



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS PLANCITOXIN RACUN DURI
BINTANG LAUT *Acanthaster planci* PERAIRAN AMBON,
MALUKU**

SKRIPSI

MUHAMMAD IQBAL NUGRAHA

0806340145

FAKULTAS TEKNIK

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS PLANCITOXIN RACUN DURI
BINTANG LAUT *Acanthaster planci* PERAIRAN AMBON,
MALUKU**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana

MUHAMMAD IQBAL NUGRAHA

0806340145

FAKULTAS TEKNIK

DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA

DEPOK

JULI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Muhammad Iqbal Nugraha

NPM : 0806340145

Tanggal : 02 Juli 2012

Tanda Tangan : *Muqeto*

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Muhammad Iqbal Nugraha
NPM : 0806340145
Program Studi : Teknologi Bioproses
Judul Skripsi : **Isolasi Dan Uji Aktivitas Plancitoxin Racun Duri
Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Ambon,
Maluku**

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

Fakultas Teknik Kimia, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng. (Anondho)

Pembimbing : Dr. Amarila Malik, Apt., M. Si. (Amarila)

Penguji : Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si., M.Eng (Muhamad Sahlan)

Penguji : Dr. Ing. Donni Adinata, S.T., M. Eng. Sc (Donni Adinata)

Penguji : Ir. Tania Surya Utami, MT (Tania Surya Utami)

Ditetapkan di : Departemen Teknik Kimia

Tanggal : 02 Juli 2012

KATA PENGANTAR

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

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA, selaku ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
2. Prof. Anondho Wijanarko, Dr. Amarila Malik dan Ibu Imelda atas bimbingan yang telah diberikan.
3. Pa Sahlan, Pa Doni, dan Bu Nana atas masukan yang telah diberikan dalam sidang skripsi.
4. Ayah dan Ibu yang sangat ingin penulis bahagiakan. Terima kasih atas dukungan, kasih sayang, dan doa yang diberikan.
5. Khotib, Radit, Sungging, Riyandi, Yongki, Aziz, Dimas, dan teman-teman kontrakan atas bantuan dan semangat yang selalu diberikan.
6. Teman-teman angkatan 2008 atas kebersamaan dan pertemanannya selama ini.
7. Editha, Evelina, Furqon, Neti, serta rekan-rekan riset lab mikrobiologi dan bioteknologi farmasi.
8. Rekan-rekan riset lab LIPI Cibinong
9. Pihak-pihak lain yang mendukung dan membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Depok, 02 Juli 2012

Penulis



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

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

Nama : Muhammad Iqbal Nugraha

NPM : 0806340145

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 Noneklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS PLANCITOXIN RACUN DURI
BINTANG LAUT *Acanthaster planci* PERAIRAN AMBON, MALUKU**

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 02 Juli 2012

Yang menyatakan



(Muhammad Iqbal Nugraha)

ABSTRAK

Nama : Muhammad Iqbal Nugraha

Program Studi : Teknologi Bioproses

Judul : **Isolasi Dan Uji Aktivitas Plancitoxin Racun Duri Bintang Laut *Acanthaster planci* Perairan Ambon, Maluku**

Peledakan populasi bintang laut *Acanthaster planci* menyebabkan terjadinya kerusakan parah pada populasi terumbu karang, dan proses penanggulangannya memakan biaya besar. Oleh sebab itu, alternatif yang dapat dilakukan ialah dengan memberikan nilai tambah pada bintang laut, dengan memanfaatkan bintang laut tersebut menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi. Penelitian sebelumnya memperlihatkan duri dari *A. planci* memiliki kandungan racun yang terdiri dari peptide-plancinin, enzim *Plancitoxin*, dan enzim Phospholipase A2. *Plancitoxin* diketahui memiliki homologi struktur dengan enzim DNase yang berpotensi sebagai terapi kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk dapat mengekstraksi *plancitoxin* menggunakan metode yang sederhana. Racun *plancitoxin* dengan konsentrasi 11,75 mg/ml dengan aktivitas 9198,200 Kunitz unit/ml terekstrak pada fraksi 60 % amonium sulfat. Selain itu, analisis SDS-PAGE menunjukkan racun *plancitoxin* berada pada berat molekul 27 kDa.

Kata Kunci: Acanthaster planci, bintang laut, plancitoxin, amonium sulfat

ABSTRACT

Nama : Muhammad Iqbal Nugraha

Study Program : Bioprocess Technology

Judul : **Isolation and Activity Assay of Plancitoxin of *Acanthaster planci* Starfish from Ambon, Moluccas**

Population outbreaks of *Acanthaster planci* starfish have been known to cause severe damages for coral reefs population. The control of starfish population also known spent a lot of costs. One of the alternatives to solve the problem is to use part of its body to be a product with higher economical value. Former researches saw that *A.planci*'s spines contain venoms consist of three protein, peptide-plancinin, *plancitoxin*, and Phospholipase A2. One of the protein is *plancitoxin*, a protein known having homologue structure with DNase enzyme, an enzyme which has been experimented to be supplement for cancer remedies. So then the aim of this research is to study *plancitoxin* from *A.planci*'s spines. In this research, *plancitoxin* extracted by using ammonium sulfate precipitation method. The experiment results *plancitoxin* successfully extracted with protein concentration up to 11.75 mg/ml and its activity reaches 9198.200 Kunitz/ml in 60% ammonium sulfate fraction. SDS-PAGE analysis showed that *plancitoxin*'s molecular weight is 27 kDa.

Keywords: Acanthaster planci, starfish, plancitoxin, ammonium sulfate

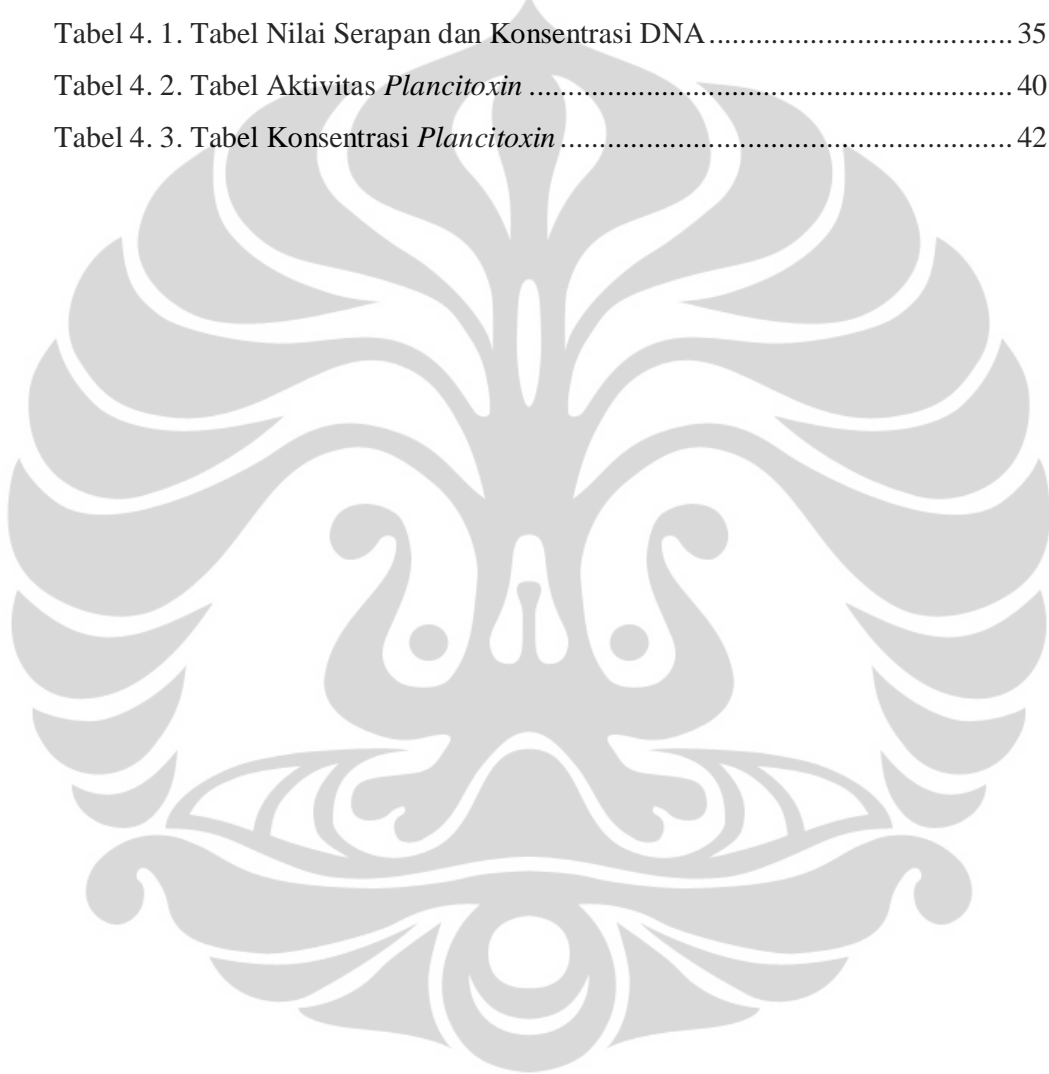
DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	2
1.4. Batasan Masalah	2
1.5. Sistematika Penulisan	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. <i>Acanthaster planci</i>	4
2.2. Pertumbuhan dan Reproduksi	5
2.3. Siklus Hidup	6
2.4. Ekologi	7
2.5. Dampak Pemangsaan	7
2.6. Racun <i>Acanthaster planci</i>	9
2.7 Aplikasi Enzim Deoxyribonuklease di Bidang Medis	10
2.8 Teknik – Teknik Isolasi Protein	11
2.8.1 Teknik Pemanasan Protein	11
2.8.2 Ion Exchange Chromatography	12
2.8.3 Gel Filtration	13
2.8.4 Dialisis	13

2.8.5 Fraksinasi	13
2.8.6 Ekstraksi.....	14
2.8.6.1 Ekstraksi <i>Maserasi</i>	15
2.8.7 Metode Pemisahan dengan Membran.....	15
2.9 Uji Kadar Protein Lowry	16
2.10 Sodium Dodesil Sulfat-Gel Poliakrilamid (SDS-PAGE)	17
2.11. <i>State of The Art</i> Penelitian	19
BAB III METODE PENELITIAN	23
3.1 Bahan dan Alat.....	23
3.1.1 Bahan Kimia	23
3.1.2 Alat	25
3.2 Preparasi Sampel Protein Enzim.....	26
3.3 Fraksinasi.....	27
3.3 Ekstraksi DNA dari Darah.....	27
3.4 Uji Aktivitas <i>Plancitoxin</i>	28
3.5 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry	29
3.6 Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1. Ekstraksi Racun <i>A.planci</i>	32
4.2. Isolasi DNA sebagai Substrat	33
4.3. Isolasi <i>Plancitoxin</i>	35
4.4. Uji Aktivitas <i>Plancitoxin</i>	37
4.5. Uji Lowry.....	40
4.6. Sodium Duodesil Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).....	43
BAB V KESIMPULAN	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN A	51
METODE LOWRY	51
LAMPIRAN B	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1. State of the art penelitian (1).....	21
Tabel 2. 2. State of The Art Penelitian (2).....	22
Tabel 3. 1. Uji Lowry.....	30
Tabel 4. 1. Tabel Nilai Serapan dan Konsentrasi DNA.....	35
Tabel 4. 2. Tabel Aktivitas <i>Plancitoxin</i>	40
Tabel 4. 3. Tabel Konsentrasi <i>Plancitoxin</i>	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1. Bintang laut <i>A.planci</i> (http://www.biolib.cz ,2011)	5
Gambar 2. 2. Ikatan yang diputus oleh enzim fosfolipase	9
Gambar 2. 3. Mekanisme kerja ekstraksi dengan garam amonium sulfat (Koelman 2005).....	14
Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian.....	23
Gambar 3. 2. Diagram alir preparasi sampel (Savitri dkk., 2011).....	26
Gambar 3. 3. Diagram alir Fraksinasi (Savitri dkk., 2011).....	27
Gambar 3. 4. Diagram alir uji aktivitas <i>plancitoxin</i> (Kunitz 1950).....	29
Gambar 3. 5. Uji Lowry	30
Gambar 4. 1. Duri <i>A.planci</i>	32
Gambar 4. 2. <i>Crude venom</i>	33
Gambar 4. 3. Racun <i>plancitoxin</i> yang berhasil diekstrak. (1) Fraksi 20 %, (2) Fraksi 40 %, (3) Fraksi 60 %, (4) Fraksi 80 %	37
Gambar 4. 4. Grafik Uji Aktivitas <i>Plancitoxin</i> . Substrat (◇ biru), <i>crude venom</i> (■ merah), F20 (▲ hijau), F40 (x ungu), F60 (* biru), F80 (● oranye).....	38
Gambar 4. 5. Kurva standar BSA	41
Gambar 4. 6. Hasil SDS-PAGE <i>Plancitoxin</i> . (1) Fraksi 80 %, (2) Fraksi 60 %, (3) Fraksi 40 %, (4) Fraksi 20 %, (5) cv, (6) Marker.....	44
Gambar 4. 7. Hasil SDS PAGE <i>Plancitoxin</i> penelitian sebelumnya. (1) dan (6) marker, (2) <i>plancitoxin</i> I yang tak tereduksi, (3) <i>plancitoxin</i> I yang tereduksi, (4) <i>plancitoxin</i> II yang tak tereduksi, (5) <i>plancitoxin</i> II yang tereduksi. (Shiomi dkk., 2004).....	45

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salah satu sebab rusaknya terumbu karang di perairan pantai dunia ditengarai berasal dari peledakan populasi dari bintang laut *Acanthaster planci*. Peledakan populasi bintang laut menjadi sebab karena *A. planci* mengonsumsi terumbu karang atau koral sebagai makanan utamanya. Sedianya binatang ini telah membuat kerusakan yang besar di kawasan Indo-Pasifik dalam empat dekade terakhir.

