

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI PROTEIN BIOAKTIF DARI SPONGIA
petrosia alfiani DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER**

EVA INDRIANI

H31115028



DEPARTEMEN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020



**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI PROTEIN BIOAKTIF DARI SPONGIA
petrosia alfiani DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

EVA INDRIANI

H31115028



MAKASSAR

2020



SKRIPSI


ISOLASI DAN IDENTIFIKASI PROTEIN BIOAKTIF DARI SPONS
petrosia alfiani DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER

Disusun dan diajukan oleh

EVA INDRIANI

H31115028

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:


Pembimbing Utama
Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D
NIP. 19671231 199103 1 020


Pembimbing Pertama
Dr. Senwati Dali, M.Si
NIP. 19581231 198803 2 003



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Eva Indriani

Nomor Mahasiswa : H31115028

Program Studi : Kimia

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan sendiri.

sar, 25 September 2020



Eva Indriani



PRAKATA

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillah rabbil alamin, Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan Semesta Alam, yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang, yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan Nabi Agung Muhammad SAW yang selalu kita nantikan syafa'atnya di akhirat nanti.

Tidak lupa, penulis mengucapkan syukur kepada Allah SWT atas limpahan nikmat sehat-Nya, baik itu sehat fisik maupun akal pikiran, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul "Isolasi dan Identifikasi Protein Bioaktif Dari Spons *Petrosia Alfiani* dan Potensinya Sebagai Antikanker" disusun sebagai salah satu persyaratan akademik yang harus dipenuhi untuk menyelesaikan program strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Banyak halangan dan hambatan yang penulis lewati selama menyelesaikan penelitian ini, namun dengan bantuan, dukungan, doa dan semangat dari semua pihak akhirnya skripsi ini dapat diselesaikan. Izinkan saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Bapak **Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D** dan Ibu **Dr. Seniwati Dali, M.Si** selaku pembimbing utama dan pertama, yang senang tiasa memberikan pengarahan, bantuan, perhatian, dan motivasi selama proses penyelesaian skripsi ini.

Limpahan rasa hormat dan bakti serta doa yang tulus, penulis persembahkan kepada orang tua Ayah dan Ibu tercinta, **Oddin** dan **Juri** yang hingga detik ini tidak pernah berhenti mendoakan dan mendukung segala pilihan dan langkah saya, Tanta saya **Suria** yang telah memberikan perhatian dan selalu mendoakan yang terbaik untuk saya Saudara-saudari saya (**Resa Indriawan, Reski Indriansya, Nur Indah, Candra, Muhammad Alwi dan Muhammad**

yang selalu mendukung, menyemangati dan yang tak pernah lelah untuk saya, Keberhasilan penulis sampai pada tahap penulisan skripsi ini tak lepas dari bantuan, baik materil maupun spiritual dari orang-orang di lingkungan keluarga. Karena itu penulis menghaturkan terima kasih kepada :



1. Bapak **Prof. Dr. Alfian Noor, M.Sc** yang juga selaku (ketua) dan bapak **Dr. Maming, M.Si** (sekretaris), sebagai penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberi saran dan masukan yang sangat berharga.
2. Analis laboratorium kak Anti, kak Fibi, pak Sugeng, ibu Tini, kak Linda, pak Iqbal dan kak Akbar, terkhusus untuk kak akbar terima kasih atas bantuan dan kritikan serta sarannya pada saat penelitian. Sehingga sangat membantu penulisan skripsi ini.
3. Seluruh **Dosen dan Staff Akademik Unhas** yang membimbing dan mengarahkan penulis hingga ketahap ini.
4. Sahabat-sahabat terbaik penulis **Iranda, Riska Handayani, Marianti dan Dian Rahmayanti** yang selalu memberikan dukungan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Teman seperjuangan, tempat berbagi segala kesulitan dan kebahagiaan dalam menyelesaikan penelitian ini, saudari **Wirda Asriani Hamja**, terima kasih atas segala moment indah yang telah dilewati bersama.
6. Teman-teman terdekat, yang senantiasa membantu penulis, tempat bagi penulis berkeluh kesah dan membagi pengalaman indah bersama-sama. Terima kasih kepada kalian **Mufli haerati, Nurul Atifah, Musdalipa, Santini, Meitha, Gusnitasari, dan Nuraini**
7. Teman-teman sesama Peniliti Biokimia Departemen Kimia FMIPA Unhas yang selalu berbagai saran dan pendapat, saling menyemangati dan memotivasi selama berjalannya penelitian ini
8. Teman-teman KIMIA 2015 yang selama ini telah berjuang melewati masa studi dan yang masih berusaha untuk menyelesaikan studi di departemen Kimia FMIPA Unhas

