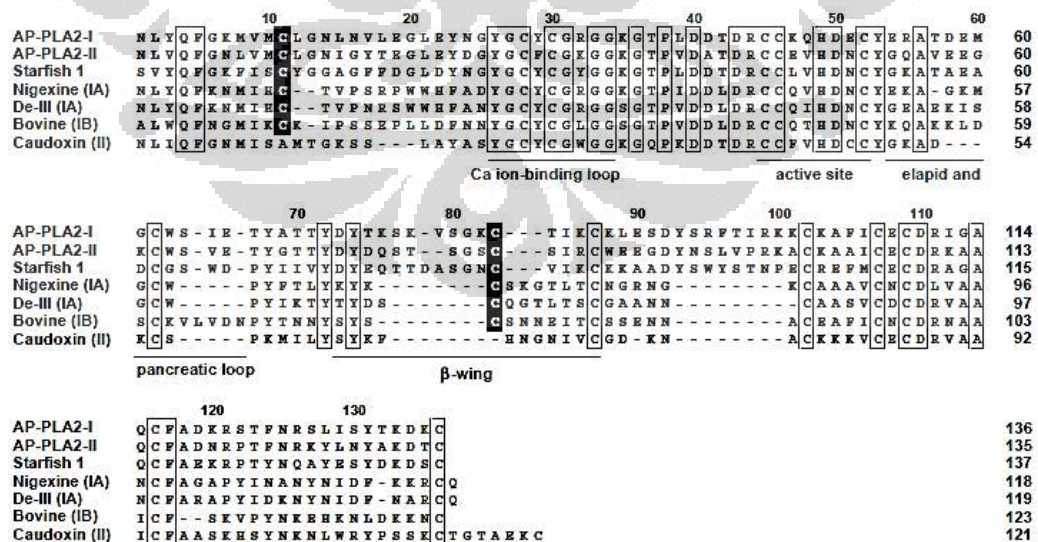
*Forward primer (AccF1)*  
 AGAATTC ATA ATA TAT CCA GGA ACG TTG TGG TGC GGG CAT GGT AAC GTG TCG  
 I Y P G T L W C G H G N V S S  
 TCC GGC CCG AAC GAG CTA GGT CGG TTC AAG CAC ACG GAT GCA TGC TGT CGA ACC  
 G P N E L G R F K H T D A C C R T H  
 CAC GAC ATG TGC CCG GAC GTG ATG TCA GCT GGT GAA TCG AAG CAC GGT CTG ACC  
 D M C P D V M S A G E S K H G L T N  
 AAT ACG GCC TCC CAC ACC AGG TTG TCG TGC GAC TGC GAC GAC ACG TTC TAC GAT  
 T A S H T R L S C D C D D T F Y D C  
 TGT CTT AAA AAT TCG GGG GAC AAG ATT AGC TCG TAT TTC GTA GGA AAG ATG TAC  
 L K N S G D K I S S Y F V G K M Y F  
 TTC AAT CTG ATA GAC ACC AAA GTG TTC AAA CTG GAG CAT CTG TGA CCG GGT GCG  
 N L I D T K C Y K L E H P V T G C G  
 GTG AGA GGA CCG AGG GTC GTT GTC TTC GCT ACA CGG TGG ACA AAA GCA AAG CCG  
 E R T E G R C L R Y T V D K S K P K

*Reversed primer (AccR1)*  
 AAA GCG TAC CAA TGG GTC GAT CTT CGC AAG GAT TAA GCTTC  
 A Y Q W F D L R K Y I /

Gambar 2.13. Sequence cDNA dari AccPLA<sub>2</sub> (Li-rong, 2010)

### 2.4.3. Gen Phospholipase A<sub>2</sub> pada Racun Bintang Laut

*A. planci* memiliki dua jenis phospholipase A<sub>2</sub> yaitu AP-PLA<sub>2</sub>-I dan AP-PLA<sub>2</sub>-II (AP merupakan kepanjangan dari *A. planci*). Perbedaan antara kedua jenis ini berdasarkan pada lokasi jembatan disulfida, keberadaan loop elapid (ciri PLA<sub>2</sub> grup I) dan ekstensi terminal C dari beberapa asam amino (ciri PLA<sub>2</sub> grup II) (Eiji Ota, 2006).



Gambar 2.14. Penjajaran sequence asam amino AP-PLA<sub>2</sub> lainnya (Eiji Ota, 2006)

Bintang laut 1 merupakan PLA<sub>2</sub> dari bintang laut *Asterina pectinifera*; nigexine (IA), PLA<sub>2</sub> grup IA dari racun cobra *Naja nigricollis*; De-III, PLA<sub>2</sub> grup IA dari racun ular kobra hutan *Naja melanoleuca*; bovine (IB), PLA<sub>2</sub> grup IB dari bovine pankreas; caudoxin (II), PLA<sub>2</sub> dari racun adder *Bitis caudalis* yang bertanduk. Angka asam amino ditunjukkan pada kanan. Residu yang sama dikotakkan. Strip menunjukkan penghapusan diperkenalkan untuk memaksimalkan kesamaan urutan. Loop ikatan Ca<sup>2+</sup>, sisi aktif, elapid, dan loop pankreatik serta bagian sayap H diindikasikan dengan kotak hitam. Residu sistein yang merupakan ciri khas dari PLA<sub>2</sub> grup I akan ditampilkan dalam bagian putih dengan latar belakang hitam.

## 2.5. Spektroskopi 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 *fototube*. 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,

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

Dalam persamaan diatas, P<sub>0</sub> (intensitas cahaya yang datang pada larutan), P (intensitas cahaya yang diteruskan oleh larutan), A (absorban = log P<sub>0</sub>/P),  $\epsilon$  (absorptifitas molar), C (konsentrasi larutan), b (tebal kuvet, dinyatakan dalam cm).

## 2.6. Metode 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  $\text{Cu}^+$  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.

## 2.7. Elektroda 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.

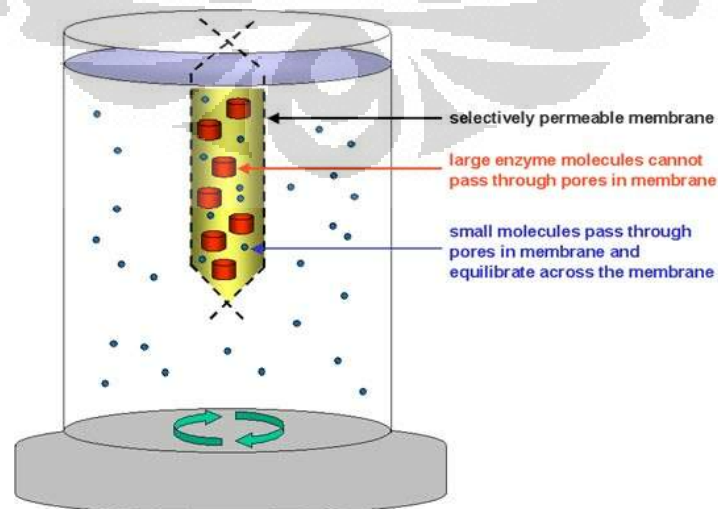
SDS memberikan muatan negatif pada sampel protein sehingga protein dapat bergerak menuju anoda saat diberi medan listrik. Selain itu juga akan

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.

## 2.8. Metode Dialisis

Dialisis adalah teknik separasi yang memfasilitasi penghilangan zat kecil atau yang tidak diinginkan dari molekul yang lebih besar dengan difusi pasif melalui membran semi-permeable. Sebuah sampel dan larutan buffer ditaruh pada tempat yang berlawanan dengan membran. Molekul sampel yang lebih besar daripada pori-pori membran tetap berada pada membran sementara yang lebih kecil akan lolos pori-pori membran. Oleh karena itu, konsentrasi kontaminan pada sampel semakin berkurang.

Dialisis bekerja secara difusi, sebuah proses dari termal dan pergerakan acak dari larutan molekul. Dalam dialisis, molekul yang tidak diinginkan dalam sampel akan berdifusi sepanjang membran semi-permeable ke tempat cairan atau dialisat. Karena molekul besar tidak melewati pori-pori membran. Molekul yang kecil akan terdifusi secara bebas keluar dari membran dan mendapatkan kesetimbangan untuk setiap volume larutan.



Gambar 2. 15. Metode dialisis



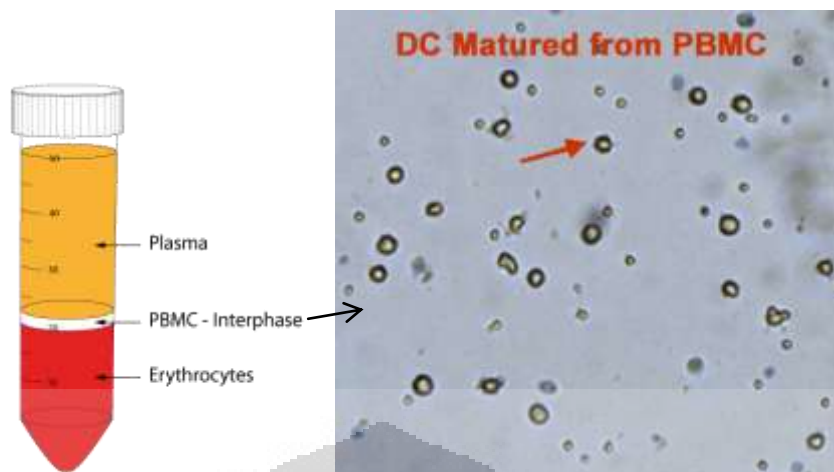
Dialisis pada enzim bertujuan untuk memisahkan bagian-bagian protein dengan zat yang tidak diinginkan. Zat yang diubah adalah zat yang berfungsi untuk mengendapkan enzim yaitu amonium sulfat. Dengan metode ini, konsentrasi amonium sulfat akan berkurang sehingga didapatkan enzim dengan kemurnian yang tinggi.

## 2.10. Inkubasi Virus HIV

Virus HIV merupakan retrovirus yang menginfeksi dan berkembang pada sel imun tubuh. Pada manusia, HIV menular melalui aktivitas seksual, penggunaan jalur suntik bergantian, dan secara pasif melalui ibu ke anaknya. HIV akan menginfeksi sel imunitas tubuh sehingga semakin lama daya tahan tubuh semakin menurun dan sering berakibat pada kematian. Bagi manusia yang telah mengalami penyakit HIV akut akan mengalami AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*). Masa inkubasi HIV menjadi AIDS pada manusia biasanya membutuhkan waktu 5-10 tahun.

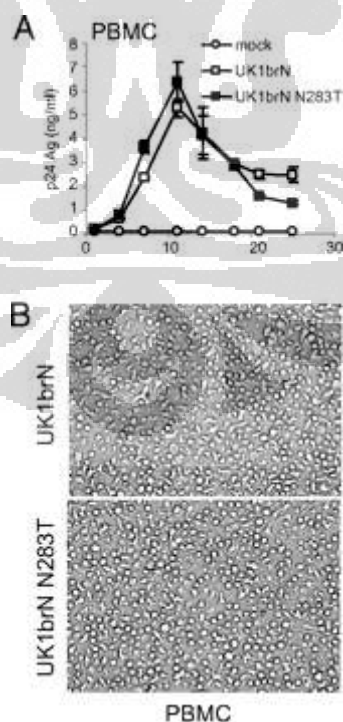
Untuk keperluan laboratorium, virus HIV juga ditumbuhkan hingga mencapai fasa AIDS. Berbeda dengan inkubasi pada manusia, untuk keperluan laboratorium, fase AIDS dipercepat dari waktu normal 5-10 tahun menjadi 1 bulan. Tujuan agar HIV berada pada fase AIDS adalah agar mendapatkan virus yang sudah stabil dan siap untuk dilakukan uji aktivitas.