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

Dari sini, perlu dilakukan kontrol penanggulangan yang efektif untuk peledakan populasi *A. planci*. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan ialah dengan memberikan nilai tambah secara ekonomis dari bintang laut tersebut, sehingga biaya kontrolnya dapat diminimalisir. Peningkatan nilai tambah yang dilakukan salah satunya ialah dengan memanfaatkan racun yang terdapat dalam duri *A. planci*. Racun yang terdapat dalam duri bintang laut ternyata memiliki potensi yang besar di bidang obat-obatan, sehingga nilai tambah ekonomisnya dapat bertambah secara signifikan.

Kandungan racun terdiri dari *plancinin*, PLA-2, dan *plancitoxin*. *Plancitoxin* diketahui dapat membantu sel dalam proses degradasi kematian sel yang disebut dengan apoptosis (Shiomi dkk., 2004). Dari pernyataan tersebut dapat disimpulkan bahwa enzim tersebut berperan dalam “membunuh sel”.

Dengan potensi “membunuh” yang dimiliki, tentunya racun yang homolog DNase II mamalia ini diharapkan dapat berguna untuk berbagai bidang teknologi hayati, khususnya di bidang medis sebagai obat antikanker (S. Sugihara 1993). Pemurnian *plancitoxin* sebelumnya dilakukan prinsip kromatografi menggunakan *CM-Cellulose column* dalam FPLC (Shiomi dkk., 2004), sehingga biaya yang dibutuhkan pun relatif lebih mahal. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk dapat memurnikan *plancitoxin* (DNase) dari duri *A. planci* dengan cara yang lebih mudah. Selain itu, karena berhubungan dengan zat aktif biologis, dilakukan uji aktivitas dari DNase tersebut.

1.2. Perumusan Masalah

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

1. Apakah isolat *venom* yang dihasilkan masih mempunyai aktivitas enzim deoxyribonuklease?
2. Seberapa besarkah konsentrasi racun *plancitoxin* yang terisolasi dengan metode ini?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan ialah untuk menghasilkan isolat dan untuk mengetahui aktivitas isolat racun *plancitoxin* dari *Acanthaster planci*.

1.4. Batasan Masalah

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

1. Bagian tubuh yang digunakan ialah duri dari *A. Planci*.
2. Sampel akan diekstraksi dengan menggunakan metode fraksinasi.
3. Pelarut yang digunakan adalah garam ammonium sulfat.
4. Analisis kandungan protein dengan metode lowry.
5. Uji aktivitas *plancitoxin* dengan menggunakan metode Kunitz., 1950.
6. Uji kemurnian *plancitoxin* menggunakan Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

1.5. Sistematika Penulisan

Sistematika penulisan skripsi ini adalah:

BAB I : PENDAHULUAN

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

BAB II : TINJAUAN PUSTAKA

Berisi tinjauan mengenai pustaka terkait penelitian ini. Penjelasan terdiri dari penjelasan umum mengenai bintang laut *A. planci*: asal dan penyebarannya, taksonomi dan morfologi, pertumbuhan dan reproduksi, siklus hidup, serta ekologi. Penjelasan Tentang racun yang terkandung dalam bintang laut. Penjelasan tentang fraksinasi, serta pelarut yang digunakan. Bab ini juga memuat penjelasan tentang penelitian sebelumnya dan kaitannya dengan penelitian ini.

BAB III : METODE PENELITIAN

Menjelaskan langkah kerja yang akan dilakukan guna mengaplikasikan metode ekstraksi pelarut untuk perolehan protein dari *A.planci* dan uji kandungan proteinnya dengan metode lowry serta uji aktivitas *plancitoxin* yang diperoleh dengan metode Kunitz (1950) dan menguji tingkat kemurniannya dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN

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

BAB V : KESIMPULAN

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

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Acanthaster planci*

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

Klasifikasi ilmiah dari *Acanthaster planci* adalah :

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Echinodermata</i>
Kelas	: <i>Stelleroidea</i>
Orde	: <i>Valvatida</i>
Family	: <i>Acanthasteridae</i>
Genus	: <i>Acanthaster</i>
Spesies	: <i>Acanthaster planci</i> (Linnaeus 1758)



Gambar 2. 1. Bintang laut *A. planci* (<http://www.biolib.cz> ,2011)

Para peneliti menggunakan nama ‘COT’ kependekan dari ‘crown of thorns’, sebagai pengganti *A. planci*. Di tempat lain, *A. planci* mempunyai nama lokal ‘alamea’ (Tonga, Samoa), ‘bula’ (Fiji) dan ‘rusech’ (Palau).

Warna tubuh *A. planci* dapat bervariasi tergantung dari lokasinya. Di perairan Thailand dan Maladewa (*Maldives*) warna tubuh biru keunguan, di GBR berwarna merah dan kelabu, sedangkan di Hawaii berwarna hijau dan merah (Moran 1990). Di Indonesia, warna tubuh *A. planci* merah dan kelabu pada perairan Laut Jawa dan Laut Flores. Di Cocos Island dan Christmas Island (barat daya Jawa), Australia, terdapat dua macam warna *A. planci* yang menunjukkan tipe Samudra Pasifik dan Samudra Hindia (Hobbs and Salmond 2008).

2.2. Pertumbuhan dan Reproduksi

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

Bintang laut *A. planci* mempunyai kelamin yang terpisah (berkelamin tunggal), dengan pembuahan eksternal. Rasio kelamin biasanya 1:1 (Moran 1990).

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

Fekunditas atau jumlah telur yang dihasilkan betina tergantung pada ukuran atau berat tubuh betina. Betina pemijah biasanya berumur 2-3 tahun, atau ukuran diameter tubuhnya lebih dari 25 cm (CRC 2003). Betina yang dewasa mempunyai ukuran tubuh 500-4000 gram, yang memiliki fekunditas sekitar 4-65 juta telur (Moran 1990). Jumlah telur yang sangat besar memang diperlukan oleh kebanyakan invertebrata laut. Tingkat hidup yang rendah dapat diatasi jumlah telur yang sangat besar, sehingga larva yang selamat menjadi dewasa pun tidak sedikit. Telur *A. planci* berukuran 200 mikron, sedangkan sperma berukuran sekitar 1-2 mikron (Moran 1990). Ukuran telur dan sperma ini tidak banyak berbeda dengan ukuran umum gamet invertebrata laut.

2.3. Siklus Hidup

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

A. planci kemungkinan terjadi di tempat yang dalam karena pemangsaan karang oleh *A. planci* biasanya dimulai dari karang di tempat yang dalam.

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

2.4. Ekologi

Bintang laut *A. planci* merupakan penghuni terumbu karang yang alami. Anakan *A. planci* yang masih kecil hidup di antara pecahan karang di dasar terumbu. Mereka memakan alga berkapur yang tumbuh pada pecahan karang tersebut. Bintang laut *A. planci* yang berukuran kecil (40 cm) mencari makan pada siang hari (CRC 2003). Pada siang hari, *A. planci* kecil bersembunyi dari pemangsa di bawah karang meja atau di celah-celah terumbu. Separuh dari waktu hidup *A. planci* digunakan untuk makan, sehingga dampaknya terhadap terumbu karang dapat sangat besar ketika populasinya besar.

2.5. Dampak Pemangsaan

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

menurun, disamping penurunan laju rekrutmen dan kelulushidupan ikan-ikan kecil (Williams 1986).

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

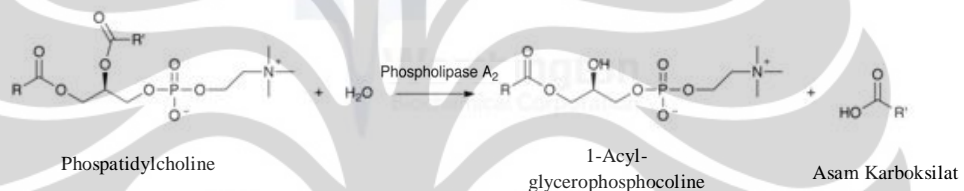
Terumbu yang sama dapat mendapat serangan *A. planci* secara berulang, dengan jeda waktu sekitar 15 tahun. Di Green Island, terumbu karang telah mengalami serangan *A. planci* yang serius pada tahun 1962, 1979 dan 1999/2000 (CRC 2003). Di Lizard Island, GBR, pemangsaan karang oleh *A. planci* yang terjadi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

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

2.6. Racun *Acanthaster planci*

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

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



Gambar 2. 2. Ikatan yang diputus oleh enzim fosfolipase

Phospholipase A2 memainkan peran penting pada hemolisis sekunder untuk efek eritrolisis pada membran sel darah merah dan menyebabkan nekrosis otot. *Phospholipase A2* merupakan enzim yang stabil terhadap panas hingga $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan mempunyai berat 15.000 dalton dengan pengujian menggunakan SDS-Page (Shiomi dkk., 1997).

Racun yang kedua ialah *plancinin*, *plancinin* adalah suatu peptide dimer berberat molekul rendah ($\text{Mr} = 7500$). Peptida ini mengandung ikatan disulfida yang sangat berguna pada sifat antikoagulannya (Karasudani dkk., 1996).

Plancinin bekerja dengan memperpanjang waktu aktivasi thromboplastin dan prothrombin, tetapi tidak memperpanjang waktu pembekuan thrombin. *Plancinin* menginhibisi aktivasi prothrombin oleh kompleks prothrombinase dan aktivasi factor X oleh factor intrinsic dan ekstrinsik kompleks tenase (Koyama dkk., 1998)

Komponen lainnya yang ada pada duri bintang laut ini ialah *plancitoxin*, protein yang homolog dengan DNase II pada sel mamalia. DNase merupakan

enzim yang bersifat asam, dan berada pada kondisi optimum pH 5-6. Aktivitas DNase ini dapat ditandai dengan kemampuannya dapat menghidrolisa dua rantai DNA menjadi sebuah oligonucleotida berantai pendek yang memiliki 3' grup posfat dibanding dengan grup hidroksil. DNase biasanya ditemukan dalam lisosom dan juga berada di nukleus serta berbagai saluran sekresi (urine) (Torriglia 2006).

Enzim DNase berperan dalam proses degradasi DNA yang berada dalam peristiwa kematian sel. Peristiwa kematian sel atau apoptosis merupakan peristiwa matinya sel yang esensial dalam perkembangan embrionik sel. Peristiwa ini ditandai dengan menyusutnya badan sel, rusaknya DNA internukleosom, yang diakhiri dengan pecahnya dan hancurnya membran sel. Mayat sel yang terbentuk dari peristiwa ini disebut dengan *apoptotic bodies*. Proses apoptosis dipengaruhi oleh dua enzim, yaitu enzim protease dan DNase. Enzim protease berperan dalam regulator (caspase), dan kemudian mengaktivasi dan memicu enzim lain untuk bergerak, salah satunya ialah DNase. DNase ini yang kemudian berperan dalam mendegradasi DNA menjadi *oligonucleosome* (Torriglia 2006).

2.7 Aplikasi Enzim Deoxyribonuklease di Bidang Medis

Dalam bidang medis, enzim deoxyribonuklease telah banyak digunakan sebagai obat terapi untuk mengobati penyakit *cystic fibrosis* (CF) pada balita. Penyakit ini membuat penderitanya mengalami kesulitan bernafas serta mengalami gangguan pada kelenjar ekskresi sekitar mulut. Terapi DNase digunakan untuk mengatasi gangguan pernafasan yang dialami oleh penderita penyakit.

Dewasa ini, penelitian terapi menggunakan enzim deoxyribonuklease telah diarahkan ke terapi untuk anti kanker. Dari penelitian sebelumnya, para penderita kanker diketahui ternyata mengalami defisiensi enzim deoxyribonuklease (Daoust dan Amano, 1963). Kekurangan enzim DNase inilah yang menyebabkan sel-sel kanker ganas berkembang karena bagian sistem pendegradasian selnya tidak dapat berjalan dengan baik. Oleh sebab itu, terapi kanker dengan menggunakan enzim DNase menjadi salah satu rekomendasi bagi para penderita kanker. S. Sugihara (1993) menerangkan bahwa terjadi penurunan yang signifikan pada jumlah sel kanker yang diberi pada tikus ketika tikus tersebut diberikan DNase.

Jumlah sel kanker yang berkurang signifikan menandakan bahwa enzim ini berpotensi untuk digunakan sebagai terapi anti kanker. Selain itu, enzim ini juga memberikan hasil yang efektif ketika diberikan vitamin C (untuk DNase 1) dan vitamin K3 untuk DNase yang bersifat asam (DNase 2) (Taper HS 2008).