Penulis sadar akan segala kekurangan dalam penulisan skripsi ini, maka penulis sangat menghargai bila ada kritik dan saran demi penyempurnaan isi skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membaca maupun bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Makassar, 25 September 2020

Penulis



ABSTRAK

Isolasi dan identifikasi protein bioaktif dari spons *Petrosia alfiani* yang terdapat dalam pulau Barang lombo Makassar Sulawesi Selatan telah dilakukan. Protein diisolasi dengan menggunakan Buffer Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3. Ekstrak kasar difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60%, dan 60-80%. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan membran selofan. Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry dengan menggunakan BSA (Bovine Serum Albumin) sebagai larutan standar. Uji aktivitas antikanker menggunakan uji pendahuluan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi protein dari ekstrak kasar Spons *Petrosia aldiani* sebesar 8,698 mg/mL. Konsentrasi tertinggi pada fraksi protein ditunjukkan oleh fraksi oleh fraksi 0-20% sebesar 4,188 mg/mL. Hasil uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan aktivitas tertinggi pada fraksi 20-40% kejenuhan dengan nilai LC_{50} sebesar 21, 54 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas hidrolisat protein terhadap larva udang *Artemia salina* Leach pada fraksi 0-20% sebesar 33,95 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk fraksi 20-40% sebesar 42,40 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi 20-40% kejenuhan dan hidrolisat protein berfotensi untuk dikembangkan sebagai alternatif agen antikanker.

Kata kunci : Spons *Petrosia alfiani*, antikanker, fraksi protein, Hidrolisis Protein



ABSTRACT

*Isolation and Identification of bioactive protein from Sponges Petrossian alfianicontained in Barang Lompo island South Sulawesi has been done. Protein was isolated using Buffer Tris (hydroxymethyl) amino methane pH 8.3. crude extract was fractionated by addition of amonium sulfate at saturation levels 0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%. Protein purification was done by dialysis using cellophane bags. Concentration of protein determined by the Lowry methodusing BSA (Bovine Serum Albumin) as a standard. Anticancer activity test using preliminary test methods Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The results showed that the protein concentration of the crude extract of Sponges Petrossian alfiani is 8,698 mg/mL. The highest concentration of protein fractions indicated by the 0-20% fraction of 4,188 mg/mL. The results from toxicity tests using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) showed highest activity in fractions 20-40% saturation with LC_{50} values of 21,54 $\mu\text{g/mL}$. Protein hydrolyzate activity againts *Artemia salina* Leach shrimp larvae in the fraction 0-20% of 33,95 $\mu\text{g/mL}$ and for the fraction 20-40% of 42,40 $\mu\text{g/mL}$. Fractions 20-40% and protein hydrolyzate saturation potential to be developed as an alternative anticancer agents.*

Key words: *Sponges Petrossian alfiani, anticancer, protein fraction, protein hydrolysis.*



DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	iii
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Maksud Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan Umum Spons.....	6
2.2 Tinjauan Spons <i>Petrosia Alfiani</i>	10
2.2.1 Taksonomi.....	10
2.2 Morfologi.....	10
3 Tinjauan Senyawa Protein.....	12
	viii