Virus HIV ditumbuhkan pada sel selama kurang lebih 1 bulan. Sel yang digunakan adalah PBMC atau sering disebut dengan *Peripheral Blood Mononuclear Cell*. PBMC adalah sel darah yang memiliki nukleus bulat. Contoh dari PBMC ini sering disebut dengan sel imun tubuh yaitu limfosit, monosit, dan makrofag. Sel darah ini merupakan komponen dari sistem imun yang menyerang infeksi dari luar. Populasi limfosit terdiri dari sel T (yang memiliki CD4 dan CD8), sel B, dan sel NK. (Delves, 2011)

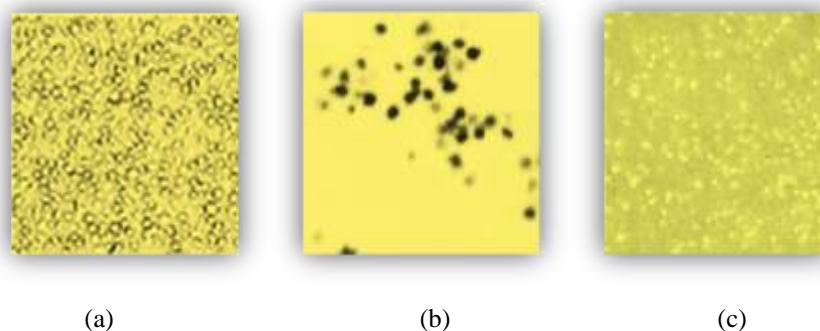


**Gambar 2. 16.** Gambar letak PBMC setelah sel darah merah disentrifugasi dan gambar sel PBMC (<http://www.pluriselect.com/>, 2012)

Identifikasi ada tidaknya virus, bisa dilakukan dengan cara PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gen yang terdapat pada media kultur. Supernatan yang terdapat pada media diambil untuk dilakukan PCR. Setelah itu dilanjutkan dengan sequencing. Ada atau tidaknya virus yang tumbuh pada media dapat dilihat dari DNA hasil sequencing. Sementara itu, gambar kurva pertumbuhan dari sel pbmc dan virus dapat dilihat pada gambar 2.17.



**Gambar 2. 17.** Kurva Pertumbuhan Virus (Rebecca, 2005)



**Gambar 2. 18.** (a) penampakan sel PBMC (b) tanda-tanda apabila sel PBMC mengalami pertumbuhan dalam media dengan saling berkumpul antar sel (c) tanda-tanda apabila terjadi kontaminasi bakteri, sel PBMC tidak dapat tumbuh secara optimal. (Britta, 2005)

## 2.11. Metode Infeksitivitas Virus

Infeksitivitas assay digunakan untuk mengukur konsentrasi dari virus penginfeksi pada spesimen atau preparasi. Sampel diinokulasi dalam host yang sesuai, dimana respon dapat diamati jika virus penginfeksi ada. Berbagai host yang dapat digunakan yaitu hewan, tanaman atau kultur bakteri, sel hewan atau tumbuhan. Assay infeksitivitas dibagi menjadi dua; kuantitatif dan kuantal.

### 2.11.1. Assay Kuantitatif

Assay kuantitatif adalah dimana setiap respon host dapat menjadi seperti suatu series value, seperti jumlah plak. Assay plak dilakukan dengan menggunakan virus yang dapat membentuk plak, memberikan perkiraan konsentrasi dari virus penginfeksi dalam unit pembentuk plak (plaque-forming units [pfu]). Assay dilakukan menggunakan sel yang ditumbuhkan dalam cawan petri atau kontainer lain yang sesuai, dibawah kondisi yang dapat memungkinkan dalam pembentukan plak.



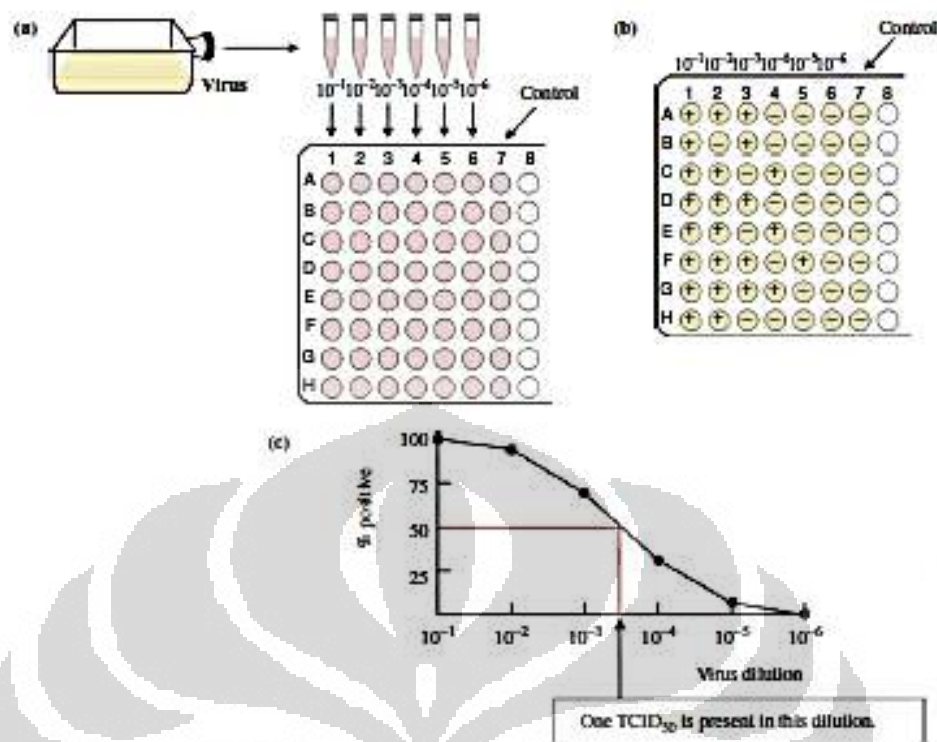
**Gambar 2.19.** Plak virus pada cawan petri (<http://www.microbiologybytes.com/>, 2012)

Sel diinokulasi dengan volume standar dilusi untuk virus. Setelah inkubasi, cawan yang mengandung dilusi virus yang tinggi tidak terdapat plak atau hanya sedikit, sedangkan cawan yang mengandung dilusi virus yang rendah mempunyai jumlah plak yang banyak atau semua sel menjadi lisis. Cawan yang dipilih yaitu yang mempunyai jumlah plak antara 30-300 (Saunders, 2007).

### **2.11.2. Assay Kuantal**

Dalam assay kuantal, setiap subjek inokulasi dengan atau tanpa respon, contohnya sel kultur yang diinokulasi membentuk CPE atau tidak dan hewan yang diinokulasi mati atau tetap sehat. Tujuan dari assay ini adalah untuk menemukan dosis virus yang menghasilkan respon dalam 50% subjek yang diinokulasi. Dalam assay sel kultur metode ini dikenal dengan TCID<sub>50</sub> (dosis yang menginfeksi 50% sel kultur inokulasi).

$$1 \text{ TCID}_{50} = 0,7 \text{ pfu}$$



Gambar 2. 20. Contoh assay TCID<sub>50</sub> (Saunders, 2007)

Hasil keluaran dari perhitungan TCID<sub>50</sub> dapat digunakan untuk mengestimasi konsentrasi virus dalam pfu, dengan menggunakan rumus. Contoh estimasi TCID<sub>50</sub> dengan menggunakan metode reed-muench, dapat dilihat berikut ini.

Tabel 2.2. Contoh data hasil infeksi virus pada assay

Difusi Virus	Infeksi per Jumlah Inokulasi	Jumlah yang terdeteksi		Jumlah Kumulatif <sup>1</sup>		Rasio Infeksi <sup>2</sup>	% Infeksi <sup>3</sup>
		Positif	Negatif	Positif	Negatif		
$10^{-1}$	8/8	8	0	24	0	24/24	100
$10^{-2}$	7/8	7	1	16	1	16/17	94
$10^{-3}$	5/8	5	3	9	4	9/13	69
$10^{-4}$	3/8	3	5	4	9	4/13	31
$10^{-5}$	1/8	1	7	1	16	1/17	6
$10^{-6}$	0/8	0	8	0	24	0/24	0

Sumber : Saunders, 2007

<sup>1</sup> Jumlah kumulatif positif adalah hasil penjumlahan dari bawah ke atas, sedangkan jumlah kumulatif negatif adalah penjumlahan dari atas ke bawah.

<sup>2</sup> Rasio infeksi adalah jumlah kumulatif positif per jumlah keseluruhan kumulatif (positif+negatif)

<sup>3</sup> Persentase infeksi merupakan rasio infeksi yang dikonversikan ke persentase

Dapat ditentukan bahwa dilusi virus yang mengandung 1 TCID<sub>50</sub> terdapat diantara 10<sup>-3</sup> dan 10<sup>-4</sup>, sehingga end point dapat diekspresikan sebagai 10<sup>-(3+x)</sup>, dimana x merupakan nilai yang diestimasi dengan menggunakan rumus.

$$x = \log_{10} \frac{(\alpha) - 50\%}{(\alpha) - (\beta)}$$

$$= 1 \left( \frac{69 - 50}{69 - 31} \right) = 0,5$$

Keterangan :

$\alpha$  = % sel yang terinfeksi pada dilusi diatas 50%

$\beta$  = % sel yang terinfeksi pada dilusi dibawah 50%

Sehingga, nilai end point = 10<sup>-(3+0,5)</sup> = 10<sup>-3,5</sup>

- 1 ml dari dilusi 10<sup>-3,5</sup> mengandung virus sebanyak 1 TCID<sub>50</sub>
- 1 ml dari dilusi 1/3200 mengandung virus sebanyak 1 TCID<sub>50</sub>

Konsentrasi virus dalam suspensi yang tidak didilusi adalah 3,2 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

## 2.12. State of The Art

Penelitian tentang racun bintang laut *A. planici* ini sudah lama dilakukan oleh Shiomi dkk. Sejak tahun 1997. Namun, baru sebatas purifikasi enzim dan belum sampai pada uji aktivitas. Bila dibandingkan dengan dua racun lainnya yaitu racun ular dan lebah, terdapat kesamaan kandungan dengan racun *A. planici* yaitu memiliki kandungan fosfolipase A<sub>2</sub>.

Uji aktivitas mikroba dari ekstrak racun *A. planici* sudah dilakukan yang juga mengacu pada penelitian sebelumnya tentang fosfolipase A<sub>2</sub> dalam racun ular dan lebah yang memiliki aktivitas antimikroba. Dalam penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa fosfolipase A<sub>2</sub> pada racun ular dan lebah juga memiliki aktivitas antiviral terutama terhadap virus HIV.