2.8 Teknik – Teknik Isolasi Protein

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

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

2.8.1 Teknik Pemanasan Protein

Protein-protein dalam suatu organisme memiliki tingkat kestabilan terhadap suhu dan pH yang berbeda-beda. Ada protein-protein yang stabil pada suhu tinggi seperti protein-protein dalam bakteri termofilik dan ada pula yang mudah rusak akibat pemanasan. Perbedaan tingkat kestabilan suatu protein ditentukan oleh urutan asam amino-asam amino penyusun protein dan interaksi-interaksi intramolekulnya. Fungsi suatu enzim akan dipertahankan selama struktur protein globular tidak berubah. Ada tiga jenis interaksi non kovalen yang

berhubungan dengan tingkat kestabilan struktur protein tersier. Pertama, yaitu ikatan hidrogen antara gugus-gugus rantai samping residu asam amino pada simpul yang berdekatan di dalam rantai. Kedua, yaitu gaya tarik menarik ionik antara gugus-gugus rantai samping yang muatannya berlawanan. Yang ketiga, yaitu interaksi hidrofobik. Gugus-gugus rantai hidrofobik dari beberapa residu asam amino menghindari lingkungan air dan cenderung untuk berkelompok bersama-sama di bagian dalam struktur globular yang terlindung dari air. Interaksi-interaksi hidrofobik tersebut akan melipat molekul protein membentuk struktur yang paling stabil dengan energi bebas yang paling kecil. Jika suatu protein yang tidak tahan panas berada dalam lingkungan yang suhunya tinggi, maka lipatan protein yang hidrofobik akan membuka (terdenaturasi). Protein-protein yang telah mengalami pembukaan lipatan akan saling berinteraksi satu sama lain membentuk suatu agregat dan akhirnya akan mengendap (Lehninger 1977).

2.8.2 Ion Exchange Chromatography

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

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

2.8.3 Gel Filtration

Gel filtrasi dilakukan dengan menggunakan butiran berpori. Kolom yang dibangun dengan butiran tersebut akan mempunyai dua pengukuran volume cairan, volume eksternal, yaitu cairan diantara pori, dan volume internal, yaitu cairan yang berada diantara pori-pori butiran. Molekul besar hanya melewati volume eksternal ketika molekul kecil melewati volume internal dan eksternal. Campuran protein dilewatkan melalui bagian atas kolom gel filtrasi dan dibiarkan perkolasi melewati kolom. Yang terpenting pada gel filtrasi adalah diameter pori yang dapat memasuki volume internal dan diameter hidrodinamik molekul protein. Protein yang mempunyai diameter hidrodinamik kecil yang sama dengan diameter rata-rata pori-pori butiran akan memasuki volume internal dan akan menjadi bagian matriks gel. Protein yang mempunyai diameter hidrodinamik besar tidak akan memasuki volume internal dan akan keluar dari kolom (Deutscher 1990).

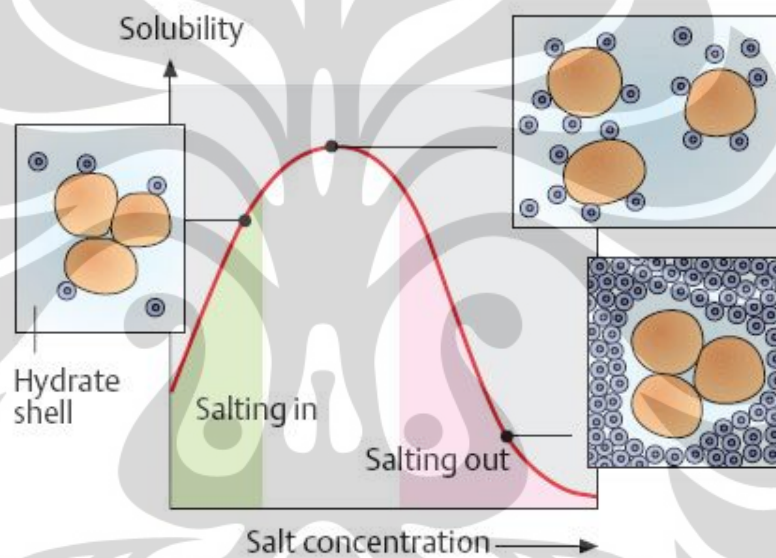
2.8.4 Dialisis

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

2.8.5 Fraksinasi

Fraksinasi tergolong ke dalam metode pemurnian yang telah lama digunakan. Cara ini mudah dan cukup efektif dalam memisahkan campuran protein ekstrak kasar. Fraksinasi dilakukan atas dasar perbedaan kelarutan protein-protein di dalam campuran. Garam netral, seperti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ditambahkan ke

dalam larutan protein dalam jumlah tertentu. Pengaruh garam netral terhadap kelarutan protein merupakan fungsi dari kekuatan ioniknya, suatu ukuran konsentrasi dan jumlah muatan listrik sumbangan kation dan anion garam. Efek *salting-in* disebabkan oleh kecenderungan perubahan gugus-gugus rantai samping dalam protein yang terdisosiasi untuk mengion. Tetapi bila kekuatan ionik meningkat lebih lanjut, kelarutan protein mulai menurun. Pada kekuatan ionik yang cukup tinggi, protein akan mengendap dengan sempurna (*salting-out*). Garam pada konsentrasi tinggi menarik molekul air di permukaan molekul protein sehingga mengurangi kelarutan protein tersebut (Deutscher 1990).



Gambar 2. 3. Mekanisme kerja ekstraksi dengan garam amonium sulfat (Koelman 2005)

2.8.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode pemisahan zat-zat aktif dari suatu substansi tertentu. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses umum dari ekstraksi dapat dibagi menjadi tiga yaitu pelarutan, difusi dan matriks. Pertama, komponen yang terlarut (*solute*) harus dapat terlarut di dalam pelarut. Kedua, *solute* harus dapat berpindah secara cepat, baik melalui difusi atau

mekanisine lain, dari bagian dalam matriks tempat solute berada. Proses difusi tersebut dapat berupa difusi normal dari solute seperti dalam polimer, atau melibatkan difusi dalam fluida melalui pori-pori matriks. Waktu terjadinya difusi akan bergantung kepada koefisien difusi dan bentuk serta ukuran dari matriks atau partikel matriks (Deutscher 1990).

Dari semua hal itu, dimensi atau ukuran memegang peranan yang paling penting. Ketiga, solute harus dilepaskan oleh matriks. Proses terakhir ini dapat melibatkan proses desorpsi dari pusat matriks, melewati dinding sel, atau keluar dari bentuk yang mengurungnya, seperti pada rantai polimer. Proses ini dapat berlangsung secara lambat dan pada beberapa kasus, komponen yang ingin diekstrak terkunci dalam struktur matriks. Biasanya hal ini disebabkan oleh kehadiran air yang bersifat tidak larut dan dapat menghalangi komponen yang ingin diekstrak. Oleh karena itu, terkadang diperlukan proses pengeringan sebelum dilakukan proses ekstraksi.

2.8.6.1 Ekstraksi *Maserasi*

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

2.8.7 Metode Pemisahan dengan Membran

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

yang tidak melewati membran) dan *permeate* (bagian dari campuran yang melewati membran).

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

- Porous membrane. Pemisahan berdasarkan atas ukuran partikel dari zat-zat yang akan dipisahkan. Hanya partikel dengan ukuran tertentu yang dapat melewati membran sedangkan sisanya akan tertahan.
- Non-porous membrane. Dapat digunakan untuk memisahkan molekul dengan ukuran yang sama, baik gas maupun cairan. Pada *non-porous membrane*, tidak terdapat pori seperti halnya *porous membrane*. Perpindahan molekul terjadi melalui mekanisme difusi. Jadi, molekul terlarut di dalam membran, baru kemudian berdifusi melewati membran tersebut.
- Carrier membrane. Pada metode ini, *carrier molecule* yang mentransportasikan komponen yang diinginkan untuk melewati membran. Carrier molecule memiliki afinitas yang spesifik terhadap salah satu komponen sehingga pemisahan dengan selektifitas yang tinggi dapat dicapai.

2.9 Uji Kadar Protein Lowry

Uji protein Lowry adalah uji biokimia yang menentukan total kandungan protein di dalam suatu larutan. Konsentrasi total protein ditunjukkan oleh perubahan warna larutan sampel secara proporsional dengan konsentrasi protein, yang kemudian dapat diukur dengan menggunakan teknik kolorimetri. Ini adalah nama untuk ahli biokimia Oliver H. Lowry yang mengembangkan teknik di tahun 1940. Teknik ini termasuk yang paling sering digunakan dalam makalah biologi. Metode ini menggabungkan reaksi ion tembaga dengan ikatan peptida dalam kondisi basa (hasil uji Biuret) dengan residu oksidasi aromatik protein. Metode Lowry ini paling baik digunakan dengan protein konsentrasi 0,01-1,0 mg/mg dan didasarkan pada reaksi Cu^{2+} yang dihasilkan oleh oksidasi ikatan peptida dengan pereaksi Folin Ciocalteu (campuran asam fosfotungstat dan asam fosfomolibdat pada pereaksi Folin Ciocalteu). Mekanisme reaksi belum dipahami dengan baik,

tetapi melibatkan reduksi reagen Folin dan oksidasi residu aromatik (terutama triptofan juga tirosin). Konsentrasi pereaksi Folin yang tereduksi diukur dengan absorbansi 750 nm. Sebagai hasilnya, konsentrasi total protein dalam sampel dapat disimpulkan dari konsentrasi residu triptofan dan tirosin yang mengurangi reagen Folin. Kerugian dari metode ini adalah waktu inkubasi yang panjang dan sering ada gangguan dengan buffer yang umum digunakan. Metode ini juga dikenakan untuk variasi protein-protein karena hubungan intensitas warna tergantung pada isi tirosin dan triptofan di dalam protein.

2.10 Sodium Dodesil Sulfat-Gel Poliakrilamid (SDS-PAGE)

Protein biasanya memiliki muatan positif atau negatif yang mencerminkan campuran muatan asam amino yang dikandungnya. Bila medan listrik diaplikasikan pada larutan yang mengandung molekul protein, protein akan bermigrasi dengan laju yang tergantung pada muatan netto, bentuk, dan ukurannya. Teknik tersebut adalah elektroforesis dan dipergunakan untuk memisahkan campuran protein, baik pada larutan bebas maupun pada larutan dengan matriks berpori solid seperti pati (Alberts dkk., 1994).

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. Agen reduksi seperti merkaptoetanol ditambahkan untuk mengurai pautan S-S protein sehingga semua konstituen polipeptida pada molekul multisubunit dapat dianalisis secara terpisah (Alberts dkk., 1994).

Tiap molekul protein mengikat sejumlah besar molekul deterjen bermuatan negatif yang menyelubungi muatan intrinsik protein dan menyebabkannya bermigrasi menuju elektroda positif ketika dikenai tegangan

listrik. Protein yang berukuran sama cenderung berperilaku identik karena (Alberts dkk., 1994) :

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

SDS-PAGE merupakan prosedur yang lebih baik daripada analisis protein lainnya karena dapat dipergunakan untuk memisahkan semua jenis protein, termasuk protein yang tidak dapat larut dalam air. Protein membran, komponen protein sitoskeleton, dan protein yang merupakan bagian agregat molekul besar dapat pula di-resolvasi. Metode ini memisahkan polipeptida berdasarkan ukurannya sehingga metode ini juga memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit dari setiap kompleks protein (Alberts dkk., 1994).

Protein spesifik dapat diidentifikasi setelah fraksinasi baik pada gel satu dimensi maupun pada gel dua dimensi dengan mengekspose semua protein yang tersedia pada antibodi spesifik yang telah dipasangkan dengan isotop radioaktif, dengan enzim yang mudah dideteksi, ataupun dengan pewarna fluoresen. Untuk kemudahan, hal ini biasanya dilakukan setelah semua protein yang dipisahkan ditransfer pada helaian kertas nitroselulosa. Metode deteksi protein disebut *western blotting* (Alberts dkk., 1994).

2.11. *State of The Art Penelitian*

Penelitian tentang racun bintang laut *Acanthaster planci* dilakukan pertama kali oleh Shiomi dkk., 1984. Pada penelitian tersebut, ekstrak kasar dari duri bintang laut berhasil diisolasi untuk kemudian diuji efeknya. Dari sini, diketahui bahwa *crude venom* yang dihasilkan membuat efek hemolitik pada eritrosit. Pengekstrakan dilakukan dengan cara homogenisasi dengan fosfat bufer, dan pengukuran kadar protein diukur dengan metode Lowry dengan bovine serum albumin sebagai standar. Penelitian selanjutnya merupakan identifikasi racun yang terdapat pada bintang laut. Pada tahun 1997, Shiomi dkk. berhasil mengidentifikasi salah satu kandungan racun yang terdapat pada duri bintang laut, yaitu phospholipase AII (PLA 2). PLA 2 merupakan protein berberat molekul sebesar 12-15 kDa, memiliki pH optimum pada keadaan basa (pH = 9,0), serta bekerja dengan menghidrolisis ikatan *sn-2* pada *phospholipid*. Pemurnian dilakukan dengan dialisis menggunakan fosfat bufer pH 7 lalu diaplikasikan ke dalam kolom CM-cellulose (2 x 48; Brown, Berlin, U.S.A.). Fraksi yang aktif diendapkan dengan ammonium sulfat hingga 80% konsentrasi akhir, lalu dimasukkan ke dalam kolom *Phenyl Sepharose* CL-4B (2 x 40 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden). Pengukuran protein menggunakan metode Lowry, menggunakan bovine serum albumin sebagai standar. Untuk mengetahui aktivitas PLA, dilakukan uji aktivitas hemolitik. Untuk metode pemurnian PLA 2 yang lebih cepat, Savitri dkk., 2011 telah melakukan isolasi serta purifikasi enzim dengan menggunakan metode sonikasi, sentrifugasi, serta fraksinasi garam ammonium sulfat. Dengan metode ini, didapatkan enzim dengan nilai *yield* sebesar 1,4%.

Racun kedua diidentifikasi oleh Karasudani dkk., 1996. Racun kedua yang berupa faktor antikoagulan yang dimiliki oleh bintang laut *Acanthaster planci*. Faktor tersebut ialah *plancinin*, sebuah peptida dimer yang memiliki berat molekul 7500 Dalton. Pemurnian *plancinin* dilakukan dengan dialisis, yang dilanjutkan dengan memasukkan sampel ke dalam DEAE-Cellulose column. Fraksi yang memiliki sifat antikoagulan kemudian dikonsentrasikan dengan ultrafiltrasi (Amicon 10, Japan Grace, Tokyo) yang disambung dengan Sephadex G-50. Uji aktivitasnya dilakukan dengan mengujikan ekstrak kepada tikus. Racun ketiga yang berhasil diidentifikasi ialah *plancitoxin*.