2.4 Tinjauan Protein Antikanker	13
2.5 Tinjauan Isolasi Dan Pemurnian Protein.....	14
2.5.1 Ekstraksi.....	14
2.5.2 Fraksinasi Dengan <i>Salting out</i>	15
2.5.3 Dialisis	16
2.6 Hidrolisis Protein	16
2.7 Metode Uji Aktivitas Antikanker Metode Bslt.	18
BAB III. METODE PENELITIAN	21
3.1 Bahan Penelitian	21
3.2 Alat Penelitian	21
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.4 Prosedur Penelitian	22
3.4.1 Preparasi Sampel	22
3.4.2 Fraksinasi	22
3.4.3 Dialisis	22
3.4.4 Hidrolisis Protein	23
3.4.4.1 Hidrolisis Enzimatik	23
3.4.4.2 Penentuan Derajat Hidrolisis.....	23
3.4.5 Penentuan Kadar Protein.....	24
3.4.6 Uji Toksisitas dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> . ..	24
3.4.6.1 Penyiapan Larva Udang.....	24
3.4.6.2 Pelaksanaan Uji.....	24
HASIL DAN PEMBAHASAN	25
1 Isolasi dan Pemurnian Protein dari Spons.....	25
2 Penentuan Kadar Protein.....	26



4.3 Uji Aktivitas Antikanker terhadap Fraksi Protein.....	28
4.4 Hidrolisis protein.....	30
4.5 Uji Aktivitas Antikanker terhadap Hidrolisat Fraksi Protein	31
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	38



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia.....	9
2. Data hasil penentuan konsentrasi protein dan total protein pada ekstrak kasar dan fraksi protein pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dari spons <i>Petrosia alfiani</i>	27
3. Data hasil perhitungan nilai LC_{50} terhadap larva udang (<i>Artemia salina</i> Leach) dari beberapa fraksi protein Spons <i>Petrosia alfiani</i>	29



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Spons <i>Petrosia alfiani</i>	11
2. Mekanisme hidrolisis protein oleh enzim papain.....	17
3. Larva <i>Artemia salina</i> Leach	19
4. Pengaruh waktu hidrolisis terhadap derajat hidrolisis.....	31
5. Nilai LC ₅₀ hidrolisat fraksi protein dari spons petrosia alfiani	32
6. Ekstrak kasar spons <i>Petrosia alfiani</i>	64
7. Proses penambaha amonium sulfat.....	64
8. Sentrifugasi	64
9. Fraksi-fraksi protein	64
10. Dialisis.....	64
11. Pengukuran kadar protein	65
12. Hidrolisis Protein.....	65
13. Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	65



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Kerja Isolasi, Pemurnian dan Uji Bioaktivitas Protein Bioaktif dari Spons.....	38
2. Skema kerja fraksinasi protein bioaktif dengan amonium sulfat.....	39
3. Skema dialisis	40
4. Hidrolisis protein.....	41
5. Penentuan kadar protein.....	42
6. Uji Antikanker Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	43
7. Pembuatan Larutan Buffer tris-HCl.....	44
8. Penentuan Protein dengan Metode Lowry	46
9. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan dan Volume Suspensi Endapan Yang Diperoleh Pada Fraksi Spons <i>Petrosia alfiani</i>	47
10. Tabel tingkat kejenuhan amonium sulfat.....	48
11. Penentuan Serapan Maksimum (λ maksimum).....	49
12. Kurva Standar Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry pada Panjang Gelombang Maksimal 700 nm	50
13. Pengukuran Kadar Protein Pada Setiap Tahap Pemurnian Spons <i>Petrosia alfiani</i>	51
14. Penentuan Total Protein Fraksinasi Berbagai Tingkat Kejenuhan	52
15. Hasil Perhitungan LC_{50} Larva Udang (<i>Artemia Salina Leach</i>) yang Mati terhadap Beberapa Fraksi Protein dari Spons <i>Petrosia alfiani</i>	53
16. Harga Probit Sesuai dengan Persentasenya.....	54
.....	55
.....	60



19. Hasil Perhitungan LC_{50} Larva Udang (<i>Artemia Salina Leach</i>) yang Mati terhadap Beberapa Hidrolisat Protein dari Spons <i>Petrosia alfiani</i>	62
20. Perhitungan LC_{50}	63
21. Dokumentasi Penelitian	65



DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

ppm	: <i>part per million</i>
rpm	: Rotasi per menit
BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
LC	: <i>Lethal Concentration</i>
DH	: Derajat Hidrolisis
BSLT	: <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai negara kepulauan memiliki wilayah perairan yang lebih luas dibanding luas daratan. Sekitar 900.000 hektar wilayah perairan di Indonesia memiliki sumber organisme laut yang dapat dimanfaatkan (Ecos, 2007). Biota laut dalam beberapa tahun terakhir ini menjadi target pencarian bahan penelitian. Beberapa diantaranya telah dilaporkan mengandung berbagai jenis senyawa dengan bioaktivitas yang berbeda-beda mulai dari antibakteri, antifungi, antikanker dan sebagainya (Arifuddin dkk., 2001; Trianto dkk., 2004).