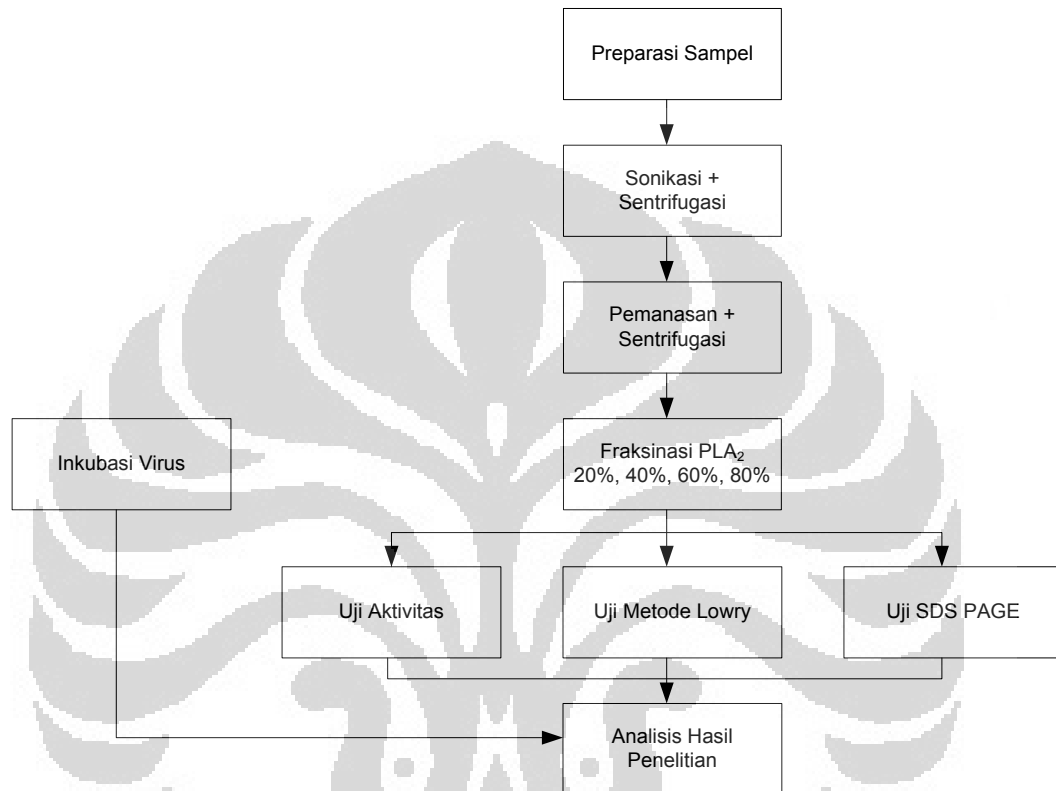
Dari hasil penelitian sebelumnya, akhirnya muncul suatu hipotesa bahwa ekstrak racun *A. planci* memiliki aktivitas antiviral karena racun *A. planci* juga memiliki kandungan phospholipase A<sub>2</sub>. Hipotesa mekanisme yang terjadi yaitu phospholipase A<sub>2</sub> memblok virus dalam melakukan penempelan dengan sel inang dengan menginhibisi bagian selubung dari virus dan lalu mendegradasinya sehingga selubung pecah dan kode genetika tidak dapat masuk ke dalam sel inang. Dalam penelitian ini, baru dilakukan preparasi untuk uji aktivitas antiviral.

**Tabel 2.3.** State of the art penelitian ini

<b>Purifikasi</b>	<b>Tanpa Uji Aktivitas</b>	(Shiomi dkk., 1997)			
		(Imelda, 2011)			
	<b>Uji Aktivitas</b>	<b>Antimikroba</b>	(Skripsi, 2011)	(Samy dkk., 2006)	
				(Santamaria dkk., 2004)	(Han dkk., 2010)
	<b>Antiviral</b>	<b>Posisi penelitian ini</b>	(Chellapandi and Jebakumar, 2008)		
			(Meenakshisundaram dkk., 2009)	(Fenard dkk., 2001)	
				(Ramadan dkk., 2009)	
		<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>PLA<sub>2</sub></b>	
		<b>Racun <i>A. planci</i></b>	<b>Ular</b>	<b>Lebah</b>	

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Rancangan Penelitian



**Gambar 3.1.** Diagram Alir Penelitian (Imelda, 2011, dengan perubahan)

Diagram alir rancangan penelitian seperti pada gambar 3.1. merupakan alur penelitian yang akan dilakukan. Dimulai dari preparasi sampel dari *A. planci*, ekstraksi dan pemurnian meliputi sonikasi, pemanasan, dan fraksinasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas PLA<sub>2</sub>, SDS-PAGE, uji konsentrasi dengan metode lowry, dan preparasi uji aktivitas antiviral. Berikut ini adalah penjelasan dari diagram alir penelitian di atas.

#### 1. Preparasi sampel

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

- Tanjung Setan – Desa Morela, Kec. Leihitu, Kab. Maluku Tengah



- Pulau Pombo, Kec. Salahulu, Kab. Maluku Tengah
- Kalauli – Desa Hila, Kec. Leithitu, Kab. Maluku Tengah
- Desa Suli, Tial dan Tengah-tengah, Kec. Salahutu, Kab. Maluku Tengah
- Desa Hutumuni dan Leahari, Kec. Leitimur Selatan, Kota Ambon

Spesimen disimpan dalam lemari es pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan. Duri dari *Acanthaster planci* digunting dan dikumpulkan. Pemisahan enzim pada duri *A. planci* bisa dilakukan setelah enzim protease berhasil dipisahkan dari papain (getah pepaya muda) dengan metode ekstraksi etanol sebagai kontrol positif pada penelitian ini.

## 2. Sonikasi

Hal ini dilakukan untuk mengeluarkan racun dari *A. planci* yang didalamnya terdapat enzim yang ingin dilakukan isolasi. Proses sonikasi ini dilakukan dengan menggunakan alat sonikator yang terdapat di Lab Biokimia, LIPI, Cibinong dengan perlakuan 2 x 8 menit sonikasi. Hasil dari sonikasi akan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 15.000g selama 30 menit. Supernatan yang didapatkan merupakan *crude venom* (CV) yang akan digunakan untuk proses selanjutnya.

## 3. Pemanasan

Supernatan yang didapatkan akan memulai proses pemurnian. Pemurnian yang dilakukan pertama kali adalah dengan pemanasan. Pemanasan dilakukan selama 30 menit pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$  dimana tiap 10 menit sekali sampel divortex. Kemudian, sampel disentrifuge pada 15.000g selama 30 menit. Supernatan yang didapatkan adalah sampel pemanasan venom atau PV.

## 4. Fraksinasi $\text{PLA}_2$

Presipitasi  $\text{PLA}_2$  dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat. Fraksinasi yang divariasikan adalah fraksinasi 20%, fraksinasi 40%, fraksinasi 60%, dan fraksinasi 80%.

#### 5. Uji aktivitas PLA<sub>2</sub>

Uji aktifitas PLA<sub>2</sub> pada percobaan ini menggunakan metode marineti yang bertujuan untuk memeriksa apakah phospolipase dari ekstrak yang dihasilkan masih memiliki aktivitas enzim untuk menurunkan nilai absorbansi dari suspensi telur dan Tris-Cl yang dibuat. Aktivitas enzim diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 900 nm.

#### 6. Uji lowry

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

#### 7. Uji SDS-PAGE

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

#### 8. Inkubasi virus HIV

Inkubasi bertujuan untuk memperbanyak virus HIV. Inkubasi dilakukan agar virus HIV berada pada fasa AIDS. Virus HIV ditumbuhkan pada sel imun tubuh. Hasil ada atau tidaknya virus HIV ini didapatkan dari hasil PCR.

## 3.2. Alat dan Bahan

### 3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut, tabung reaksi, beaker glass, vortex mixer, SDS-PAGE, spektrofotometer, pipet tetes, pipet ukur 5 ml, mikropipet, labu ukur 250 ml, gelas ukur, timbangan, spatula, termometer, waterbath, sentrifugasi, sonikator, assay infektivitas, labu erlenmeyer, eppendorf, screw tube, laminar Air flow, safety Cabinet, sequencer.

### 3.2.2. Bahan

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

#### 1. Pembuatan buffer fosfat pH 7.0,

Pembuatan buffer fosfat terdiri dari  $K_2HPO_4$  (Mr 174,17),  $KH_2PO_4$  (Mr 136,08), dan Aquabides

#### 2. Penentuan kadar protein Lowry :

Bahan-bahan yang digunakan untuk metode lowry adalah BSA 250  $\mu\text{g/mL}$ ,  $dH_2O$ , NaOH 0,1 N,  $CuSO_4$  1% ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  1,56 gr +  $dH_2O$ ), NaK-Tartrat 1% (NaK-Tartrat 2,37 gr +  $dH_2O$ ),  $Na_2CO_3$  2% (NaOH 2 gr +  $Na_2CO_3$  10 gr +  $dH_2O$ ), Larutan biuret (5 ml larutan  $CuSO_4$  1% dan larutan 5 ml NaK Tartrat 1%, dimasukkan ke dalam 500 ml larutan  $Na_2CO_3$  2%), dan Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N.

#### 3. Bahan-bahan SDS-PAGE :

Bahan-bahan untuk melakukan SDS-PAGE adalah aquades, akrilamid 29,2 gr, (bis)akrilamid, sodium Dodesil Sulfat 0,4 gr, larutan HCl, ammonium persulfat (APS) 0,1 gr, 2-mercaptoetanol 0,1 ml, Gliserin 2 ml, glisin 7,2 gr, bromofenol biru (BPB), coomasie Brilliant Blue 1 gr, metanol 300 mL, asam asetat 100 mL, dan N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED).

#### 4. bahan-bahan uji aktivitas fosfolipase :

Bahan-bahan untuk uji aktivitas fosfolipase adalah Sampel enzim, kuning telur, dan Tris-HCl buffer,

#### 5. Bahan-bahan uji aktivitas antiviral :

Bahan-bahan Sampel enzim, Peripheral Blood Mononucleus Cell, virus HIV, RPMI Media, Fetal bovine serum, Penicilin, Streptomycin, Gentamycin, IL-2-GM, dan RHPA.

### 3.3. Variabel Penelitian

#### 3.3.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang divariasikan dengan besar nilai tertentu. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu waktu pengambilan data kemurnian PLA<sub>2</sub>, aktivitas PLA<sub>2</sub>, dan pertumbuhan PBMC sebagai sel inang.

#### 3.3.2. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan atau dibuat dalam keadaan konstan. Variabel kontrol dalam penelitian ini yaitu tingkat kesegaran dari bintang laut *Acanthaster planci*, dilihat dari apakah bintang laut yang digunakan dalam keadaan mati ataupun hidup karena akan mempengaruhi hasil ekstrak racun.

#### 3.3.3. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang terjadi akibat adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu aktivitas spesifik PLA<sub>2</sub> dan pertumbuhan virus HIV.

### 3.4. Prosedur Preparasi Sampel

Preparasi sampel dari spesimen *A. planci* dilakukan dengan cara mengeluarkan dari spesimen *A. planci* yang tersimpan di lemari pendingin dan menunggu sekitar 12 jam sehingga dari spesimen *A. planci* tersebut tidak membeku. Dengan menggunakan gunting stainless steel dan pelindung tangan, dilakukan pemangkasan duri dari spesimen *A. planci* dan menyimpannya dalam wadah yang diberi es batu untuk menjaga kondisi duri selalu segar. Duri bintang laut yang telah digunting disimpan kedalam freezer bersuhu -20°C.