Plancitoxin yang homolog dengan enzim DNase merupakan *lethal factor* yang dikandung oleh racun bintang laut (Shiomi dkk. 2004). Pemurnian racun dilakukan dengan menggunakan DEAE *Cellulose column* dan *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC).



Tabel 2. 1. State of the art penelitian (1)

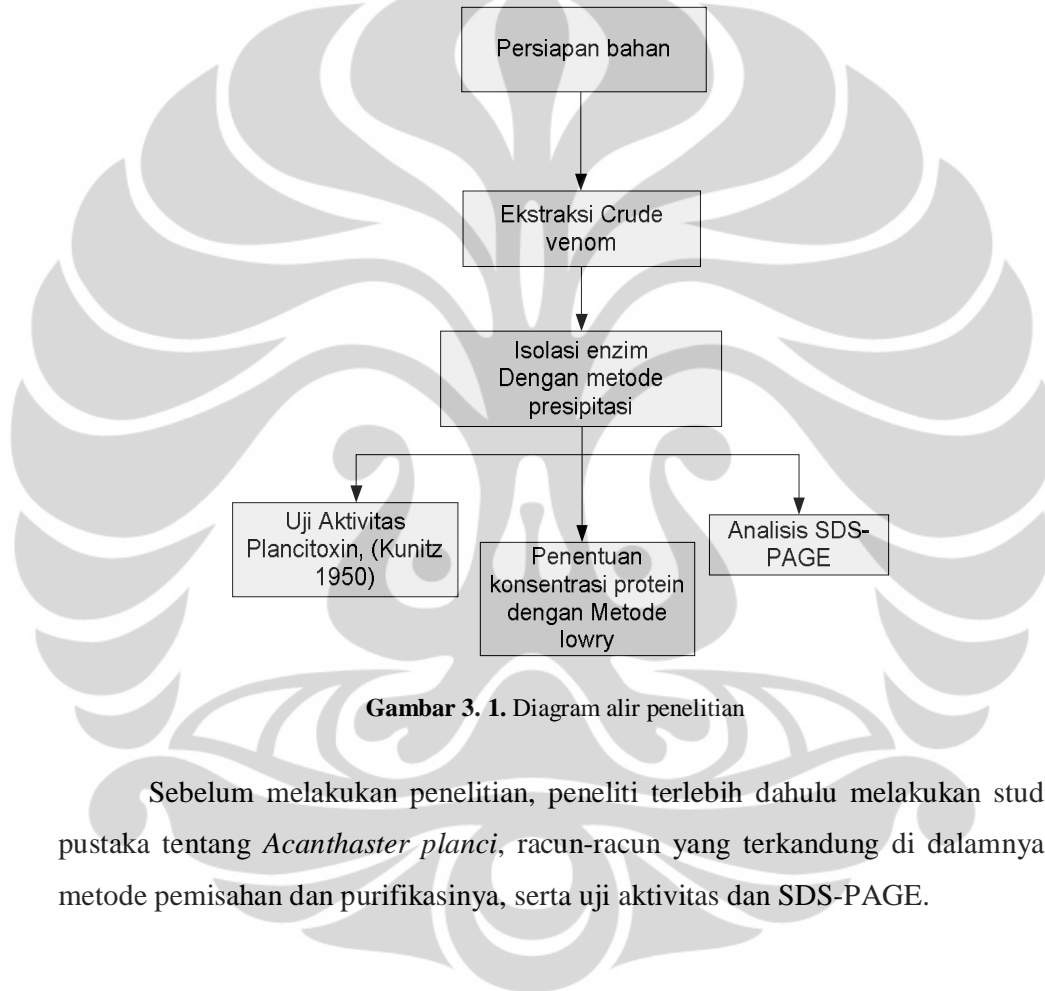
	Racun Duri <i>Acanthaster planci</i>			
	Aktivitas Biologis	PLA2	Plancitoxin	Plancinin
Karasudani (1996)	Diketahui bahwa racun duri <i>A. planci</i> menyebabkan kontraksi otot pada tikus			
Karasudani (1996)				Pemurnian Antikoagulan yang berada pada racun duri <i>A.planci</i>
Koyama (1998)				Analisis situs aktif antikoagulan racun <i>A.planci</i>
Ota (2005)		Melakukan kloning molekular pada PLA2		
Ota (2006)			Aktivitas Hepatoksisitas pada plancitoxin I pada racun <i>A.planci</i>	
Ota (2010)			Karakterisasi Struktural plancitoxin	
Shiomi (1988)	Ditemukan faktor penyebab kematian (lethal factor) pada racun <i>A.planci</i>			

Tabel 2. 2. State of The Art Penelitian (2)

	Racun Duri <i>Acanthaster planci</i>			
	Aktivitas Biologis	PLA2	Plancitoxin	Plancinin
\Shiomi (1997)		Pemurnian dan Karakterisasi PLA2 racun <i>A.planci</i>		
Shiomi (2004)			Pemurnian dan Identifikasi plancitoxin yang homolog dengan Dnase II pada racun <i>A.planci</i>	
Savitri (2011)		Pemurnian Parsial PLA2 dengan metode fraksinasi amonium sulfat		
Penelitian ini (2012)			Pemurnian Parsial Plancitoxin dengan metode fraksinasi amonium sulfat	

BAB III METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Rekayasa Bioproses Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, Depok dan Laboratorium Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong. Diagram alir penelitian ekstraksi *plancitoxin* ditunjukkan pada Gambar 3.1 di bawah ini :



Gambar 3. 1. Diagram alir penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti terlebih dahulu melakukan studi pustaka tentang *Acanthaster planci*, racun-racun yang terkandung di dalamnya, metode pemisahan dan purifikasinya, serta uji aktivitas dan SDS-PAGE.

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Bahan Kimia

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

Pembuatan Ekstrak DNA dari darah :

1. Sukrosa 0,32 M
2. Buffer Tris-HCl.

3. MgCl_2 5 mM
4. 0,75% Triton X – 100
5. Na_2EDTA 4 mM
6. NaCl 100 mM
7. Aquabides
8. 10% SDS
9. NaCl 5,3 mM
10. Enzim Proteinase K (20 mg/ml)

Pembuatan fosfat bufer pH 7.0 :

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

Pembuatan Ekstrak Protein :

1. Garam $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2. Bufer fosfat pH 7.

Penentuan Kadar Protein Lowry :

1. *Bovine Serum Albumin* (BSA) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
2. dH_2O
3. NaOH 0,1N
4. CuSO_4 1% ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,56 gr + dH_2O)
5. NaK-Tartrat 1% (NaK-Tartrat 2,37 gr + dH_2O)
6. Na_2CO_3 2% (NaOH 2 gr + Na_2CO_3 10 gr + dH_2O)
7. Larutan Biuret (5 ml larutan CuSO_4 1% dan larutan 5 ml NaK-Tartrat 1% dimasukkan ke dalam 500 ml larutan Na_2CO_3 2%)
8. Reagen Fenol Folin Ciocalteu 1N

Uji Aktivitas *plancitoxin*

1. DNA darah manusia 15 μl (2 mg/ml)
2. Larutan buffer tris-HCl 75 mM (pH 7,2)

Bahan-bahan SDS-PAGE

1. Aquades
2. Akrilamid 29,2 gr
3. (bis)akrilamid

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

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah sebagai berikut :

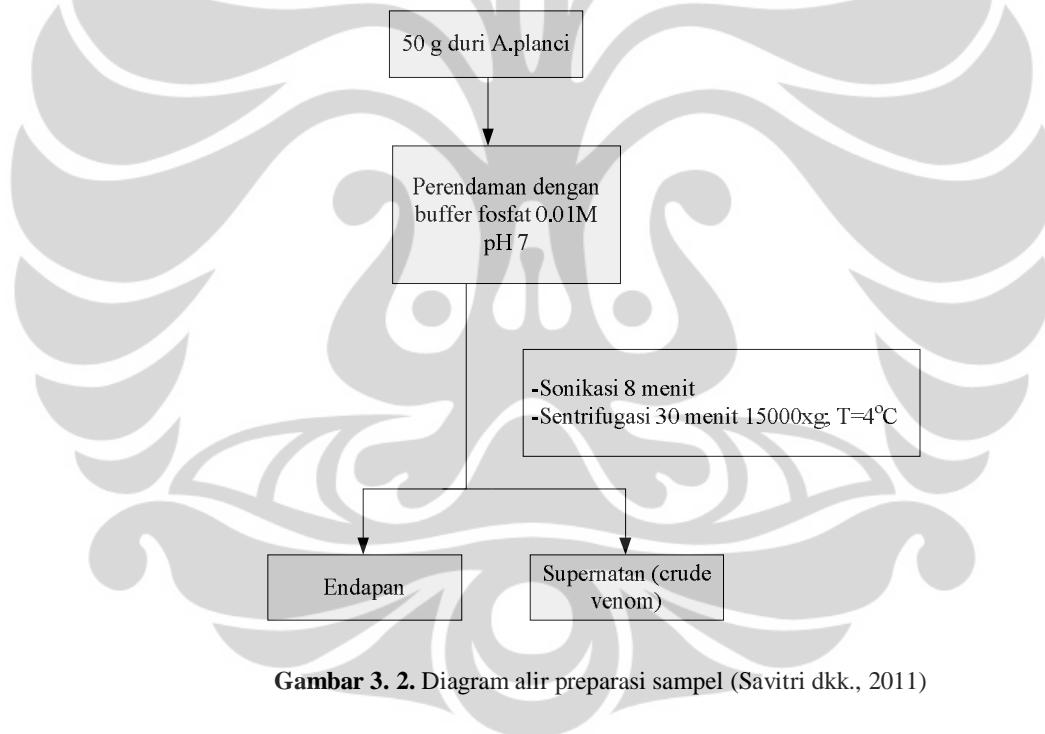
1. Tabung reaksi
2. Beaker glass
3. Vortex mixer
4. SDS-PAGE
5. Agarose Gel Electrophoresis
6. Pipet tetes
7. Pipet ukur
8. Mikropipet
9. Labu ukur
10. Gelas ukur
11. Neraca massa
12. Spatula
13. Termometer
14. Waterbath
15. Refrigerasi sentrifuse
16. Sonikator
17. Spektrofotometer

3.2 Preparasi Sampel Protein Enzim

Langkah selanjutnya adalah preparasi bahan dan alat. Spesimen *A. planci* diambil dari beberapa tempat, yaitu :

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

Lalu spesimen disimpan dalam lemari es suhu -20°C sampai digunakan. Duri dari *A. planci* digunting dan dikumpulkan. Metode preparasi sampel ini dilakukan berdasarkan metode Savitri dkk., (2011).

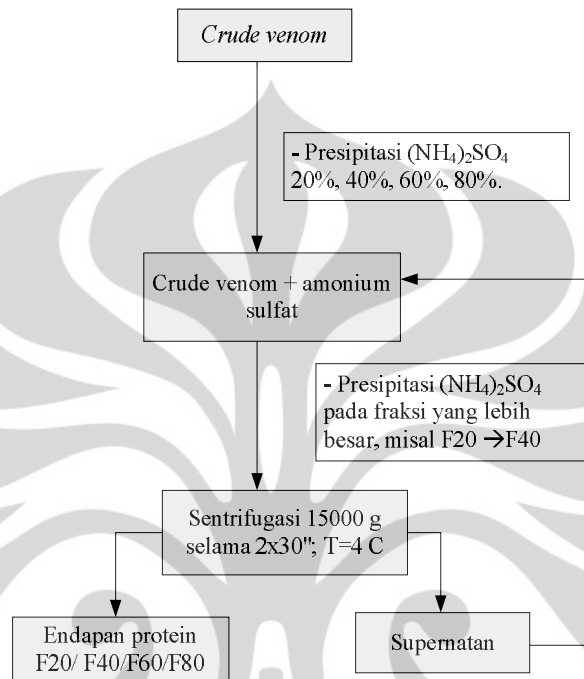


Gambar 3. 2. Diagram alir preparasi sampel (Savitri dkk., 2011)

Sampel duri yang telah dikumpulkan (50 gr) direndam dalam bufer fosfat 0.01 M, pH 7.0 sebanyak 100 ml dan lalu dihomogenisasi dengan cara sonikasi. Semua dilakukan dalam suhu 4°C . Kemudian sentrifuge dengan kecepatan 15.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C untuk dipisahkan pengotornya. Supernatannya digunakan untuk tahap berikut sedangkan endapan yang dihasilkan dapat dibuang.

Supernatan yang didapatkan dari percobaan ini, dapat dikatakan sebagai *crude venom A.planci*.

3.3 Fraksinasi



Gambar 3. 3. Diagram alir Fraksinasi (Savitri dkk., 2011)

Crude venom mulai diendapkan protein enzimnya dengan garam ammonium sulfat secara bertahap (fraksinasi) 20 % (F20), 40 % (F40), 60 % (F60), dan 80 % (F80) menurut derajat kelarutannya.

Setiap pengendapan dilakukan menggunakan *magneticstirrer* dan wadah sampel direndam dalam es supaya terjaga suhunya. Pemisahan endapan dilakukan dengan refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 2 X 30 menit. Endapan hasil sentrifuse masing-masing fraksi dilarutkan dalam bufer fosfat 0,01 M, pH 7,0, sebanyak 2ml.