Spons merupakan binatang berongga rapat tergolong sebagai filum poripera yang ditemukan di karang-karang vertikal di daerah perairan yang dangkal. Indonesia kaya akan bermacam-macam jenis spons. Biota laut ini menghasilkan berbagai senyawa kimia metabolit sekunder yang bersifat bioaktif. Senyawa kimia tertentu dihasilkan untuk mempertahankan diri dari serangan predator, mengingat struktur tubuhnya yang lunak dan menetap (Muniarsih, 2005).

Spons laut memiliki potensi bioaktif yang sangat besar. Selama 50 tahun terakhir telah banyak kandungan bioaktif yang telah ditemukan. Kandungan bioaktif tersebut dikelompokkan beberapa kelompok besar yaitu *antiflammantory*, antikanker, *immunosuppressive*, antivirus, antimalaria, antibiotik, dan antifouling (2009).

Spons *petrosia alfiani* adalah spesies baru yang ditemukan oleh De Voogd Soest (2002) yang tersebar dikawasan perairan kepulauan Spermonde,



Barat-Selatan Sulawesi, *petrosia alfiani* berbentuk bulat (globular) besat atau seperti ranting dengan panjang maksimum 20 cm, lebar 10 cm dan tinggi 4 cm, berwarna kuning, berubah menjadi merah-coklat pada udara terbuka. Beberapa penelitian yang telah dipublikasikan beberapa senyawa bioaktif dari genus *Petrosia* diantaranya adalah asam kortikatat sebagai antijamur dari spons *Petrosia cortikata* (Soediro, 1999), Van Soest dan Braekman (1999) menemukan beberapa senyawa bioaktif dari family petrosidae diantaranya polihidroksilat asetilin, siklik 3-alkilpiperidin, dan siklopropenasterol. Selain itu beberapa senyawa aktif yang telah ditemukan dan dilaporkan dari genus *Petrosia sp* adalah alkaloid manzamine-A bersifat sitotoksik (El sayed dkk., 2001). *Petrosia sp* juga ditemukan senyawa yang mengandung poliasetilen, dideoxypetrosynol A yang menunjukkan aktivitas antikanker pada sel melanoma kulit manusia (Cho dkk., 2004).

Protein aktif memegang peranan penting dalam hampir semua proses biologi. Peran dan aktivitas protein diantaranya adalah sebagai katalitis enzimatik dimana sebagian besar reaksi kimia dalam sistem biologi, dikatalisis oleh enzim dan hampir semua enzim yang berperan adalah protein, transpor dan penyimpanan, koordinasi gerak, penunjang mekanis, proteksi imun, membangkitkan dan menghantar impuls saraf, serta pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi (Primasoni, 2010).

Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk memanfaatkan protein adalah melalui hidrolisis protein. Hidrolisat protein merupakan produk yang dihasilkan dari penguraian protein menjadi peptida sederhana dan asam amino melalui proses hidrolisis oleh enzim, asam atau basa. Hidrolisis protein



menggunakan enzim merupakan cara yang efisien karena dapat menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam amino tertentu, seperti triptofan dan glutamin (Kristinsson 2007). Enzim protease yang digunakan dalam hidrolisis protein ikan telah tersedia secara komersial, baik yang berasal dari hewan, tanaman maupun mikroba, salah satunya adalah enzim papain. Enzim papain diisolasi dari getah tanaman papaya (*Carica papaya*) dan telah banyak digunakan secara komersial. Hidrolisat protein dari organisme laut memiliki senyawa bioaktif yang aktif untuk pengujian antikanker (Ngo dkk., 2012).