### 3.5. Metode Sonikasi

Metode sonikasi dilakukan dengan membersihkan batang sonikator dengan menggunakan alkohol 90% dan kemudian membilasnya dengan akuades hingga bersih dan mengeringkannya dengan tissue. Memasukkan duri yang ingin diekstrak dan larutan buffer fosfat pH 7 dengan perbandingan 1:1 kedalam wadah yang sesuai dengan diberikan es pada sekeliling wadah agar duri yang ingin di sonikasi tetap terjaga suhunya dengan baik. Melakukan sonikasi selama 2x 8 menit dengan intensitas 80% (42,5 Mega Hertz) mode push on off agar tidak terjadi panas berlebihan pada duri tersebut.

### 3.6. Prosedur Uji Aktivitas Phosfolipase

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

### 3.7. Prosedur Uji SDS-PAGE

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

Plate pembentuk gel disusun seperti petunjuk yang diberikan. *Separating gel* dibuat dengan cara menyiapkan tabung polipropilen 50 ml. Sebanyak 3,125 ml

stok akrilamid dimasukkan dalam tabung, kemudian sebanyak 2,75 ml 1 M Tris-pH 8,8 juga dimasukkan. Akuabides dimasukkan sebanyak 1,505 ml. SDS 10% kemudian dimasukkan sebanyak 75 ml. Sebanyak 6,5 ml TEMED dimasukkan. Kemudian, tabung ditutup dan digoyang secara perlahan. APS 10% dimasukkan sebanyak 75 ml tabung. Homogenisasi dengan *pipeting*. Larutan segera dituang ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara), hingga batas yang terdapat pada plate. Akuades perlahan ditambahkan di atas larutan gel dalam *plate* sehingga permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan di antara batas air dan gel yang terbentuk).

Air yang menutupu *separating gel* selanjutnya dibuang. Bila *separating gel* telah memadat, *stacking gel* 3% disiapkan dengan cara yang sama, tetapi dengan volume larutan yang meliputi: 30% *acrylamide-bis* sebanyak 0,45 ml, 1 M Tris-pH 6,8 sebanyak 0,38 ml, akuabides sebanyak 2,11 ml, 10% SDS sebanyak 30 ml, TEMED sebanyak 5 ml, dan 10% APS sebanyak 30 ml. Setelah *stacking gel* dimasukkan, maka selanjutnya sisiran diletakkan di atasnya.

Plate yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis. Running buffer dituang sampai bagian atas dan bagian bawah gel terendam. Gelembung udara yang mungkin terbentuk pada dasar gel atau di antara sumur sampel harus dihilangkan. Sampel dimasukkan ke dalam dasar sumur gel secara hati-hati menggunakan Hamilton *syringe*. *Syringe* dibilas sampai tiga kali dengan air atau dengan *running buffer* sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda dengan *running buffer* sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

Peringkat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* untuk memulai *running*. *Running* dilakukan pada arus konstan 20mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai *tracking dye* mencapai 0,5 cm dari dasar gel. Bila *running* telah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*.

Tahapan ini memerlukan larutan *staining* untuk mewarnai protein pada gel dan larutan *destaining* untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas *band protein* yang terbentuk. Larutan *staining* 1 liter terdiri atas *Coomassie*

*BlueR-250* sebanyak 1.0 g, metanol sebanyak 450 ml, akuades sebanyak 450 ml, dan asam asetat glasial sebanyak 100 ml. Larutan destaining 1 liter terdiri atas metanol sebanyak 100 ml, asam asetat glasial sebanyak 100 ml, dan akuades sebanyak 800 ml. Gel direndam dalam 20 ml *staining solution* sambil digoyang selama 15 menit. Setelah itu, larutan *staining* dituang kembali pada wadahnya. Gel direndam dalam 50 ml *destaining solution* setelah dicuci dengan air beberapa kali, sambil digoyang selama kurang semalaman atau sampai *band protein* terlihat jelas.

### 3.8. Prosedur Uji Lowry

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

**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  $\mu\text{g}$ . Konsentrasi protein dalam sampel kemudian dihitung menggunakan persamaan yang diperoleh setelah dikurangi dengan absorbansi blanko.

### 3.9. Prosedur Inkubasi Virus HIV

Inkubasi virus HIV menggunakan protokol yang terdapat pada internasional HIV database (U.S. Departement of Healt and Human Service, 1998). Inkubasi yang dilakukan menggunakan sel PBMC (Peripheral Blood Mononucleus Cell) yang akan menjadi sel inang untuk pertumbuhan virus HIV. Berikut ini adalah prosedur untuk inkubasi virus

#### 1. Stimulasi PBMC

Inkubasi virus HIV dilakukan dengan stimulasi PBMC. PBMC telah didapatkan dari hasil elusi sampel darah yang berasal dari PMI. PBMC ditaruh kedepan cryogenic vial dan semprot dengan alkohol untuk mencegah adanya kontaminan. PBMC kemudian ditaruh kedalam flask (tergantung volume yang diperlukan) yang mengandung 30 ml interleukin-



2-GM (IL-2-GM) dan PHA-P 5µg/ml untuk setiap 1 ml suspensi sel. Kemudian dilakukan inkubasi selama satu hari pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 1 hari, ganti media dengan 5 ml IL-2-GM segar untuk setiap vial dari sel yang digunakan. PBMC akan memiliki densitas minimal 5x10<sup>6</sup> sel/ml untuk digunakan. Sel dapat digunakan untuk infeksi setelah 3 hari.

## 2. Infeksi PBMC

Virus HIV didapatkan dari orang yang terserang HIV. Untuk tahap infeksi PBMC ini, 1 ml dari virus dimasukkan kedalam flask yang berisi PBMC terstimulasi yang segar. Media kemudian dilakukan penambahan 20 ml dari RPMI-1640. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 7 hari untuk mendapatkan kokultur. Setiap 2-3 hari sekali, sel diberikan makan berupa RPMI segar agar menjaga sel tetap tumbuh. Setelah didapatkan kokultur, infeksi PBMC dilakukan terus hingga 3 minggu setelahnya dengan catatan setiap 2-3 hari sekali diberi RPMI segar.

## 3. Deteksi Virus

Deteksi adanya virus dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Teknik ini memungkinkan untuk mendeteksi pada tingkat gen. Adanya virus HIV ditandai dengan adanya strain 5-GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA-3 dan 5-GGGCGCCACTAGAGA-3 pada hasil sequencing DNA PBMC.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Ekstraksi Phospolipase A<sub>2</sub>

Teknik ekstraksi dan pemurnian yang digunakan dalam penelitian ini merujuk pada metode pemurnian parsial enzim PLA<sub>2</sub> yang dilakukan oleh Imelda, dkk., 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. Sampel diambil pada bulan Desember 2011 – Januari 2012 bertepatan dengan musim penghujan. Sampel bintang laut yang dimiliki memiliki panjang duri mencapai 2-3 cm. Sebelum melakukan ekstraksi, duri bintang laut diguntingi seluruhnya dari badan *A. planci*.



**Gambar 4. 1.** Duri *A. planci* Siap Ekstrak dari Perairan Maluku

Duri *A. planci* yang akan diekstraksi dibilas terlebih dahulu dengan buffer fosfat pH 7 dan dibasuh dengan aquades untuk membersihkannya dari kemungkinan kotoran-kotoran yang ada dan sisa garam air laut yang terbawa

dalam proses preparasi sampel. Hasil pembilasan berwarna kecoklatan dan berbau amis dari permukaannya yang menandakan adanya pengotor dan sisa-sisa garam air laut yang ikut terbuang.

Untuk melakukan ekstraksi, sebanyak 50 g duri yang telah dibilas ditambahkan dengan 100 ml larutan buffer fosfat 0,01 M pH 7.0 dan 10 ml  $\text{CaCl}_2$  0,1 M. Kemudian dilakukan sonikasi selama 2 x 8 menit pada alat sonikator untuk mulai mengekstrak. Penambahan buffer fosfat sebagai larutan pengeksrak dan untuk menjaga kestabilan pH enzim yang mudah berubah. Sementara penambahan  $\text{CaCl}_2$  untuk menambah aktivitas enzim  $\text{PLA}_2$  sebanyak 180% (Shiomi, 1997). Sonikator digunakan karena ekstraksi enzim dapat berlangsung dengan cepat.

Hasil dari sonikator, duri bintang laut dipisahkan dari larutan. Larutan kemudian disentrifugasi untuk menghilangkan pengotor-pengotor yang kemungkinan terbawa saat ekstraksi. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 15.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang didapatkan merupakan sampel dari *crude venom*(CV).

Dalam melakukan ekstraksi maupun pemurnian enzim  $\text{PLA}_2$  suhu harus dijaga pada suhu 4°C. Suhu dijaga untuk menghindari terjadi kerusakan enzim akibat dari penguraian enzim karena suhu terlalu panas atau karena adanya aktivitas protease yang akan menghidrolisis ikatan peptida protein. Dengan melakukan pengerjaan disuhu tersebut, aktivitas enzim cenderung menurun. Oleh karena itu, kemungkinan terjadinya kerusakan semakin kecil.

#### **4.2. Pemurnian Phospolipase $A_2$**

Protokol pemurnian  $\text{PLA}_2$  yang digunakan mengacu pada metode Imelda dkk., 2011. Metode ini menggunakan teknik untuk bisa mengekstraksi enzim secara cepat dan murah. Dengan menggunakan pemnasan dan presipitasi garam ammonium sulfat, didapatkan enzim  $\text{PLA}_2$  yang murni. Presipitasi ammonium sulfat dilakukan untuk variasi fraksi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

Pemurnian ekstrak racun dimulai dengan pemanasan CV di *waterbath* dengan suhu 60°C selama 30 menit dimana tiap 10 menit sekali dilakukan vorte.

Dengan menggunakan suhu 60°C, protein-protein yang tidak diinginkan akan terdenaturasi akibat pemanasan yang dilakukan, sedangkan enzim PLA<sub>2</sub> tetap bertahan karena memiliki batas ketahanan suhu mencapai 75°C.

Hasil pemanasan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 15.000 g suhu 4°C selama 30 menit. Tujuan sentrifugasi adalah untuk memisahkan antara protein yang terdenaturasi dengan larutan yang mengandung PLA<sub>2</sub>. Supernatan dari hasil sentrifugasi merupakan sampel dari pemanasan venom atau disebut PV.

PV yang didapat akan dilakukan fraksinasi dengan presipitasi amonium sulfat. Fraksinasi dilakukan untuk presipitasi amonium sulfat 20%, 40%, 60%, dan 80%. Penambahan amonium sulfat berpengaruh terhadap kelarutan PLA<sub>2</sub> dalam ekstrak racun. Hal ini disebabkan kemampuan ion garam amonium sulfat untuk berikatan dengan air lebih besar sehingga membuat ikatan antara protein dan air terputus. Oleh karena itu molekul-molekul protein akan mengendap (*salting out*).

Pemberian amonium sulfat dilakukan sedikit demi sedikit untuk mengendapkan enzim dengan baik. Untuk mempercepat terjadinya pengendapan, digunakan *magnetic stirrer* pada larutan sampel. Setelah semua amonium sulfat larut, sampel didiamkan terlebih dahulu agar mengalami segregasi yang lebih baik. Segregasi memungkinkan amonium sulfat untuk berikatan dengan air lebih besar sehingga menyebabkan protein mengendap lebih banyak.

Hasil pengendapan dengan amonium sulfat, dilakukan sentrifugasi pada 15.000 g, 4°C, selama dua kali 30 menit. Endapan yang didapatkan diresuspensi dengan 0,01 M buffer fosfat pH 7 dan CaCl<sub>2</sub> sebanyak 2 ml. Hasil resuspensi yang didapatkan untuk masing-masing presipitasi amonium sulfat disebut fraksinasi 20% (F20), fraksinasi 40% (F40), fraksinasi 60% (F60), dan fraksinasi 80% (F80).