3.3 Ekstraksi DNA dari Darah

DNA diperlukan sebagai substrat dalam melakukan uji aktivitas *plancitoxin* yang telah diekstrak. Aktivitas *plancitoxin* dapat diukur dengan jumlah aktivitas *plancitoxin* dengan DNA sebagai substrat. DNA yang diperlukan berasal dari mamalia, karena *plancitoxin* memiliki homologi dengan DNase II

yang dimiliki oleh mamalia. Oleh sebab itu, darah manusia dipilih dengan dasar bahwa sampel lebih mudah digunakan.

Ekstraksi DNA dilakukan dengan protocol yang disusun oleh Laura Lee Bodram (Bodram, 2004). Ekstraksi dilakukan menggunakan beberapa larutan, yaitu reagen A (sukrosa 0,32 M, tris HCl 10mM, MgCl₂ 5 mM, dan Triton x-100 0,75%), dan reagen B (tris HCl 20 mM, Na₂EDTA 4 mM, dan NaCl 100 mM).

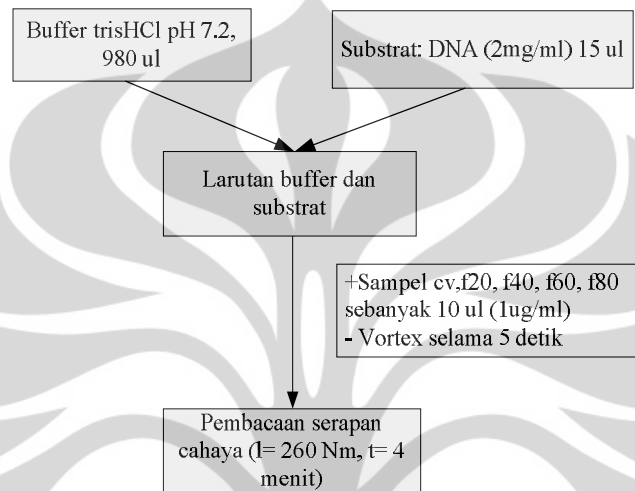
Satu volume reagen A ditambahkan ke dalam satu volume darah dan dua volume aquabides dingin untuk kemudian divortex dan diinkubasi dalam es selama 2-3 menit. Larutan hasil inkubasi kemudian disentrifuge pada 3500 rpm selama 15 menit pada suhu 4 C. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan endapan kemudian ditambahkan dengan 2 ml reagen A dan 6 ml aquabides, disentrifuge kembali pada kecepatan dan waktu yang sama, prosedur ini diulangi hingga pellet yang dihasilkan berwarna krem keputih-putihan.

Supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang dan endapan disimpan. Endapan diresuspensi kembali dengan 5 ml reagen B dan 500 µl SDS 10% dan 50 µl proteinase K. Larutan kemudian diinkubasi dengan menggunakan waterbath (55 C) selama 120 menit. Larutan hasil inkubasi didiamkan dahulu hingga mencapai suhu kamar lalu ditambahkan 4 ml NaCl 5,3 M. Larutan divortex lalu disentrifuge pada kecepatan 4500 rpm selama 15-20 menit dalam suhu 4 C. Supernatannya kemudian dipisahkan dengan endapan. Supernatant yang telah dipisahkan dipresipitasi dengan menggunakan isopropanol hingga muncul DNA. DNA yang ada dipindahkan ke dalam tabung mikrofuge lalu dicuci dengan menggunakan etanol. Resuspensi DNA dengan menggunakan 300 – 400 µl tris HCl pH 8,5. Larutan resuspensi kemudian dibiarkan semalaman pada suhu kamar agar DNA yang dihasilkan dapat larut dengan sempurna. DNA kemudian disimpan dalam kulkas bersuhu 4 C.

3.4 Uji Aktivitas *Plancitoxin*.

Uji aktivitas DNase pada *plancitoxin* 1 dilakukan sesuai dengan metode Kunitz (1950) yang telah dimodifikasi dengan menggunakan DNA mamalia (darah manusia) sebagai substrat. 10 µl (1 µg/ml) larutan ekstrak *plancitoxin*, dicampurkan dengan 15 µl larutan substrat (2 mg/ml), serta 980 µl 75 mM Tris-

HCl buffer (pH 7,2). Larutan kemudian diukur kenaikan absorbansinya pada panjang gelombang sebesar 260 nm selama 4 menit.. Data yang didapatkan berupa aktivitas dari *plancitoxin*, dengan mengambil nilai maksimum seratus persen dari aktivitasnya. Kontrol negatif dilakukan dengan mencampurkan substrat dengan buffer, tanpa enzim.



Gambar 3. 4. Diagram alir uji aktivitas *plancitoxin* (Kunitz 1950)

3.5 Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Pengujian kadar protein dengan metode Lowry menggunakan protein standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebanyak 200 $\mu\text{g/ml}$ dicampurkan seperti tabel dibawah sehingga diperoleh konsentrasi yang bervariasi antara 20-100 mg dalam larutan standar. Sementara blanko hanya diisi dengan 1 ml akuades. Baik larutan standar, blanko, dan sampel nantinya akan dicampurkan dengan 5 ml larutan biuret. (dibuat dari 1 ml larutan CuSO_4 1 % (b/v) dan 1 ml larutan NaK-Tartrat 1 % (b/v) dicampurkan ke dalam 100 ml larutan natrium karbonat 2 % (b/v) dalam NaOH 0,1N) serta 0,5 ml larutan reagen Folin Ciocalteu 1N. Rentang waktu inkubasi setelah mencampurkan larutan biuret adalah 10 menit. Setelah menit ke-10 maka Folin ditambahkan lalu dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya larutan diinkubasi kembali selama 30 menit. Pada menit ke-30 serapan masing-masing larutan diukur dengan spektro pada panjang gelombang 750 nm.

Tabel 3. 1. Uji 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
Akuades (ml)	1	1,2	1	0,8	0,5	0,2	-		0,02
Biuret (ml)	5								
Folin (ml)	0,5								

Hasil pembacaan absorbansi kemudian diplot ke dalam kurva linear untuk menghasilkan persamaan garis $y = mx + c$. Nilai y merupakan nilai absorbansi sampel dan nilai x merupakan jumlah konsentrasi protein dalam satuan μg .

**Gambar 3. 5.** Uji Lowry

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

Plate pembentuk gel disusun seperti petunjuk yang diberikan. Gel pemisah dibuat dengan cara menyiapkan tabung polipropilen 50 ml. Sebanyak 3.125 ml stok akrilamid dimasukkan dalam tabung, kemudian sebanyak 2.75 ml 1M Tris-pH 8.8 juga dimasukkan. Akuabides dimasukkan sebanyak 1.505 ml. SDS 15 % kemudian dimasukkan sebanyak 75 ml. Sebanyak 6.5 ml TEMED dimasukkan, kemudian tabung ditutup dan digoyang secara perlahan. APS 10 % dimasukkan sebanyak 75 ml, tabung. Larutan segera dituang ke dalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara),

hingga batas yang terdapat pada plate. Akuades perlahan ditambahkan di atas larutan gel dalam *plate* sehingga permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan di antara batas air dan gel yang terbentuk). Air yang menutupi gel pemisah selanjutnya dibuang. Bila gel pemisah telah memadat, gel penumpuk 3 % disiapkan dengan cara yang sama, tetapi dengan volume larutan yang meliputi : 30 % *acrylamide-bis* sebanyak 0.45 ml, 1 M Tris-pH 6.8 sebanyak 0.38 ml, akuabides sebanyak 2.11 ml, 10 % SDS sebanyak 30 ml, TEMED sebanyak 5 ml, dan 10 % APS sebanyak 30 ml. Setelah gel penumpuk dimasukkan, maka selanjutnya sisiran diletakkan di atasnya.

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

Perangkat elektroforesis dihubungkan dengan *powersupply* untuk memulai pemisahan. Pemisahan dilakukan pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai *trackingdye* mencapai 0.5 cm dari dasar gel. Bila pemisahan telah selesai, elektrodabuffer dituang dan gel diambil dari *plate*.

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

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Ekstraksi Racun *A.planci*

Penelitian ini terbagi menjadi tiga bagian, yaitu tahapan ekstraksi racun, tahapan isolasi enzim, serta tahapan terakhir yakni tahapan pengujian fraksi-fraksi enzim yang telah berhasil diisolasi.

Tahapan penelitian yang pertama kali dilakukan ialah tahapan preparasi sampel. Sampel berupa duri bintang laut *A.planci* yang telah digunting terlebih dahulu ditimbang sebanyak 50 gram kemudian ditambahkan buffer fosfat dengan pH 7,0 sebanyak 100 ml. Buffer ini bertujuan untuk menjaga kondisi enzim agar berada dalam pH netral, karena seperti yang telah diketahui bahwa enzim dapat rusak dan tidak berfungsi secara optimal karena pH yang tidak stabil. Selain itu, enzim *plancitoxin* ini juga memiliki aktivitas tertinggi pada keadaan pH yang netral (Shiomi dkk., 1988). Selain pH, faktor yang juga perlu dikontrol ialah suhu, suhu dijaga agar berada dalam suhu rendah (dalam penelitian ini suhu berada pada angka 4 °C) agar tidak ada aktivitas dari mikroorganisme atau enzim lain yang menyebabkan enzim rusak.



Gambar 4. 1. Duri *A.planci*

Selanjutnya duri disonikasi menggunakan *ultrasonic homogenizer*. Sonikasi merupakan metode yang menggunakan suara sebagai energi untuk menghancurkan suspensi dari vesikel multilamellar yang besar (LMV), sebuah ruang dalam sel yang dikelilingi oleh membran, menjadi vesikel yang lebih kecil. Proses ini diperlukan karena molekul protein ada di dalam sel, dan kemungkinan

berada di dalam bagian yang lebih kecil lagi, yaitu organel sel, sehingga perlu dilakukan sebuah usaha untuk memecah sel dan organel agar enzim dapat keluar. Sonikasi mengandalkan energi gelombang yang menyebabkan proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut ke dalam dinding sel (Ashley dkk., 2001) yang mengakibatkan percepatan waktu kontak antara sampel dengan sel pelarut. Sampel direndam dalam es selama proses sonikasi. Pendinginan dibutuhkan untuk mencegah peningkatan panas (Koelman dan Roehm, 2005).

Racun hasil sonikasi disentrifugasi selama 30 menit dalam kondisi kecepatan 15.000 g dan suhu 4 °C untuk memisahkan pengotor-pengotor yang muncul saat sel-sel duri terpecah dalam metode sonikasi. Sampel berupa supernatant hasil dari metode sentrifugasi inilah yang disebut dengan *crude venom* (cv). *Crude venom* yang dihasilkan berwarna oranye bening yang menandakan bahwa pengotor yang ada telah berhasil dipisahkan, dan racun cv dapat digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya.



Gambar 4. 2. *Crude venom*

4.2. Isolasi DNA sebagai Substrat

Satu langkah preparasi lainnya yang dilakukan ialah menyiapkan sampel untuk uji aktivitas *plancitoxin*. Sesuai dengan yang ada di protokol, sampel yang digunakan ialah DNA yang berasal dari mamalia. Hal ini dikarenakan *plancitoxin* memiliki kesamaan struktur serta fungsi dengan DNase II mamalia, yang berfungsi untuk memecah DNA. DNA ini kemudian digunakan sebagai substrat

proses uji aktivitas *plancitoxin*. DNA didapatkan dengan melakukan ekstraksi DNA darah dengan menggunakan metode presipitasi garam dan isopropanol (Bodram 2010). Darah dipilih sebagai bahan karena darah merupakan jenis sampel yang mudah didapat, serta tidak rumit dalam proses ekstraksinya.

Pada proses presipitasi ini, sel darah diendapkan terlebih dahulu dengan cara mencampurkan darah dengan reagen A serta aquabides dingin. Fungsi reagen A dan aquabides selain itu juga untuk mencuci endapan darah agar berwarna krem keputih-putihan. Kemudian sel darah dipecah dengan menggunakan reagen B, SDS 10 %, dan enzim pengurai protein, proteinase K. Proses ini memerlukan waktu yang cukup panjang, yakni dua jam melalui inkubasi dengan menggunakan *waterbath* bersuhu 55 °C. Waktu yang panjang diperlukan agar enzim dapat bekerja optimum untuk reaksi penguraian protein sel darah dan juga reagen B dan SDS 10 %. Untuk mengeluarkan DNA dari dalam sel yang telah pecah, digunakan NaCl dengan konsentrasi 5,3 M.

Hasil dari tahapan ini hanya menyisakan DNA di dalam larutan. DNA yang tertinggal lalu dipresipitasi dengan menggunakan isopropanol. DNA merupakan senyawa yang sangat polar, yang disebabkan oleh adanya fosfat yang bermuatan tinggi. Tingkat polaritasnya yang tinggi menyebabkan DNA mudah larut dalam air, yang memiliki tingkat kepolaran sama. Sedangkan etanol/isopropanol memiliki tingkat polaritas yang lebih rendah, dan dapat menghilangkan kepolaritasan yang dimiliki oleh air. Bila sejumlah etanol/isopropanol ditambahkan, maka tingkat kepolaran air akan rusak, sehingga tingkat kelarutan DNA pun akan hilang dan DNA pun terpresipitasi. Isopropanol digunakan sebagai presipitan dibandingkan dengan etanol karena memiliki tingkat efektivitas yang lebih tinggi (polaritas isopropanol lebih rendah dibanding dengan etanol). Isopropanol juga harus dalam keadaan dingin agar DNA tetap dalam keadaan segar. Selain itu, untuk alasan yang sama, proses ekstraksi DNA dari sel darah dilakukan dalam suhu 4 °C.