Kanker merupakan pertumbuhan dan penyebaran sel yang tidak terkendali. Hal ini dapat mempengaruhi hampir setiap bagian dari tubuh. Pertumbuhannya sering menyerang jaringan di sekitarnya dan dapat bermetastasis ketempat yang jauh. Kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia, sekitar 13% dari seluruh kematian pada tahun 2008. Kematian akibat kanker di seluruh dunia diperkirakan akan terus meningkat, dengan perkiraan 13,1 juta kematian pada tahun 2030 (World Health Organization, 2012).

Banyaknya jumlah kematian akibat kanker, menarik perhatian dari para ilmuwan untuk meneliti senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker. Dalam beberapa tahun terakhir, banyak peneliti memanfaatkan bahan alam sebagai target bahan uji, di mana keberadaannya yang melimpah di alam dan juga penggunaan bahan alam dapat meminimalisir efek samping yang ditimbulkan (Nurhajrah, 2013).

nyawa-senyawa yang telah berhasil diisolasi dari spons sebagai
er antara lain metilheksadekanoat dari spons *Ianthellabasta*, fraksi protein
s *Lamellodysideaherbacea*, ekstrak spons laut *Aaptos Suberitoides* yang



menghambat pertumbuhan kanker serta uji toksisitas akut pada Spons Laut *Clathriasp.* (Sukmarianti dkk., 2013; Sumilat, 2017; puji dkk., 2012; Sadarun dkk., 2010).

Sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi senyawa bioaktif protein dari spons *petrosia alfiani* sebagai bahan baku obat antikanker, sehingga dianggap perlu dilakukan eksplorasi yang lebih luas terhadap potensi yang dimiliki oleh spons *petrosia alfiani* tersebut. Selain itu pada penelitian ini diharapkan senyawa protein yang berhasil diisolasi dari spons *petrosia alfiani* menunjukkan adanya efek toksisitas yang menandakan adanya protein yang aktif dan dapat dilanjutkan ketahap selanjutnya.

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa bioaktif protein dari spons *petrosia alfiani* dengan melalui serangkaian proses ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian. Fraksi protein dan peptida yang diperoleh diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap larva udang *Artemia salina Leach*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dimulai dengan rumusan masalah sebagai berikut:

1. bagaimana cara mengisolasi protein bioaktif dari spons *Petrosia alfiani*?
2. berapa konsentrasi protein dari ekstrak kasar dan fraksi protein berbagai kejenuhan dari spons *Petrosia alfiani*?



3. bagaimana pengaruh fraksi protein dan hidrolisat protein dalam spons *petrosia alfiani* memiliki aktivitas antikanker?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa protein bioaktif dari spons *petrosia alfiani* dan mengetahui aktivitasnya sebagai antikanker terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. mengisolasi senyawa protein bioaktif dari spons *petrosia alfiani*.
2. menentukan konsentrasi protein dari ekstrak kasar dan fraksi protein berbagai kejenuhan dari spons *Petrosia alfiani*.
3. menentukan fraksi protein dan hidrolisat protein yang memiliki aktivitas sebagai antikanker terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

1.4 Manfaat Penelitian

Secara umum penelitian ini dilakukan untuk memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Adapun secara khusus manfaat penelitian ini adalah memberikan nilai tambah pada pemanfaatan spons *petrosia alfiani* dan sebagai sumber informasi mengenai komponen senyawa bioaktif dari spons *petrosia alfiani* yang dapat digunakan sebagai bahan obat antikanker.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Spons

Spons termasuk hewan metazoa multiseluler yang tergolong kedalam Filum Porifera. Porifera berasal dari kata Pori = pori-pori, Fera/Faro = memiliki (Ahmad dan Suryati, 1996). Spons merupakan invertebrata laut multi sel yang fungsi jaringan dan organnya sangat sederhana yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Biota laut ini dikenal dengan *filter feeder*, yaitu mencari makanan dengan mengisap dan menyaring air melalui sel cambuk dan memompakan air keluar melalui oskulum. Partikel-partikel makanan seperti bakteri, mikroalga dan detritus terbawa oleh aliran air ini (Rosmiati dan Suryati, 2001; Amir dan Budiyanto, 1996).