**Gambar 4. 2.** Hasil ekstraksi dan pemurnian racun duri *A. planci*

### 4.3. Uji Metode Lowry

Sampel yang didapat (CV, PV, F20, F40, F60, dan F80) kemudian dilakukan uji kandungan protein dengan menggunakan metode lowry. Metode ini dipilih karena kemampuannya untuk mendeteksi kandungan protein dengan sampel sedikit dan murah untuk dilakukan. Lowry dilakukan dengan protein standar berupa BSA (Bovine Serum Albumin) berkonsentrasi  $200\mu\text{g/ml}$ . Pengujian ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi pada masing-masing sampel yang nanti akan digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik dan kemurnian enzim  $\text{PLA}_2$ .

Uji lowry dilakukan secara duplo atau dua kali pengulangan. Sampel akan dilakukan pengujian untuk mendapatkan konsentrasi dari masing-masing sampel. Data kandungan protein untuk masing-masing sampel dapat dilihat pada tabel berikut ini (kurva standar dan cara perhitungan terdapat pada lampiran A),

Tabel 4. 1. Hasil Uji Metode Lowry

Sampel	Absorbansi rata-rata	Berat protein rata-rata/20 $\mu$ l ( $\mu$ g)	Kadar protein rata-rata (mg/ml)
CV	0,167	97,375	4,869
PV	0,130	73,938	3,697
F20	0,112	62,688	1,567
F40	0,249	148,625	7,431
F60	0,250	148,938	14,894
F80	0,317	191,125	19,113

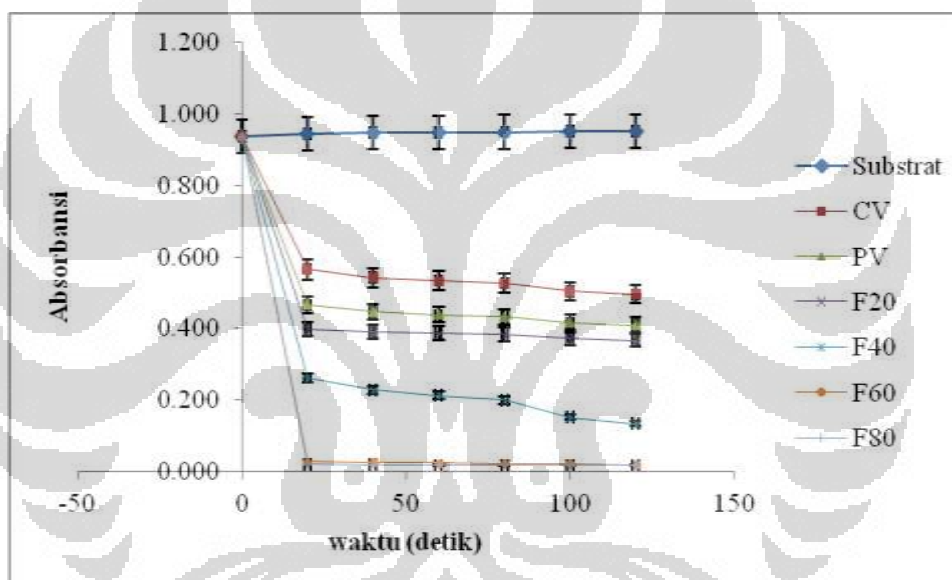
Kadar protein yang didapatkan dari hasil uji lowry menandakan protein berhasil diekstrak dari masing-masing sampel dari *A. planici*. Kandungan pada CV dan PV cenderung kecil karena belum mengalami pemurnian secara lebih lanjut. Konsentrasi PV lebih kecil dari CV karena adanya protein yang terdenaturasi akibat pemanasan pada suhu 60°C.

Saat melakukan fraksinasi, konsentrasi protein akan bervariasi. Semakin tinggi fraksinasi, konsentrasi protein semakin besar. Dapat dilihat konsentrasinya berturut-turut F20 < F40 < F60 < F80. Hal ini menandakan pengendapan semakin banyak untuk setiap kenaikan fraksi. Penyebab utamanya adalah banyaknya kandungan amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam sampel semakin besar fraksinasi maka semakin banyak amonium sulfat yang ditambahkan. Jumlah amonium sulfat yang besar menyebabkan ikatan terhadap air sehingga protein-protein akan lebih banyak mengendap.

#### 4.4. Uji Aktivitas Phospolipase A<sub>2</sub>

Uji aktivitas PLA<sub>2</sub> bertujuan untuk mengetahui kemampuan sampel untuk mengurai fosfatidilkolin yang terkandung dalam kuning telur. Metode yang dilakukan berdasarkan penjernihan substrat suspensi kuning telur melalui penurunan absorbansi (Marinetti, 1965). Pengujian ini dan pengujian lowry akan menjadi dasar untuk menentukan aktivitas spesifik, tingkat kemurnian, dan sampel yang akan digunakan untuk uji antiviral.

Substrat kuning telur yang telah dilarutkan dengan larutan buffer fosfat akan diujikan dengan sampel CV, PV, F20, F40, F60, dan F80. Masing-masing sampel akan dites kemampuan menjernihkan suspensi kuning telur. Pengukuran secara kuantitatifnya diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan  $\lambda = 900 \text{ nm}$ . Pengukuran dilakukan selama 5 menit dimana satu unit setara dengan penurunan konsentrasi substrat sebesar  $1 \mu\text{mol}$  untuk setiap menitnya (Sindurmata, 1989; Zarai dkk., 2010). Unit dalam enzim dinyatakan dalam penurunan absorbansi 0,01 abs/menit (Marinetti, 1965). Dalam uji aktivitas PLA2 ini digunakan substrat kuning telur dengan konsentrasi 2 mg/ml. Hasil uji aktivitas dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 4. 3. Hasil uji aktivitas

Dari grafik hasil uji aktivitas menandakan adanya penurunan absorbansi untuk masing-masing sampel. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat PLA<sub>2</sub> yang memiliki kemampuan untuk mengurai fosfatidilkolin pada suspensi kuning telur. Aktivitas terbesar ditunjukkan F80 sedangkan yang terkecil adalah CV.

Berturut-turut urutan aktivitas PLA<sub>2</sub> dari kecil ke besar adalah CV < PV < F20 < F40 < F60 < F80. CV merupakan sampel yang merupakan ekstrak racun murni dari duri *A. planici* yang belum dilakukan pemurnian. Aktivasnya kecil karena masih banyaknya protein-protein lain yang terdapat pada CV. PV jauh

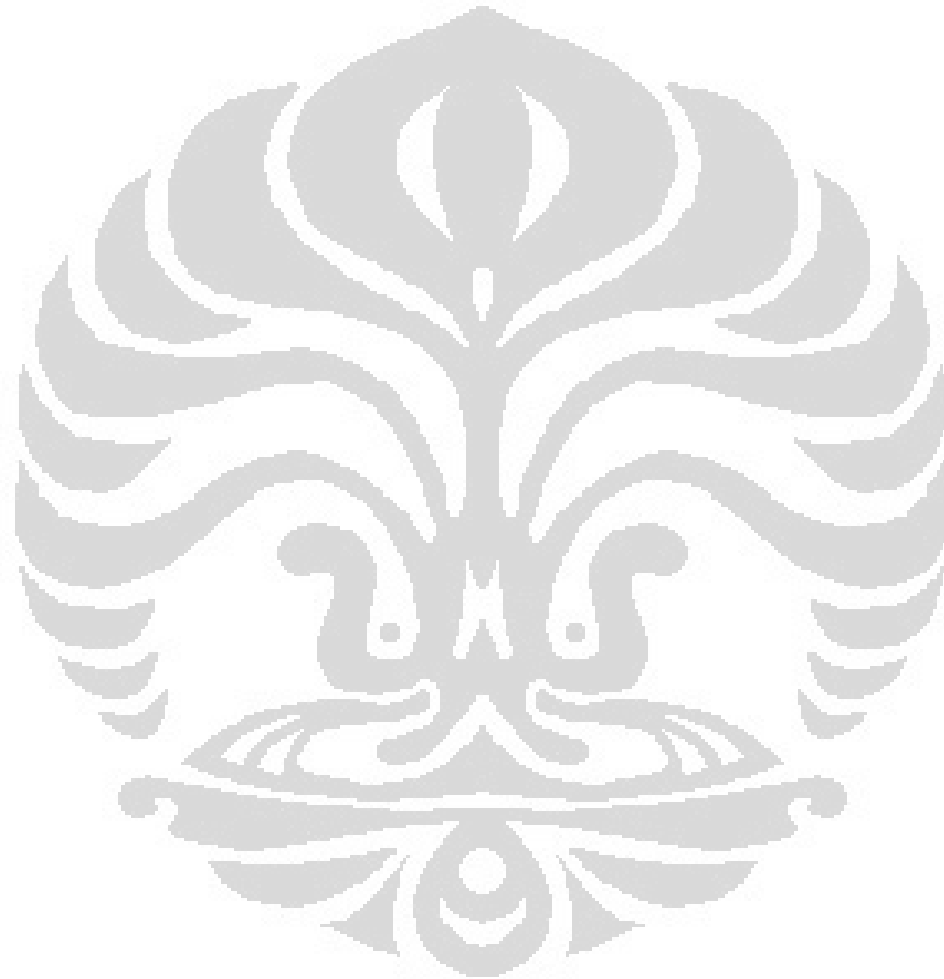
lebih besar karena protein-protein yang tidak diinginkan terdenaturasi sehingga PLA<sub>2</sub> dapat lebih banyak menunjukkan aktivitasnya. Dari hasil fraksinasi, F20 memiliki penurunan absorbansi paling sedikit dibandingkan dengan yang lain. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi PLA<sub>2</sub> di F20 jauh lebih kecil. Dari prosedur perhitungan pada Lampiran B, aktivitas spesifik PLA<sub>2</sub> dan tingkat kemurnian masing-masing dapat dihitung (Tabel 4.2.)