DNA tampak seperti benang berwarna keputih-putihan yang mengambang di dalam larutan. DNA tersebut kemudian diambil dan kemudian dicuci dengan etanol untuk menghilangkan garam-garam yang masih tersisa dalam pellet DNA. DNA yang telah dicuci dilarutkan dalam aquabides dan dibiarkan semalaman agar

DNA dapat larut dengan sempurna dalam aquabides. DNA kemudian disimpan dalam lemari pendingin. Pada proses ini, segala bahan dan peralatan yang digunakan harus dijaga steril, karena DNA sangat mudah terkontaminasi, baik oleh mikroorganisme atau enzim.

DNA yang telah didapatkan kemudian dihitung konsentrasinya, agar dapat diketahui berapa DNA yang terpotong oleh enzim *plancitoxin*. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA} = \bar{x} \times 5000 \quad (4.1)$$

Dimana nilai x merupakan nilai rata-rata absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm.

Tabel 4. 1. Tabel Nilai Serapan dan Konsentrasi DNA

No	Nilai Abs. DNA
1	0,083
2	0,064
3	0,039
4	0,053
5	0,048
rata-rata	0,0574
Konsentrasi DNA (ug/ul)	287

Dari tabel dapat diketahui bahwa konsentrasi DNA yang didapatkan ialah sebesar 287 µg/µl.

4.3. Isolasi *Plancitoxin*

Tahapan selanjutnya yang dilakukan ialah isolasi protein dengan menggunakan metode pengendapan dengan garam ammonium sulfat. Metode isolasi dengan garam ini lazim digunakan untuk isolasi protein karena sifat garam yang dapat menghilangkan kelarutan protein atau juga disebut dengan *salting out*. Metode yang digunakan ialah metode fraksinasi, untuk mengetahui jumlah fraksi garam yang efektif untuk melakukan ekstraksi protein, yang tidak diketahui

sebelumnya. Fraksi garam yang digunakan ialah fraksi 20 %, 40 %, 60 %, dan 80 % Pada proses pengendapan, ammonium sulfat dilarutkan terlebih dahulu sesuai dengan fraksi yang diinginkan.

Pelarutan dilakukan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. *Magnetic stirrer* digunakan untuk mencegah penumpukan elektrolit dalam larutan, serta untuk meningkatkan kontak garam dengan larutan agar enzim semakin mudah untuk keluar. Akan tetapi, kecepatan *magnetic stirrer* juga perlu diperhatikan untuk mencegah terbentuknya gelembung pada larutan. Gelembung yang terbentuk dapat menimbulkan berkurangnya volume larutan sampel yang mengakibatkan berkurangnya konsentrasi enzim, selain itu terbentuknya gelembung juga dikhawatirkan dapat merusak enzim dalam larutan. Pada proses pelarutan suhu juga dijaga dalam temperatur 4 °C agar enzim tetap berada dalam keadaan segar. Selain itu, ammonium sulfat dilarutkan sedikit demi sedikit agar enzim data mengendap dengan baik.

Larutan ammonium sulfat dan cv disentrifuge dengan kecepatan 15.000 g selama 60 menit dan suhu 4 °C. Endapan yang dihasilkan diresuspensi dengan menggunakan buffer fosfat hingga semua endapan larut dalam buffer. Proses ini kemudian diulangi sampai dengan fraksi terbesar yakni fraksi 80 %. Pada hasil resuspensi dapat dilihat bahwa semakin besar fraksi yang digunakan, semakin banyak endapan yang menghasilkan warna larutan hasil resuspensi semakin pekat. Warna yang dihasilkan ialah berwarna kekuning-kuningan. Perubahan warna ini menunjukkan bahwa semakin besar fraksinya kemungkinan protein yang terendapkan menjadi semakin banyak.

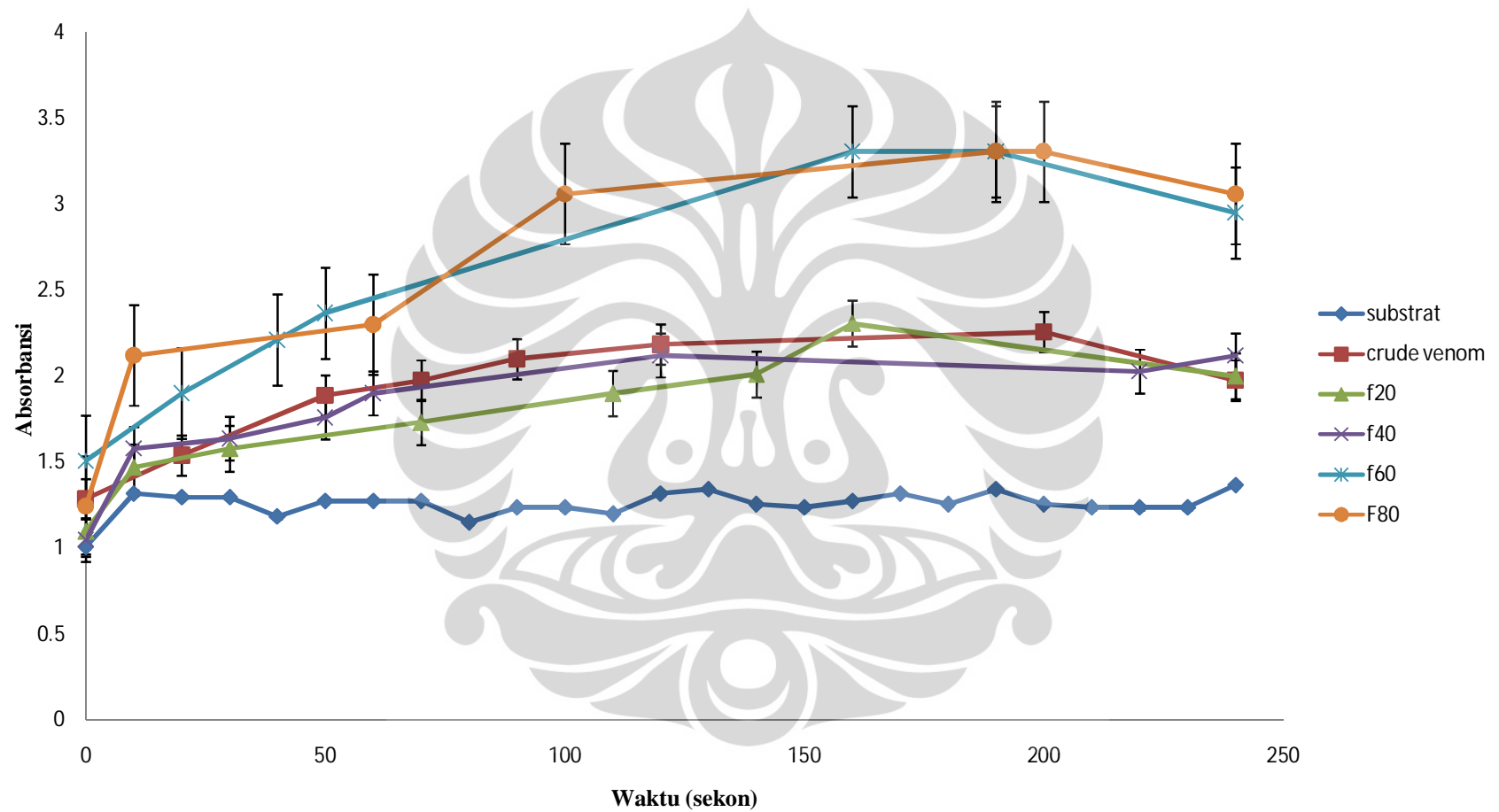


Gambar 4. 3. Racun plancitoxin yang berhasil diekstrak. (1) Fraksi 20 %, (2) Fraksi 40 %, (3) Fraksi 60 %, (4) Fraksi 80 %

4.4. Uji Aktivitas *Plancitoxin*

Uji aktivitas *plancitoxin* dilakukan sesuai dengan metode aktivitas DNase yang diujikan oleh Kunitz (1950) yang telah dimodifikasi. Uji ini menggunakan substrat berupa DNA yang telah diekstrak sebelumnya. Uji ini dilakukan dengan mencampurkan racun ke dalam larutan substrat yang telah ditambahkan buffer. Buffer memiliki pH 7,2, yang diketahui sebagai pH optimum untuk kerja enzim (Shiomi dkk., 2004).

Larutan racun-substrat-buffer kemudian diukur nilai absorbansinya selama empat menit pada panjang gelombang 260 nm. Aktivitas enzim dapat diketahui melalui kenaikan absorbansi pada larutan. Kontrol negatif dilakukan dengan cara mengukur absorbansi DNA dan buffer, dalam rentang waktu dan kondisi yang sama, tanpa ditambahkan enzim.



Gambar 4. 4. Grafik Uji Aktivitas *Placitoxin*. Substrat (◇ biru), *crude venom* (■ merah), F20 (▲ hijau), F40 (x ungu), F60 (* biru), F80 (● oranye).

Melalui grafik diatas dapat kita simpulkan bahwa terdapat aktivitas *plancitoxin* dalam fraksi-fraksi racun duri bintang laut *A.planci*. Kurva substrat yang stabil menunjukkan bahwa ketika enzim tidak diberikan, DNA tidak terurai yang artinya aktivitas memang tidak terjadi. Data yang didapatkan cenderung berbentuk bukit-lembah dikarenakan sensitivitas dari spektrofotometer uv-vis. Aktivitas diketahui melalui kurva diatas yang memiliki *trend* naik pada detik-detik awal yang lalu relative mendatar pada saat berikutnya. Hal ini menandakan bahwa enzim telah bereaksi dengan DNA dan kurva yang mendatar menandakan reaksi enzim dan DNA telah selesai. Naiknya absorbansi ini sesuai dengan uji aktivitas *plancitoxin* yang dilakukan oleh Shiomi dkk. (2004). Kenaikan absorbansi ini dinamakan *hyperchromicity*, yang disebabkan oleh adanya pemotongan DNA oleh DNase yang menyebabkan ikatan basanya tidak seestabil ketika berada pada DNA rantai panjang, sehingga terjadi lompatan orbital terminimalisir dan absorbansinya pada sinar UV meningkat.

Fraksi yang menunjukkan aktivitas paling besar ialah fraksi 60 %, dilanjutkan dengan fraksi 80 %, 40 %, *crude venom* (cv), dan terakhir ialah fraksi 20 %. Aktivitas diukur dengan melihat titik awal absorbansi hingga titik akhirnya. Fraksi 80 % memiliki trend yang relatif mendatar dikarenakan reaksi enzimatis yang dilakukan telah selesai. Hal ini juga sesuai dengan konsentrasi protein yang telah didapatkan dengan menggunakan uji Lowry, yakni fraksi 60% menunjukkan konsentrasi protein yang paling besar.

Perhitungan kuantifikasi dari enzim juga dapat dilakukan sesuai dengan metode Kunitz (1950). Metode ini menerangkan tentang analisis kuantitatif dari aktivitas enzim DNase yang mencerna DNA sebagai substratnya. Metode ini juga digunakan oleh Shiomi dkk. (2004), karena *plancitoxin* memiliki struktur yang homolog dengan DNase II. Kuantifikasi dari aktivitas ini dinamakan Kunitz unit, yakni kemampuan enzim untuk memberikan kenaikan absorbansi sebesar 0,001 per menit per ml DNA dalam kondisi dan keadaan tertentu (Kunitz, 1950). Definisi kuantifikasi ini kemudian dapat diubah menjadi model matematis berikut:

$$kunitz\ unit = \frac{x-x_0}{\frac{t}{ml}} \quad (4.2)$$

Dimana: x_0 = titik awal pembacaan substrat pada spektrofotometer uv-vis

x = titik akhir aktivitas *plancitoxin*

t = waktu yang dibutuhkan x_0 untuk mencapai x

Tabel 4. 2. Tabel Aktivitas *Plancitoxin*

Sampel	titik awal	titik akhir	waktu (menit)	unit (kunitz/ml)
cv	1,0068	2,1842	2,0000	5886,750
F20	1,0068	2,3064	2,6667	4873,500
F40	1,0068	2,1210	2,0000	5571,000
F60	1,0068	3,3064	2,5000	9198,200
F80	1,0068	3,3064	3,1667	7261,737

Fraksi *Plancitoxin* dengan aktivitas tertinggi

Perhitungan yang digunakan pada tabel ini menggunakan titik awal (nilai absorbansi substrat dalam waktu 0 detik), serta titik akhir, yakni titik dimana *trend* naik yang pada grafik menjadi relatif mendatar pada saat setelahnya. Hasil dari kuantifikasi aktivitas *plancitoxin* juga menunjukkan bahwa racun *plancitoxin* dapat mengurai DNA dalam waktu yang lebih singkat yang disebabkan oleh nilai Kunitz yang tinggi. Selain itu, sesuai dengan uji-uji lainnya, sampel 60 % memiliki aktivitas *plancitoxin* tertinggi, dibandingkan isolat sampel lainnya.