Morfologi luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam spons cenderung memiliki tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat lingkungan dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal (Amir dan Budiyanto, 1996).

Spons dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, atau bentuknya dan agak tidak teratur. Banyak spons juga terdiri dari segumpal yang tak tentu bentuknya, menempel dan membuat kerak pada batu,



cangkang, tonggak, atau tumbuh-tumbuhan. Kelompok spons lain mempunyai bentuk lebih teratur dan melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk yang dimiliki spons dapat beragam. Beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, seperti cawan atau seperti kubah. Ukuran spons juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0.9 m dan tebalnya 30.5 cm. Jenis-jenis spons tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya (Romimohtarto dan Juwana, 2001).

Spons adalah hewan yang termasuk Filum Porifera terdiri dari tiga kelas, yaitu: Calcarea, Demospongiae, dan Hexactinellida sedangkan menurut Ruppert dan Barnes (1991) Filum Porifera terdiri dari empat kelas, yaitu:

1. Kelas Calcarea adalah kelas spons yang semuanya hidup di laut. Spons ini mempunyai struktur sederhana dibandingkan yang lainnya. Spikulanya terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk *calcite*.
2. Kelas Demospongiae adalah kelompok spons yang terdominan di antara Porifera masa kini. Mereka tersebar luas di alam, serta jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercabuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa (Dictyoceratida, Dendroceratidada dan Verongida) spikulanya hanya terdiri dari serat spongin, serat kolagen atau spikulanya tidak ada.

Hexactinellida merupakan spons gelas. Mereka kebanyakan hidup di dalam dan tersebar luas. Spikulanya terdiri dari silikat dan tidak mengandung sponging.



4. Kelas Sclerospongia merupakan spons yang kebanyakan hidup pada perairan dalam di terumbu karang atau pada gua-gua, celah-celah batuan bawah laut atau terowongan di terumbu karang. Semua jenis ini adalah bertipe leuconoid kompleks yang mempunyai spikula silikat dan serat spongin. Elemen-elemen ini dikelilingi oleh jaringan hidup yang terdapat pada rangka basal kalsium karbonat yang kokoh atau pada rongga yang ditutupi oleh kalsium karbonat (Warren 1982; Ruppert dan Barnes 1991).

Spons adalah salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons laut telah banyak diketahui manfaatnya. Senyawa bioaktif tersebut dihasilkan oleh sel-sel spons itu sendiri, mikrosimbiotanya, atau keduanya secara bersama-sama (Haris, 2001).

Spons merupakan sumber senyawa bahan alam seperti terpenoid, poliketida, alkaloid, dan masih banyak lagi senyawa-senyawa yang lain. Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi biomedik yang berguna bagi penyembuhan penyakit tertentu pada manusia, misalnya sebagai antikanker, antibiotik, antitumor, antiinflamasi, inhibitor enzim, dan sifat-sifat lainnya (Ralph, 1998).

Spons juga diduga mengandung senyawa peptide, glikosida, saponin, steroid, amina, asam fenolik dan squalen serta turunannya yang dihasilkan dari metabolit sekunder. Spons juga kaya akan senyawa kimia seperti keratin, asam amino bebas, sterol, asam lemak, brominat phenol, derivat senyawa dibromotyrosine dan bromopyrol. Spons yang telah berhasil dipisahkan

dan bioaktifnya mengandung sterol yang telah diidentifikasi dari spons sianasterol, poriferasterol dan chondrillasterol (Ralph, 1998). Beberapa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia dapat dilihat pada Tabel 1.