Tabel 4. 2. Hasil Aktivitas Spesifik dan Tingkat Kemurnian Sampel

<b>Sampel</b>	<b>Kons. Protein (mg/ml)</b>	<b>Volume Total (ml)</b>	<b>Unit</b>	<b>Aktivitas (unit/ml)</b>	<b>Aktivitas total (unit)</b>	<b>Protein total (mg)</b>	<b>Akt. Spesifik (unit/mg)</b>	<b>Tingkat kemurnian</b>
CV	4,87	100	9,40	47,02	4701,50	486,88	9,66	1,00
PV	3,70	100	10,82	54,09	5408,50	369,69	14,63	1,52
F20	1,57	2	49,53	247,65	495,31	3,13	158,02	16,36
F40	7,43	2	38,03	190,16	380,33	14,86	25,59	2,65
F60	14,89	2	45,16	225,78	451,55	29,79	15,16	1,57
F80	19,11	2	45,59	227,93	455,85	38,23	11,93	1,23



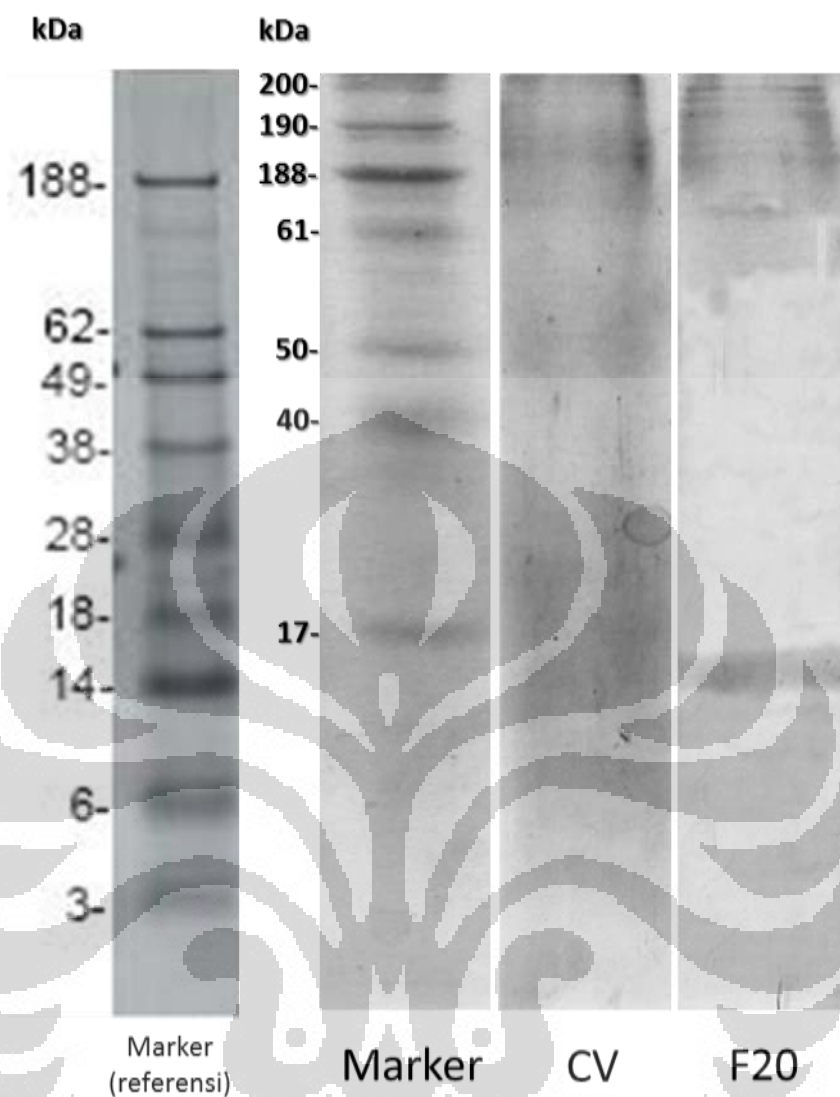
Berdasarkan hasil penentuan aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian dari enzim, maka dipilih sampel F20 yang akan digunakan untuk uji aktivitas antiviral. F20 terpilih karena memiliki aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian lebih besar dari yang lain yaitu sebesar 162,54 unit/mg untuk aktivitas spesifik dan 16,39 kali lebih murni dari CV. Sampel F20 akan dilakukan dialisis untuk preparasi uji aktivitas antiviral. Dialisis dilakukan untuk melakukan pemurnian terhadap enzim dari garam amonium sulfat yang kemungkinan ikut terendapkan.

Pada penelitian ini, secara umum berhasil melakukan ekstraksi dan pemurnian yang dengan menggunakan Imelda dkk., 2011. Sampel yang memiliki aktivitas spesifik tertinggi dan tingkat kemurnian lebih besar sama seperti yang ditunjukkan dalam penelitian ini (F20) walau memiliki tingkat kemurnian sedikit lebih rendah.

#### **4.5. Uji SDS Page**

Uji SDS-PAGE dilakukan untuk mengidentifikasi kebenaran keberadaan protein-protein dengan berat molekul tertentu dalam sampel termasuk di dalamnya protein enzim PLA<sub>2</sub> dan protein-protein lain non PLA<sub>2</sub> yang masih terbawa selama proses pemurnian.

Dalam uji SDS-PAGE ini, sampel yang akan diuji adalah sampel CV dan juga F20. CV dipilih karena merupakan hasil ekstrak awal dari duri *A. planci*. Sementara F20 dipilih karena memiliki aktivitas dan tingkat kemurnian yang besar. Oleh sebab itu, dengan membandingkan antara CV dan F20 didapatkan perbandingan kemurnian dari hasil SDS-PAGE. Dari hasil SDS, enzim PLA<sub>2</sub> memiliki berat sebesar 15 kDa (Imelda dkk., 2011). Apabila terdapat pita lain, maka enzim tersebut bukan PLA<sub>2</sub>.



Gambar 4. 4. Hasil SDS-PAGE

Dari hasil SDS-PAGE, menunjukkan adanya pita-pita baik yang terdapat di CV maupu di F20. Pita yang terdapat di CV sangat banyak. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan PLA<sub>2</sub> yang ada di dalam CV belum murni karena masih adanya protein-protein lain. Sementara itu, untuk F20, terdapat pita tipis yang ada di kisaran 15 kDa. Pita pada 15 kDa menandakan adanya PLA<sub>2</sub>. Dari hasil SDS-PAGE dapat disimpulkan bahwa sampel F20 memiliki PLA<sub>2</sub> dengan tingkat kemurnian lebih besar dibandingkan dengan CV.

#### 4.6. Hasil Preparasi Inkubasi Virus HIV

Preparasi inkubasi virus HIV mengikuti protokol yang terdapat pada internasional HIV database (U.S. Departement of Healt and Human Service, 1998). Inkubasi yang dilakukan menggunakan sel PBMC (Peripheral Blood Mononucleus Cell) yang akan menjadi sel inang untuk pertumbuhan virus HIV. Berikut ini adalah prosedur untuk inkubasi virus.

Inkubasi virus dilakukan untuk mempersiapkan virus HIV yang akan digunakan untuk uji aktivitas antiviral. Inkubasi virus HIV terdiri dari 3 hal yaitu mendapatkan dan menstimulasi PBMC, infeksi PBMC, dan identifikasi virus. Lama pengerjaan dari mulai mendapatkan PBMC hingga identifikasi virus adalah 1 bulan. Dalam penelitian ini akan dilaporkan hasil penelitian berupa preparasi virus untuk uji aktivitas antiviral PLA<sub>2</sub>.

##### 4.6.1. Mendapatkan PBMC Terstimulasi

Untuk mendapatkan PBMC, digunakan sel darah merah yang berasal dari PMI (Palang Merah Indonesia). Sel darah merah kemudian di lakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 320 g. Hasil sentrifugasi akan memisahkan antara sel darah merah, serum PBMC, dan juga plasma darah. PBMC diambil dengan menggunakan elusi.

Dari PBMC yang didapat, dilanjutkan dengan menghitung jumlah sel PBMC dengan cara *total plate count*. Dari hasil perhitungan didapatkan sel PBMC  $\pm 10^7$  sel/ml. Jumlah sel ini sudah lebih dari standar minimal PBMC yang akan digunakan sebagai sel inang virus HIV yakni  $5 \times 10^6$  sel/ml. PBMC yang didapatkan kemudian dilakukan stimulasi dengan IL-2-GM dan RHPA. Hasil contoh PBMC yang telah terstimulasi dapat dilihat dari mikroskop dapat dilihat pada gambar 2.18 (a).

##### 4.6.2. Infeksi PBMC

Infeksi PBMC merupakan tahap untuk menumbuhkan virus HIV untuk melakukan uji aktivitas antiviral. Virus HIV didapatkan dari sel darah merah

manusia yang mengalami penyakit HIV. Agar dapat tumbuh, virus HIV harus memiliki sel inang. Oleh karena itu, digunakan PBMC yang akan dijadikan sel inang tempat bertumbuh HIV.

PBMC yang terstimulasi digunakan sebagai media pertumbuhan virus. PBMC akan ditambahkan dengan RPMI yaitu substrat yang berisi nutrisi untuk pertumbuhan sel PBMC. Setelah PBMC dan RPMI dicampurkan, dilanjutkan dengan mencampurkan virus HIV kedalam flask media pertumbuhan. Setiap 3 hari sekali dilakukan pengecekan terhadap pertumbuhan dari virus koloni berupa ada tidaknya kontaminasi dan juga penambahan nutrisi ke media pertumbuhan. Gambar pertumbuhan di media flask yang dilihat di mikroskop dapat dilihat pada gambar 2.18 (b).

Identifikasi adanya pertumbuhan pada media, ditandai dengan terbentuknya kumpulan-kumpulan yang menyerupai koloni dari sel PBMC. PBMC pada dasarnya merupakan sel imun tubuh. Sel imun, didalam tubuh manusia sering kali berkumpul satu sama lain dan membentuk makrofag. Sel PBMC yang tumbuh akan saling berkumpul. Terlihat pada gambar 2.18 (b), bahwa sel saling berkumpul yang mengidentifikasi adanya pertumbuhan. Untuk pertumbuhan ini, akan didapatkan ko-kultur setelah 7 hari setelah infeksi PBMC dan bisa melakukan identifikasi virus 3 minggu setelahnya.

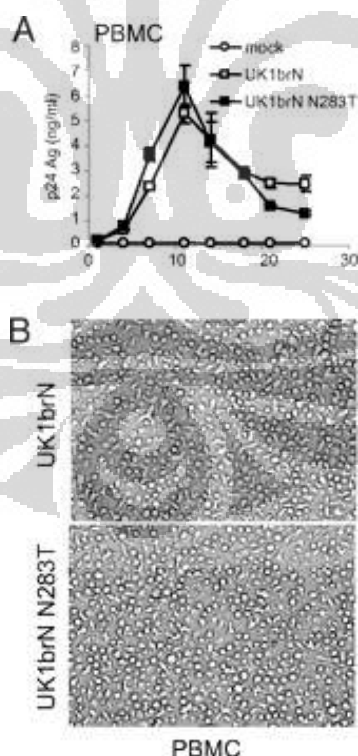
#### **4.6.3. Hasil Identifikasi Virus dari Media**

Identifikasi virus dari media dilakukan dengan cara PCR atau *Polymerase Chain Reaction*. Metode ini dilakukan untuk mendeteksi pada level DNA tentang ada tidaknya strain HIV yang terdapat pada media. Substrat akan dilakukan uji PCR untuk mengetahui ada tidaknya virus.

Dari hasil PCR yang dilakukan oleh pihak laboratorium IHVCB, mendapatkan laporan tidak teridentifikasi adanya virus HIV pada media (Data tidak mendapat izin untuk ditampilkan dari laboratorium IHVCB). Setelah ditelusuri, ternyata media mengandung bakteri yang menjadi kontaminan. Bakteri ini dapat menghambat pertumbuhan virus. Selain dapat menghambat agar virus HIV menempel pada sel PBMC, bakteri ini juga akan berkompetisi dengan sel

PBMC untuk mendapatkan nutrisi yang ada pada media. Bakteri lebih cepat berplikasi daripada sel PBMC. Kecepatan replikasinya bisa dalam hitungan menit. Kemampuannya untuk bereplikasi dengan cepat membuat sel PBMC sulit mendapatkan nutrisi yang berakibat pada kegagalan pertumbuhan virus. Gambar adanya kontaminasi bakteri dari media dapat dilihat pada gambar dibawah. Kontaminasi bakteri ditandai dengan bintik-bintik warna hitam yang merupakan koloni dari bakteri. Penampakan kontaminasi bakteri pada sel media pertumbuhan dapat dilihat pada gambar 2.18 (c).