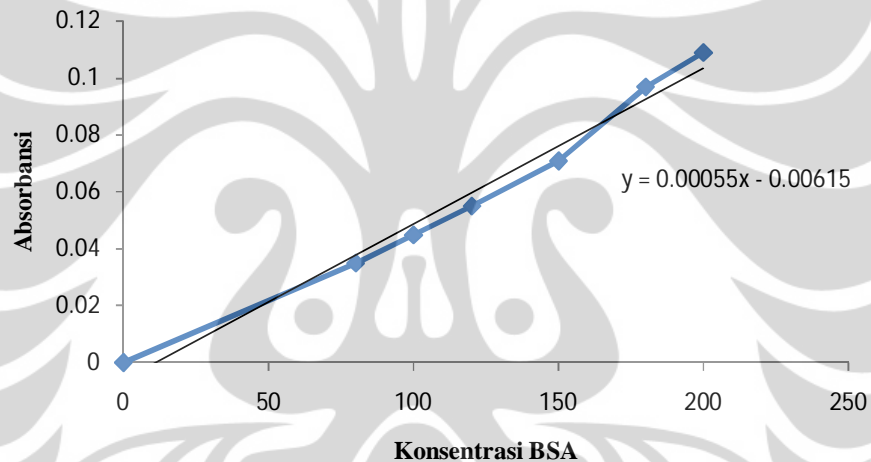
4.5. Uji Lowry

Uji lowry merupakan metode uji yang digunakan untuk menentukan besarnya konsentrasi protein dalam satu zat/sampel. Metode ini merupakan pengembangan dari metode biuret, yakni menggunakan reaksi kompleks Cu(II)-protein yang dalam keadaan basa Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu, dan mengakibatkan reaksi oksidasi gugus aromatik dengan produk berupa *heteropolymolybdenum blue* dan memberikan warna biru. Lalu diukur absorbansinya dalam panjang gelombang 750 nanometer.

Tujuan penggunaan metode ini yaitu untuk mengukur jumlah konsentrasi protein yang ada dalam isolat sampel. Konsentrasi protein ini kemudian

menandakan seberapa banyak racun yang berhasil diisolasi dengan menggunakan metode ini. Selain itu, konsentrasi protein juga dapat digunakan dalam uji aktivitas enzim, yakni untuk menguji berapa berat enzim yang dibutuhkan untuk mereaksikan sejumlah satuan berat substrat. Dengan hal ini, efektivitas enzim dapat diketahui dan didefinisikan.

Metode ini menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standarnya. BSA merupakan protein yang digunakan secara luas untuk uji protein, karena tingkat kemurniannya tinggi, mudah didapat, dan biayanya relatif lebih rendah. Perhitungan metode lowry dilakukan dengan menggunakan persamaan linear yang berupa perbandingan antara konsentrasi BSA dengan absorbansinya.



Gambar 4. 5. Kurva standar BSA

Melalui kurva diatas, didapatkan persamaan garis sebagai berikut:

$$y = 0,00055x - 0,000615 \quad (4.3)$$

Dimana x = konsentrasi protein

y = nilai absorbansi rata-rata sampel, maka

$$x = \frac{y+0,00615}{0,00055} \quad (4.4)$$

Pengujian protein isolat enzim dilakukan dengan dua kali pengulangan, untuk memberikan hasil yang lebih akurat dan reliabel. Hasil uji protein data dilihat pada tabel dibawah.

Tabel 4. 3. Tabel Konsentrasi *Plancitoxin*

	rata-rata absorbansi	Konsentrasi enzim total (ug)	konsentrasi enzim (mg/ml)
Cv	0,0215	50,27	2,51
20	0,0175	43,00	2,15
40	0,037	78,45	3,92
60	0,0585	117,55	11,75
80	0,0465	95,73	9,57

Fraksi *Plancitoxin* dengan konsentrasi tertinggi

Tabel ini menunjukkan konsentrasi protein yang berhasil terekstrak ke dalam isolat. Konsentrasi protein yang dihasilkan pun relatif besar, hingga mencapai 11,75 mg/ml pada fraksi 60 %. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan fraksinasi ammonium sulfat, protein berhasil diekstrak dengan konsentrasi yang cukup besar, lebih besar dari *crude venom* (cv). Hal ini menandakan bahwa kehadiran garam dalam larutan-larutan protein-buffer mulai secara efektif dapat menghilangkan kelarutan protein yang kemudian menghasilkan endapan berupa protein. Fraksi 20 % bernilai lebih kecil dibandingkan dengan *crude venom* dikarenakan konsentrasi garam yang diperlukan masih relatif rendah untuk mengendapkan protein, sehingga hanya sedikit endapan yang dihasilkan. Pada konsentrasi yang lebih besar dapat dilihat bahwa endapan semakin banyak yang dihasilkan, dan semakin banyak pula konsentrasi protein yang mengendap. Penurunan konsentrasi protein pada fraksi 80% disebabkan oleh larutan buffer yang telah berada dalam kondisi sangat jenuh, serta sebagian besar protein telah terendapkan pada fraksi-fraksi sebelumnya.

4.6. Sodium Duodesil Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

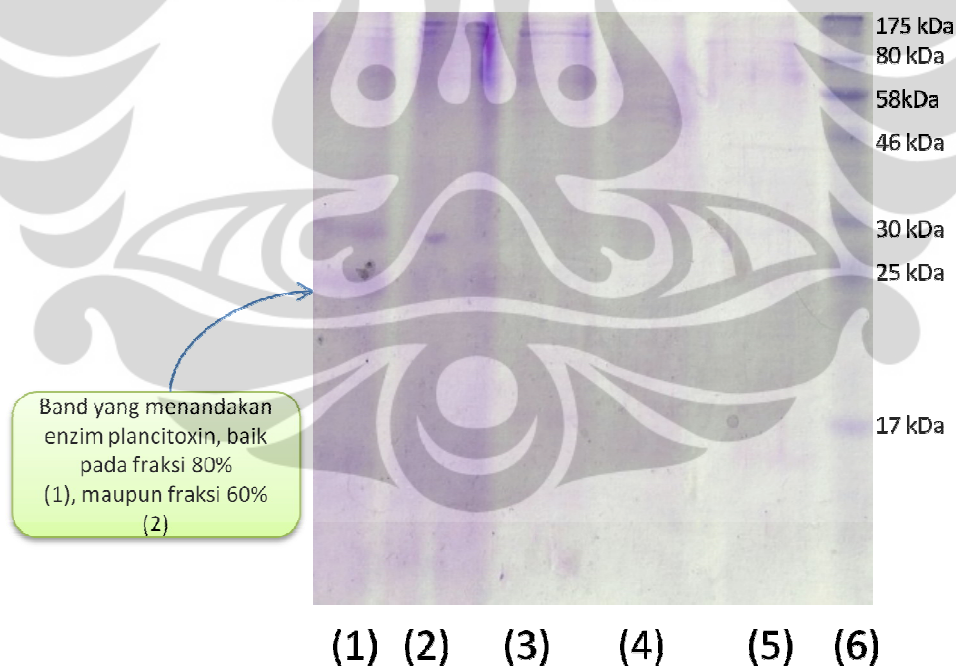
Analisis SDS-PAGE digunakan untuk mengidentifikasi kebenaran keberadaan protein-protein dengan berat molekul tertentu dalam sampel. Uji ini dilakukan berdasarkan metode elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu metode yang dilakukan berdasarkan pergerakan dari molekul-molekul bermuatan dalam sebuah medan listrik. Media yang biasa digunakan dalam uji elektroforesis biasanya selulosa serta gel tipis yang terdiri dari agarosa atau poliakrilamid. selulosa dan agarosa/poliakrilamid berbeda penggunaannya, selulosa cenderung untuk molekul yang berukuran lebih kecil, seperti asam amino, sedangkan agarosa dan poliakrilamid digunakan untuk molekul yang berukuran lebih besar, yakni protein.

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). Fungsi SDS dalam metode ini ialah untuk menyeragamkan muatan protein. Perlu diketahui bahwa pada umumnya metode elektroforesis tidak dapat digunakan untuk menentukan berat molekul suatu senyawa, karena pergerakan molekul-molekul tersebut dipengaruhi oleh berat molekul serta muatannya. Masalah ini dapat diatasi dengan menyeragamkan muatan-muatan yang dimiliki oleh molekul, sehingga pergerakannya dalam gel hanya dipengaruhi oleh berat molekulnya, dan berat molekul sampel pun dapat diukur. SDS bekerja dengan mengikat daerah hidrofobik molekul protein sehingga menyebabkannya terurai menjadi rantai polipeptida yang panjang dan bermuatan negatif yang berasal dari SDS. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen. Denaturasi protein juga dapat dipermudah dengan menggunakan mercaptoetanol. Mercaptoetanol membantu denaturasi protein dengan memecah seluruh ikatan sulfidanya.

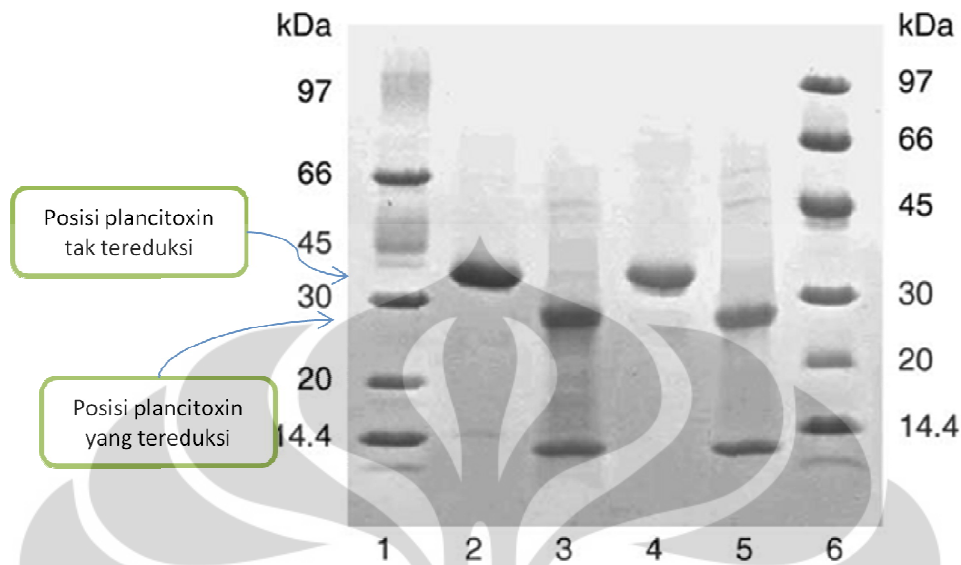
Proses elektroforesis ini dilakukan dengan menggunakan *running buffer*. Dapar ini dituangkan ke dalam alat SDS dan susunan gel tercelup dalam sampel.

Karena dapar ini merupakan dapar yang berfungsi untuk mengakomodir migrasi sampel dalam gel, maka buffer ini harus selalu penuh dalam alat elektroforesis. Bila alat berada dalam keadaan kering, migrasi pun berjalan sangat lambat, bahkan tidak terjadi.

Proses berikutnya yang dilakukan ialah proses *staining* dan *destaining*, kedua ini dilakukan untuk mempertajam warna pita pada gel, sehingga pita-pita tersebut tampak dan dapat diidentifikasi. *Coomassie brilliant blue* dapat berikatan dengan ikatan peptide pada protein tanpa merusak strukturnya. Hal ini membuat protein yang berada pada gel membentuk pita-pita biru hasil migrasi yang terjadi pada proses elektroforesis. Proses *destaining* dilakukan setelahnya, proses ini menggunakan *coomassie* yang menyebabkan tinta biru hilang pada gel, tanpa mengubah warna dari pitapita biru protein yang telah terbentuk. Setelah tahapan ini dapat juga ditambahkan akuades agar pita semakin terlihat jelas. Akuades berfungsi untuk mencuci gel dari sisa *staining* dan *destaining* sehingga pita dalam gel berwarna lebih jelas.



Gambar 4. 6. Hasil SDS-PAGE *Plancitoxin*. (1) Fraksi 80 %, (2) Fraksi 60 %, (3) Fraksi 40 %, (4) Fraksi 20 %, (5) cv, (6) Marker



Gambar 4. 7. Hasil SDS PAGE *Plancitoxin* penelitian sebelumnya. (1) dan (6) marker, (2) *plancitoxin* I yang tak tereduksi, (3) *plancitoxin* I yang tereduksi, (4) *plancitoxin* II yang tak tereduksi, (5) *plancitoxin* II yang tereduksi. (Shiomi dkk., 2004)

Hasil SDS-PAGE pada gambar memperlihatkan bahwa terdapat pita-pita protein yang dapat diidentifikasi sebagai *plancitoxin*. *Plancitoxin* memiliki berat molekul dari 27 kDa (Shiomi dkk., 1988) hingga 37 kDa (Shiomi dkk., 2004) dan ini juga tampak pada hasil SDS-PAGE yang telah dilakukan. Perbedaan berat molekul ini disebabkan oleh adanya mercaptoetanol yang membuat ikatan disulfida protein pecah, sehingga terbagi kedalam 2 subunit, yaitu subunit α yang berberat molekul 27 kDa, dan subunit β yang memiliki berat molekul 10 kDa. Pada hasil ini, hanya subunit α yang terlihat, sedangkan subunit β tidak terlihat karena berat molekulnya yang kecil.

Pada gel ini, pita yang tampak ialah pita yang berada pada fraksi 80 %, 60 %, dan secara samar juga dapat dilihat pada fraksi 40 % dan cv. Hal ini menandakan bahwa konsentrasi protein turut mempengaruhi proses migrasi protein yang berakibat pada munculnya pita pada gel. Namun, dalam gel juga tampak protein-protein lain. Hal ini memberikan kesimpulan bahwa isolat *plancitoxin* belum benar-benar murni, sehingga perlu dimurnikan dengan tahapan yang lebih lanjut.