Apabila virus mengalami pertumbuhan pada sel PBMC, inkubasi akan berlangsung seperti yang terlihat pada gambar 4.10. Dimana sel PBMC akan meningkat selama 10 hari pertama, lalu akan menurun setelahnya. Hal ini menandakan bahwa sel PBMC telah terinfeksi dengan virus dimana setelah hari kesepuluh, sel PBMC akan berkurang akibat replikasi virus yang telah mencapai tahap pengeluaran virus dari sel inang (dilihat pada MDM). Sel PBMC akan pecah akibat virus mulai berplikasi.



**Gambar 4. 5.** Gambar pertumbuhan virus pada media PBMC (Rebecca, 2006)

Sementara pada gambar hasil penelitian, sel PBMC juga semakin sedikit, tetapi penyebabnya bukan karena replikasi virus tetapi karena kalah bersaing

dengan bakteri yang menjadi kontaminan. Bakteri lebih cepat bereplikasi yang menyebabkan sel berkompetisi dengan bakteri untuk mendapat nutrisi. Karena kekurangan nutrisi maka sel menjadi mati dan berjumlah sedikit.

Penyebab kontaminasi dapat disebabkan oleh 3 hal yaitu dari pengerjaan peneliti, kondisi laminar, dan juga berasal dari media PBMC yang digunakan. Pengulangan pertumbuhan selalu dilakukan dengan kondisi yang lebih steril tetapi kontaminasi bakteri. Oleh karena itu, penyebab kemungkinan adanya kontaminasi adalah media PBMC.

Bakteri yang menjadi kontaminan masuk saat pengerjaan PBMC di tempat yang kurang steril. Pengerjaan untuk elusi PBMC ini sendiri membutuhkan tempat yang lebih steril. Penggunaan keamanan laboratorium dengan level yang lebih tinggi untuk mendapatkan PBMC sangat diperlukan.

Untuk bisa melakukan preparasi selanjutnya, maka PBMC harus diganti dan mencoba untuk menggunakan laboratorium dengan tingkat keamanan yang lebih tinggi hingga Biosafety level 3. Dengan mengerjakannya di laboratorium Biosafety level 3, kemungkinan adanya bakteri yang menjadi kontaminan sangat kecil terjadi.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1. Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut,

Hasil dari ekstraksi dan pemurnisan PLA<sub>2</sub>

1. Fraksinasi amonium sulfat pada konsentrasi 20% berhasil dimurnikan dari racun bintang laut *A. planici* dengan tingkat kemurnian 16 kali CV.
2. Hasil uji SDS-PAGE menyimpulkan bahwa PLA<sub>2</sub> berhasil diekstraksi dan pemurnian berhasil dilakukan.

Hasil dari inkubasi virus HIV

1. PBMC yang didapatkan dan terstimulasi berjumlah  $\pm 10^7$  sel/ml. Jumlah sel ini sudah lebih dari standar minimal PBMC yang akan digunakan sebagai sel inang virus HIV yakni  $5 \times 10^6$  sel/ml
2. Hasil Identifikasi virus setelah infeksi PBMC selama 1 bulan tidak teridentifikasi adanya virus.
3. Terdapat kontaminasi bakteri pada media pertumbuhan virus yang menghambat pertumbuhan virus

#### **5.2. Saran**

1. Pengerjaan untuk mendapatkan PBMC dilakukan pada laboratorium dengan Biosafety Level 3. Dimana kemungkinan terjadinya kontaminasi PBMC kecil.
2. Melakukan studi dan mencari data tentang optimasi pertumbuhan PBMC dan virus

## DAFTAR PUSTAKA

- Admin. “Dialysis Methods for Protein Research”.  
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=5753AFD9-5056-8A76-4E13-5F9E9B4324DA> (4 Juni 2012)
- Ai Watanabe, H. N., Yuji Nagashima, and Kazuo Shiomi. 2008. *Structural Characterization of Plancitoxin I, A Deoxyribonuclease II-like Lethal Factor from the Crown-of-Thorns Starfish Acanthaster planci, by Expression in Chinese Hamster Ovary Cells*. The Japanese Society of Fisheries Science 75: 225-231.
- Anonim. “Overview of the Global AIDS Epidemic”.  
[http://data.unaids.org/pub/GobalReport/2006/2006\\_GR\\_CH02\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/GobalReport/2006/2006_GR_CH02_en.pdf) (25 Desember 2011)
- Anonim. “Info HIV & Aids”. <http://www.aidsindonesia.or.id/dasar-hiv-aids> (25 Desember 2011)
- Ant. “Kasus HIV/AIDS di Bali Melonjak”. <http://www.metrotvnews.com/metromain/news/2011/12/24/76441/Kasus-HIV/AIDS-di-Bali-Melonjak> (25 Desember 2011)
- Bachtiar, I. 2009. *Bintang Laut Mahkota Duri (Acanthaster planc, Asteroidea)*. Pusat Penelitian Pesisir dan Laut. Mataram : Universitas Mataram.
- Brian Lin, R. L. 2008. *A Case of Elevated Liver Function Tests After Crown-of-Thorns (Acanthaster planci) Envenomation*. Wilderness and Environmental Medicine, 275-279.
- Budianto, A. 2002. *Sang Bintang Pemburu Karang*. Warta Oseanografi, XVI (4) : 17-19.
- Carpenter, R. C. 1997. *Invertebrate Predators and Grazers*. New York: Chapman & Hall.

- CRC. 2003. *Crown-of-thorns starfish in the Great Barrier Reefs: Current State of Knowledge*. Cooperative Research Centers (CRC) Reef Research Center. Townsville, Australia.
- Delves, Peter dkk. 2011. *Roitt's Essential Immunology*. 11th ed. ISBN 978-1-4051-3603-7
- Fenard, David. 1999. *Secreted Phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells*. The Journal of Clinical Investigation p 341-347.
- Fenard, David. 2001. *A Peptide Derived from Bee-Venom-Secreted Phospholipase A2 Inhibits Replication of T-Cell Tropic HIV-1 Strains via Interaction with the CXCR4 Chemokine Receptor*. Molecular Pharmacology, 341-347.
- Deutscher, M. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington: University of Connecticut Health Center.
- Eiji Ota, H. N. 2006. *Molecular Cloning of Two Toxic Phospholipases A2 from the Crown-of-Thorns Starfish *Acanthaster planci* Venom*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 54-60.
- Evans, J. (n.d.). *Sea Remedies; Evolution of the Senses*. Emrys Publishers.
- Fritz H., Kayser, K. A. 2005. *Medical Microbiology*. Stuttgart: Thieme.
- Guarnieri MC, M. E.-M.-d.-S.-B. 2009. *Cloning of A Novel Acidic Phospholipase A2 from the Venom Gland of *Crotalus durissus Cascavella* (Brazilian Northeastern Rattlesnake)*. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 745-761.
- Hakim, A. A. (n.d.) *Fauna Ekinodermata Perairan Terumbu Karang Bakauheni dan Sekitarnya*.
- Imelda Krisanta Enda Savitri, F. I. 2011. *Rapid and Efficient Purification Method of Phospholipase A2 from *Acanthaster planci**. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 401-406.

- Jae-Ouk Kim, B. C. N. 2006. *Lysis of HIV-1 by Specific Secreted Human Phospholipase A2*. Bethesda: Journal Virology.
- Jawetz, M. A. 2007. *Medical Microbiology. 24th ed.*. United States of America: McGraw-Hill Companies.
- Jayaputra, D. A. 2011. *Isolasi Enzim Phospholipase dari Duri Bintang Laut Acanthaster planci Menggunakan Endapan Etanol*.
- Koelman, K.R. 2005. *Color Atlas Biochemistry*. 2nd ed. Marburg: Thieme.
- Lehninger, A. L. 1993. *Dasar-dasar Biokimia*. Vol. 1. Jakarta: Gramedia.
- Li-rong SHEN, M. 2010. *Expression of a Bee Venom Phospholipase A2 from Apis cerana in the Baculovirus-insect Cell*. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 342-349.
- Madl, P. 2002. *Acanthaster planci. Colloquial Meeting of Marine Biology I*. Salzburg.
- Meenakshisundaram. 2009. *Hypothesis of Snake and Insect Venoms against Human Immunodeficiency Virus: a Review*. AIDS Research and Therapy.
- Ramadan, R. H., Mohamed, A. F., & El-Daim, A. 2009. *Evaluation of Antiviral Activity of Honeybee Venom on DNA and RNA Virus Models*. Academic Journal Biology Science, 247-258.
- Rebecca. 2006. *The HIV Env Variant N238 Enhances Macrophage Tropism and is Associated with Brain Infection and Dementia*. PNAS vol. 103 no 41, 15160-15165.
- Saunders, J. C. 2007. *Virology: Principles an Application*. England: Wiley.
- Setyastuti, A. 2009. *Biologi dan Ekologi Bintang Laut Mahkota Duri (Acanthaster planci)*. Oseana, XXXIV, 17-24.

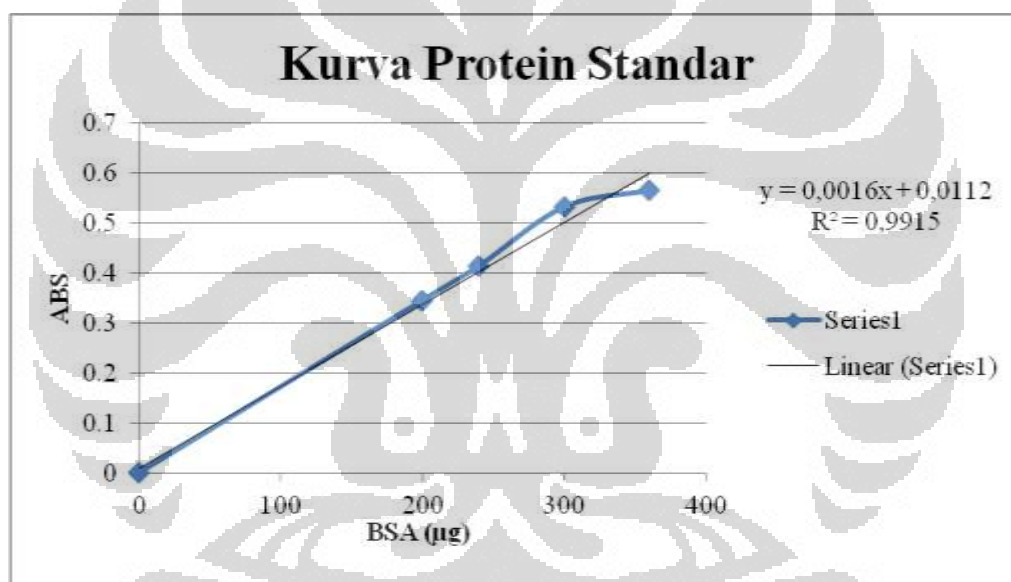
- Shiomi, K., Itoh K., Yamanaka, and Kikuchi. 1985. *Biological Activity of Crude Venom from the Crown-of-Thorns Starfish Acanthaster planci*. Nippon Suisan Gakkaishi 51: 1151-1154.
- Shiomi, K., Nagai, K., Yamanaka, H. And Kikuchi, T. 1989. *Inhibitory Effect of Anti-inflammatory Agents on Cutaneous Capillary Leakage Induced by Six Marine Venoms*. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 131-134.
- Shiomi, K., Kuniyoshi Shimakura, and Yuji Nagashima. 1997. *Purification and Properties of Phospholipases A2 from the Crown-of-Thorns Starfish (Acanthaster planci) Venom*. Toxicon 36 (4) : 589-599.
- Sprayberry. J. L. 2006. *Antiviral Activity of Quillaja saponaria molina Extracts Againsts HIV-1 and HIV-2*. Arlington: The University of Texas.
- Takahiko J. Fujimi, Y. K. 2002. *Nucleotide sequence of Phospholipase A2 Gene Expressed in Snake Pancreas Reveals the Molecular Evolution of Toxic Phospholipase A2 Genes*. Gene 292, 225-231.
- 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.

## LAMPIRAN

### Lampiran A Penentuan Kandungan Metode Lowry

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

Tabung	BSA	Abs750
1	0	0
2	200	0,345
3	240	0,414
4	300	0,532
5	360	0,565



Gambar A. 1 Kurva Standar Protein BSA

#### Penentuan Kadar Protein Sampel

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

$$y = 0,0016x + 0,0112$$

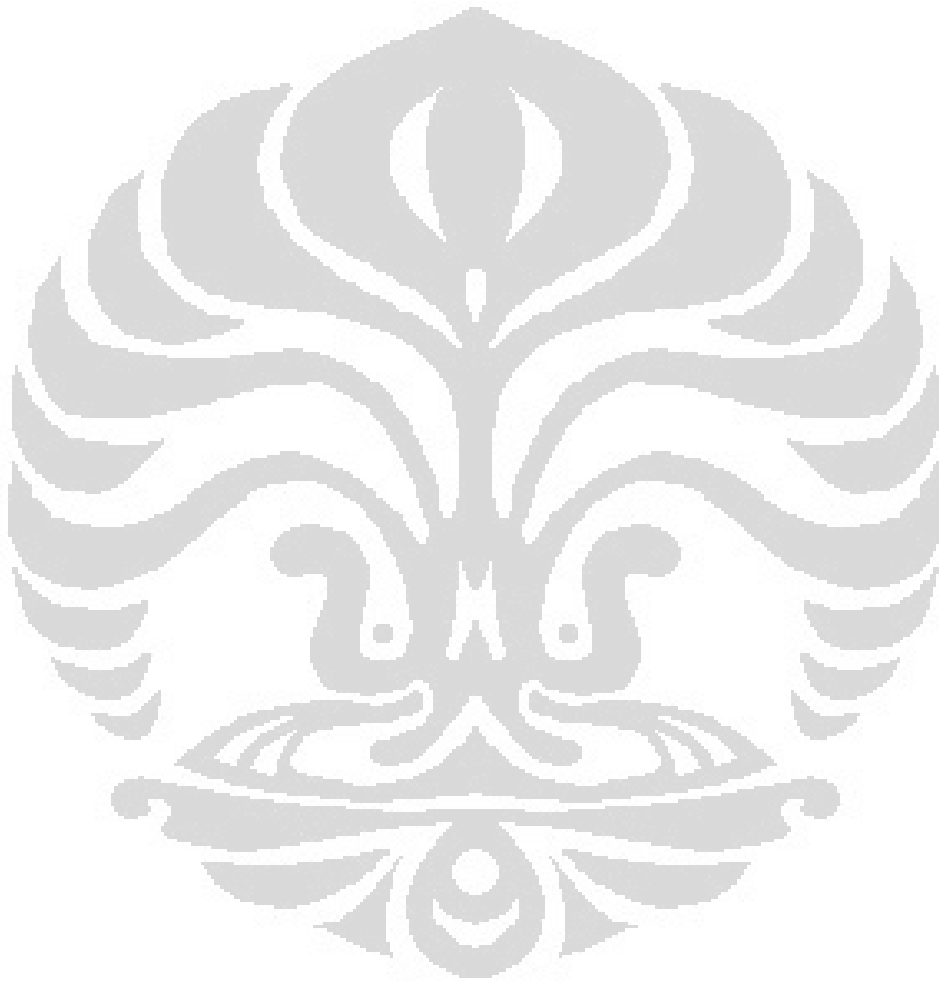
Dengan y adalah nilai absorbansi sampel dan x adalah nilai kadar protein dalam  $\mu\text{g}$ .

Contoh perhitungan :

Absorbansi sampel *crude venom* (CV) setelah dikurangi blanko sebesar 0.167, maka kadar proteinnya

$$x = \frac{0,167 - 0,0112}{0,0016}$$

Maka didapat kadar CV sebesar 97,375 µg, karena sampel yang digunakan sebesar 20 µl, maka 97,375 µg/20 µl = 4,869 mg/ml



## **Lampiran B. Penentuan Aktivitas Spesifik PLA<sub>2</sub>**

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

1 unit didefinisikan sebagai jumlah serapan yang berkurang 0.01 absorbansi pada panjang gelombang 900 nm per menit.

Contoh sampel CV selama 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 PLA<sub>2</sub> yang digunakan.

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

### **Aktivitas Total (unit)**

Merupakan aktivitas keseluruhan sampel enzim PLA<sub>2</sub> 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 mg/ml x 220 ml = 387.75 mg

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

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

Contoh : aktivitas spesifik CV = 1425 unit/ 387.75 mg = 3.74 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  $3.5/3.74 = 0.94$ .



**Lampiran C. Data Hasil Uji Aktivitas PLA<sub>2</sub>**

**Tabel C. 1.** Data Hasil Uji Aktivitas PLA<sub>2</sub>

t (detik)	Absorbansi Sampel																		
	Substrat	CV			PV			F20			F40			F60			F80		
		1	2	Rata2	1	2	Rata2	1	2	Rata2	1	2	Rata2	1	2	Rata2	1	2	Rata2
0	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938		0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938	0,938
10	0,938	0,578	0,357	0,468	0,477	0,393	0,435	0,403	0,327	0,365	0,278	0,226	0,252	0,028	0,197	0,112	0,020	0,042	0,031
20	0,945	0,566	0,351	0,459	0,467	0,386	0,426	0,399	0,323	0,361	0,261	0,210	0,236	0,028	0,162	0,095	0,020	0,040	0,030
30	0,947	0,554	0,345	0,450	0,457	0,379	0,418	0,395	0,319	0,357	0,245	0,194	0,219	0,027	0,126	0,077	0,020	0,038	0,029
40	0,949	0,543	0,338	0,441	0,447	0,372	0,409	0,390	0,315	0,352	0,228	0,178	0,203	0,025	0,091	0,058	0,019	0,036	0,028
50	0,949	0,533	0,334	0,434	0,438	0,367	0,403	0,387	0,312	0,349	0,213	0,167	0,190	0,023	0,063	0,043	0,018	0,034	0,026

60	0,950	0,526	0,330	0,428	0,432	0,361	0,397	0,383	0,309	0,346	0,199	0,155	0,177	0,022	0,048	0,035	0,018	0,034	0,026
70	0,951	0,520	0,326	0,423	0,427	0,358	0,393	0,380	0,306	0,343	0,186	0,145	0,166	0,021	0,040	0,031	0,018	0,033	0,026
80	0,951	0,514	0,323	0,419	0,423	0,355	0,389	0,378	0,304	0,341	0,174	0,137	0,155	0,020	0,037	0,029	0,018	0,033	0,026
90	0,952	0,509	0,319	0,414	0,420	0,350	0,385	0,375	0,301	0,338	0,163	0,129	0,146	0,019	0,035	0,027	0,018	0,033	0,026
100	0,952	0,504	0,315	0,410	0,417	0,346	0,381	0,372	0,298	0,335	0,152	0,122	0,137	0,019	0,034	0,026	0,018	0,032	0,025
110	0,953	0,500	0,312	0,406	0,413	0,342	0,378	0,370	0,296	0,333	0,143	0,116	0,129	0,019	0,034	0,027	0,018	0,032	0,025
120	0,952	0,495	0,310	0,403	0,410	0,338	0,374	0,367	0,294	0,331	0,134	0,109	0,121	0,019	0,033	0,026	0,018	0,032	0,025
130	0,952	0,490	0,307	0,399	0,408	0,336	0,372	0,366	0,291	0,328	0,126	0,103	0,115	0,018	0,032	0,025	0,018	0,032	0,025
140	0,951	0,487	0,305	0,396	0,405	0,334	0,370	0,364	0,289	0,327	0,119	0,098	0,109	0,018	0,032	0,025	0,018	0,032	0,025
150	0,951	0,483	0,302	0,393	0,401	0,330	0,366	0,362	0,287	0,324	0,113	0,095	0,104	0,017	0,031	0,024	0,018	0,032	0,025
160	0,951	0,480	0,300	0,390	0,398	0,327	0,363	0,358	0,284	0,321	0,107	0,091	0,099	0,017	0,030	0,024	0,017	0,032	0,024
170	0,951	0,477	0,298	0,387	0,396	0,324	0,360	0,356	0,283	0,319	0,102	0,087	0,095	0,017	0,032	0,024	0,017	0,032	0,024

180	0,950	0,474	0,296	0,385	0,392	0,322	0,357	0,353	0,281	0,317	0,097	0,084	0,091	0,017	0,031	0,024	0,017	0,031	0,024
190	0,951	0,469	0,294	0,382	0,389	0,319	0,354	0,352	0,278	0,315	0,094	0,080	0,087	0,017	0,030	0,023	0,017	0,031	0,024
200	0,951	0,465	0,293	0,379	0,386	0,316	0,351	0,350	0,276	0,313	0,090	0,077	0,084	0,017	0,030	0,023	0,017	0,031	0,024
210	0,953	0,462	0,289	0,376	0,384	0,314	0,349	0,348	0,276	0,312	0,087	0,075	0,081	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
220	0,953	0,459	0,287	0,373	0,382	0,312	0,347	0,346	0,273	0,310	0,084	0,073	0,079	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
230	0,952	0,455	0,284	0,370	0,378	0,309	0,344	0,344	0,270	0,307	0,082	0,071	0,076	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
240	0,952	0,452	0,282	0,367	0,375	0,306	0,341	0,343	0,270	0,306	0,079	0,069	0,074	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
250	0,950	0,448	0,280	0,364	0,372	0,304	0,338	0,341	0,267	0,304	0,077	0,068	0,073	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
260	0,949	0,445	0,277	0,361	0,369	0,301	0,335	0,339	0,266	0,302	0,075	0,067	0,071	0,017	0,029	0,023	0,017	0,031	0,024
270	0,951	0,441	0,275	0,358	0,367	0,299	0,333	0,337	0,264	0,301	0,073	0,065	0,069	0,017	0,029	0,023	0,017	0,030	0,023
280	0,949	0,437	0,272	0,354	0,364	0,296	0,330	0,335	0,262	0,299	0,071	0,065	0,068	0,017	0,029	0,023	0,017	0,030	0,023
290	0,948	0,433	0,270	0,352	0,360	0,294	0,327	0,333	0,260	0,297	0,069	0,063	0,066	0,017	0,029	0,023	0,017	0,030	0,023

300	0,947	0,430	0,268	0,349	0,357	0,291	0,324	0,332	0,258	0,295	0,068	0,062	0,065	0,017	0,029	0,023	0,017	0,029	0,023
310	0,947	0,427	0,265	0,346	0,353	0,288	0,321	0,330	0,257	0,294	0,067	0,061	0,064	0,017	0,029	0,023	0,017	0,029	0,023

**Lampiran D.** fraksinasi amonium sulfat

<b>Konsentrasi awal dari amonium sulfat</b>	<b>Persentase Kejenuhan</b>			
	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>
	<b>Amonium sulfat yang ditambahkan ke 1 liter larutan (gram)</b>			
<b>0</b>	106	226	361	516
<b>20</b>		113	241	387
<b>40</b>			120	258
<b>60</b>				129

Sumber : Dawson dkk., 1969