BAB V

KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini ialah:

1. Metode isolasi yang dilakukan mengacu pada metode isolasi parsial yang dilakukan oleh Savitri dkk. (2011), yang telah berhasil mengekstrak PLA-2 dengan menggunakan kombinasi antara metode sonikasi serta pengendapan garam ammonium sulfat.
2. Isolasi Plancitoxin dengan metode pengendapan fraksinasi amonium sulfat berhasil dilakukan pada fraksi 60 % dan 80 % masing-masing 11,75 mg/ml dan 9,57 mg/ml.
3. Uji aktivitas juga menunjukkan fraksi 60 % dan 80 % plancitoxin memiliki aktivitas Dnase yaitu masing-masing sebesar 9198,200 Kunitz unit/ml dan 7261,737 Kunitz unit/ml.
4. Hasil SDS-PAGE menunjukkan plancitoxin berada pada berat molekul 25-30 kDa.
5. Hasil SDS-PAGE juga menunjukkan enzim plancitoxin yang terekstraksi tidak murni, masih banyak pengotor berupa protein lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition. New York: Garland Science; 1994.
- Ashley K, Andrews RN, Cavazosa L, Demange M. 2001. *Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 16:1147-1153.
- Baker, K.P., Baron, W.F., Henzel, W.J. and Spencer, S.A. 1998. *Molecular cloning and characterization of human and murine DNase II*. *Gene* **215**, 281-289.
- Bodram, Laura-Lee. 2004. *Extraction of genomic DNA from whole blood*. www.protocol-online.org.
- CRC. 2003. *Crown-of-thorns starfish in the Great Barrier Reefs: Current State of Knowledge*. Cooperative Research Centers (CRC) Reef Research Center. Townsville, Australia.
- Daoust R and Amano H. 1963. *Ribonuclease and deoxyribonuclease activities in experimental and human tumors by histochemical substrate film method*. *Cancer Res* 23: 131-134.
- Deutscher, Murray. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington : University of Connecticut Health Center.
- De'ath, G. and P.J. Moran. 1997. *Factors affecting the behaviour of Crown-of-thorns starfish (Acanthaster planci L.) on the Great Barrier Reef: 2: Feeding Preferences*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 220(1998): 107-126.
- Hobbs JPA, Salmond JK 2008. *Cohabitation of Indian and Pacific Ocean species at Christs and Cocos (Keeling) Islands*. *Coral Reefs* 27:933
- Ihtiarto, Skripsihana. 2011. *Ekstraksi, Pemurnian dan Uji Aktivitas Antibakterial Racun Duri Acanthaster planci Perairan Maluku Dan Papua*. Skripsi. Universitas Indonesia.
- Ito, K., Minamiura, N. and Yamamoto, T. 1984. *Human Urine DNase I: Immunological identity with human pancreatic DNase I, and enzymic and proteochemical properties of the enzyme* .*J.Biochem.* **95**, 1399-1406.

- Karasudani, I., Koyama, T., Nakandakari, S. and Aniya, Y. 1996. *Purification of anticoagulant factor from the spine venom of the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci**. *Toxicon* 34, 871-879.
- Katoh M, Hashimoto K. 2003. *Genetic similarity of outbreak populations of crown-of-thorns starfish (*planci*) that were 15 years apart in Okinawa, Japan*. *Coral Reefs* 22: 178–180
- Keesing JK, Halford AR. 1992. *Field measurement of survival rates of juvenile *planci*: techniques and preliminary results*. *Mar Ecol Prog Ser* 85: 107-11.
- Koelman J, Roehm KH. 2005. *Color Atlas Biochemistry*. 2nd ed. Marburg: Thieme.
- Kunitz, M. 1950. *Crystalline desoxyribonuclease: Isolation and general properties; a spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity*. *J. Gen. Physiol.* **33**, 349-362.
- Lane DJW. 1996. *A crown-of-thorns outbreak in the eastern Indonesian Archipelago, February 1996*. *Coral Reefs* 15:209-210
- Lehninger, A. L., *Dasar-dasar biokimia, Jilid 1*, Maggy Thenawidjaja (Penerjemah), Penerbit Gramedia, Jakarta, 1993.
- Lowry, N.; Rosenbroug, A. 1951. Farr; Randall, R. *Protein Measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- MaoQing Ye, Z. H., Ying Fan, Ling He, FuBao Xia and GuoLin Zou, 2004. *Purification and Characterization of an Acid Deoxyribonuclease from the Cultured Mycelia of *Cordyceps sinensis**. *KBSMB & Springer-Verlag_37* (Journal of Biochemistry and Molecular Biology).
- Moran, P. 1988. *Crown-of-thorns Starfish: Questions and Answers*. Australian Institute of Marine Sciences, Townsville MC. Queensland, Australia. pp. 11-29.
- Okaji K, Ayukai T, Lucas JS. 1997. *Selective feeding by larvae of the crown-of-thorns starfish, *planci* (L.)*. *Coral Reefs* 16:47-50
- Olson RR. 1985. *In situ culturing of larvae of the crown-of-thorns starfish *planci**. *Mar Ecol Prog Ser* 25:207-210

- Ota E, Nagashima Y, Shiomi K, dkk. *Caspase-independent apoptosis induced in rat liver cells by plancitoxin I, the major lethal factor from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom*. *Toxicon*.2006;48:1002–1010.
- Ota E, Nagai H, Nagashima Y, Shiomi K. 2004. *Molecular cloning of two toxic phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* venom*. Elsevier.*Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 143 (2006) 54 – 60.
- Pratchett, M.S. 2001. *Influence of coral symbionts on feeding preferences of crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* in the western Pacific*. *Mar Ecol Prog Ser*. 214(2001): 111-119.
- Porter, J.W. 1972. *Predation by *Acanthaster* and its Effect on Coral Species Diversity*.*The American Naturalist*. 106(950): 487-492.
- Reichelt RE, Bradbury RH, Moran PJ. 1990. *Distribution of planci outbreaks on the Great Barrier Reef between 1966 and 1989*. *Coral Reefs* 9:97-103
- S. Sugiharal, T. Y., H. Tanaka, T. Kambara, T. Hiraokal & Y. Miyauchil 1993. *Deoxyribonuclease treatment prevents blood-borne liver metastasis of cutaneously transplanted tumour cells in mice*. Macmillan Press ltd.
- Satwika, Respatiphala A. 2010. *Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A2 dari *Acanthaster planci**. Skripsi. Universitas Indonesia
- Savitri, IK., Ibrahim, F., Sahlan, M., and Wijanarko, A. 2011. *Rapid and Efficient Purification Method of Phospholipase A2 From *Acanthaster planci**. *IJPBS* 44, 401-406.
- Shiomi, K., Itoh, K., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1985. *Biological activity of crude venom from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci**. *Nippon Suisan Gakkaishi* 51, 1151-1154.
- Shiomi, K., Yamamoto, S., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1988. *Purification and characterization of a lethal factor in venom from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*)* *Toxicon* 26, 1077-1083.
- Shiomi, K., Nagai, K., Yamanaka, H. and Kikuchi, T. 1989. *Inhibitory effect of anti-inflammatory agents on cutaneous capillary leakage induced by six marine venoms*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 131-134.

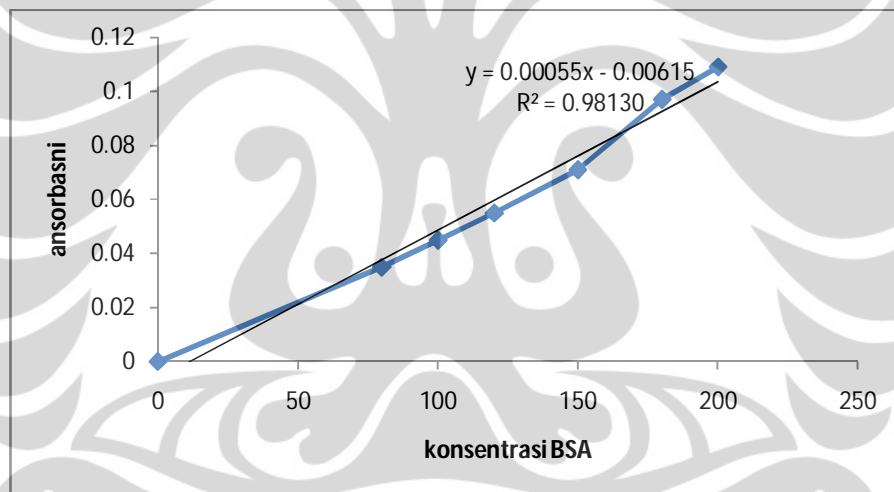
- Shiomi, K., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T. and Konno, K. 1990. *Liver damage by the crown-of-thorns starfish (Acanthaster planci) lethal factor*. *Toxicon* 28, 469-475.
- Shiomi K, Midorikawa S, Ishida M, Nagashima Y, Nagai H. 2004. *Plancitoxins, lethal factors from the crown-of-thornsstarfish Acanthaster planci, are deoxyribonucleases II*. *Toxicon*.:44:499–506.
- Seymour RM, Bradbury RH. 1999. *Lengthening reef recovery times from crown-of-thorns outbreaks signal systemic degradation of the Great Barrier Reef*. *Mar Ecol Prog Ser* 176:1-10
- Sorokin YI. 1995. *Coral reef Ecology*. Springer-Verlag, Berlin
- Taper H. 2008. *Altered deoxyribonuclease activity in cancer cells and its role in non toxic adjuvant cancer therapy with mixed vitamins C and K3*. *Anticancer Res.*, 28, 2727-2732 [Journal Impact Factor : 1.472].
- Torriglia, M.-F.C. a. A. 2006. *Acid DNases and their interest in apoptotic intermediates*. HAL Author manuscripts **12** (biochem).
- Wakeford M, Done TJ, Johnson CR. 2008. *Decadal trends in a coral community and evidence of changed disturbance regime*. *Coral Reefs* 27:1–13.
- Williams DM. 1986. *Temporal variation in the structure of reef slope fish communities (central Great Barrier Reef): short-term effects of planci infestation*. *Mar Ecol Prog Ser* 28:157-164.
- Yamaguchi M. 1986. *planci infestations of reefs and coral assemblages in Japan: a retrospective analysis of control efforts*. *Coral Reefs* 5:23-30.
- Yi-Chun Wu, G. M. S., and H. Robert Horvitz (2000). *NUC-1, a Caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis*. Cold Spring Harbor Laboratory press **14** (Genes and Development).

LAMPIRAN A

METODE LOWRY

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

BSA (mg/ml)	absorbansi
0	0
80	0,035
100	0,045
120	0,055
150	0,071
180	0,097
200	0,109



Gambar A.1 Kurva Standar Protein BSA

Penentuan Kadar Protein Sampel

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

$$y = 0.00055x - 0.000615$$

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

Contoh perhitungan :

Absorbansi sampel *crude venom* (CV) rata-rata adalah 0,0215, maka kadar proteinnya

$$x = \frac{0,0215 + 0,000615}{0,00055}$$

Maka didapat kadar CV sebesar 50,27 μg , karena sampel yang digunakan sebesar 20 μl , maka $50,27 \mu\text{g}/20 \mu\text{l} = 2,51 \text{ mg/ml}$



LAMPIRAN B

Tabel B.1. Data Pengamatan

Time (Second)	cv	F20	F40	F60	F80	substrat
0	1.28545	1.0984	1.0482	1.50615	1.24295	1.0068
10	1.70095	1.47075	1.57805	1.86	2.121	1.3188
20	1.5397	1.4226	1.557	1.9001	1.93825	1.2971
30	1.67135	1.57805	1.6372	2.6128	2.21635	1.2971
40	1.712	1.6477	2.121	2.211	1.9001	1.1837
50	1.88715	1.557	1.75945	2.3669	2.21635	1.2755
60	1.84335	1.52125	1.9001	2.01055	2.301	1.2755
70	1.97565	1.73195	2.01055	2.3669	2.02825	1.2755
80	1.97565	1.77205	2.01055	2.3064	1.84815	1.1512
90	2.10055	1.7259	1.93825	1.8199	2.10055	1.2363
100	2.02825	1.62665	1.8278	3.30635	3.06045	1.2363
110	2.91165	1.9001	1.7259	2.3064	2.25645	1.2
120	2.18415	1.87775	2.121	3.15045	2.8481	1.3188
130	1.86175	1.77205	1.9001	2.06045	3.15045	1.3429
140	1.88715	2.01055	2.06045	2.01055	2.25645	1.255
150	1.84815	2.10055	3.06	3.06045	2.301	1.2363
160	2.95	2.3064	1.8278	3.30635	2.6128	1.2755
170	2.2181	1.8825	1.80325	2.4569	1.86	1.3188
180	2.2181	1.8278	1.8278	3.9999	2.9099	1.255
190	1.86175	1.7259	1.93825	3.30635	3.30635	1.3429
200	2.25645	2.1505	1.8278	3.15045	3.30635	1.255
210	2.4569	2	1.95005	3.15045	1.87775	1.2363
220	1.97565	2.18415	2.02825	2.121	2.82195	1.2363
230	1.8232	3.06045	1.93825	2.8777	2.01055	1.2363
240	1.97565	2	2.121	2.95	3.06045	1.3683

Perhitungan konsentrasi DNA dilakukan dengan persamaan:

$$\text{Konsentrasi DNA} = \bar{x} \times 5000$$

Dimana nilai x merupakan nilai rata-rata absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm.

Tabel B.2. Tabel Nilai Serapan dan Konsentrasi DNA

No	Nilai Abs. DNA
1	0,083
2	0,064
3	0,039
4	0,053
5	0,048
rata-rata	0,0574
Konsentrasi DNA (ug/ul)	287

Tabel B.3 Hasil Pemurnian Enzim *Plancitoxin* untuk Sampel Racun *A.planci* Perairan Ambon, Maluku

Sampel	konsentrasi (ug)	konsentrasi enzim (ug/ul)	unit (kunitz/ml)
cv	50.272	2.513	5886.75
F20	43	2.15	4873.5
F40	78.45	3.92	5571
F60	117.54	11.75	8623.313
F80	95.72	9.57	7261.737