Tabel 1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia (Rachmat, 2008)

Lead Compound	Aktivitas	Biota Asal
Aaptamine	Sitotoksik	<i>Aaptos aaptos</i>
Barangamide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Bitungolide A-F	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Brianthein A	Sitotoksik	<i>Brianthein exvacatum</i>
Demethyl aaptamin	Sitotoksik	<i>Aaptos aaptos</i>
Isomisakinolide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Jaspamide	Sitotoksik	<i>Jaspis splendens</i>
Lembehyne A	MDR	<i>Haliclonia sp</i>
Luteoresin	Sitotoksik	<i>Chaelonaphysilla sp</i>
Mcfarlandin	Sitotoksik	<i>Chaelonaphysilla sp</i>
Melophlin A dan B	Sitotoksik	<i>Meloplus sarassinorum</i>
Methyl scalarycin B New	Sitotoksik	<i>Carteriospongia foliascens</i>
Sesterpenes	Sitotoksik	<i>Phyllospongia sp</i>
Sarasinocide A	Sitotoksik	<i>Meloplus sarassinorum</i>
Scalarycin	Sitotoksik	<i>Carteriospongia foliascens</i>
Swinholide A	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Theonella peptolide	Sitotoksik	<i>Theonella swinhoei</i>
Xestoquinone	Sitotoksik	<i>Xestospongia sp</i>

Dari spons *Theonella swinhoei* yang dikumpulkan dari perairan Barranglompo Sulawesi Selatan, telah diisolasi senyawa aktif yang diberi nama Barangamide A. Barangamide merupakan senyawa baru berupa undcapeptidesiklik yang memiliki tiga unit N-methylated aminoacid, dan tiga β -alanine yang saling berikatan secara bergantian. Barangamide A telah diuji

nya terhadap sel leukemia limposit dan menunjukkan aktivitas sitotoksik menunjukkan dengan IC_{50} 1,3-2,4 μ m/ml. Bitungolides A diisolasi dari spons



Theonella swinhoei yang dikumpulkan dari perairan Bitung. Bitungolide merupakan substance berupa polyketides. Bitungolides menunjukkan aktivitas sitotoksik IC₅₀ 10 µg/ml (Rachmat, 2008).

2.2 Tinjauan Spons *Petrosia Alfiani*

2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi spesies spons yang menjadi objek penelitian ini adalah sebagai berikut (de Voogd dan Van Soest, 2002):

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Porifera
Class	: Demospongiae
Subclass	: Heteroscleromorpha
Order	: Haplosclerida
Suborder	: Petrosina
Family	: Petrosidae
Genus	: <i>Petrosia</i>
Specific name	: <i>alfiani</i>
Scientific name	: <i>petrosia alfiani</i>

2.2.2 Morfologi

Morfologi luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisika, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka

lebih besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat.

Sementara itu spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindungi atau

perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung



tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam spons cenderung memiliki tubuh yang simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama pada perairan yang dangkal (de Voogd dan Van Soest, 2002).

Spons dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, atau masif dan agak tidak teratur. Banyak spons juga terdiri dari segumpal jaringan yang tak tentu bentuknya, menempel dan membuat kerak pada batu, cangkang, tonggak, atau tumbuhan. Kelompok spons lain mempunyai bentuk lebih teratur melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk yang dimiliki spons dapat beragam. Beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, seperti cawan atau seperti kubah. Ukuran spons juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5 cm. Jenis-jenis spons tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya. Morfologi spons *petrosia alfiani* dapat dilihat pada Gambar 1 (de Voogd dan Van Soest, 2002).



Gambar 1. Morfologi dari Spons *Petrosia alfiani*
(de Voogd dan Van Soest, 2002).



2.3 Tinjauan Senyawa Protein

Protein berasal dari kata *protos* dan *proteos* yang berarti pertama atau utama. Protein merupakan komponen penting atau komponen utama sel hewan atau manusia. Proses kimia dalam tubuh dapat berlangsung karena dengan baik karena adanya enzim, yaitu protein yang berfungsi sebagai biokatalis. Zat-zat yang berperan untuk melawan bakteri penyakit atau yang disebut antigen, juga suatu protein. Protein dari makanan ada yang berasal dari hewan dan tumbuhan. Protein yang berasal dari hewan disebut protein hewani, sedangkan protein yang berasal dari tumbuhan disebut protein nabati. Protein adalah polipeptida yang mempunyai bobot molekul yang sangat bervariasi, dari 5000 hingga lebih dari satu juta (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

Protein merupakan suatu zat makanan yang amat penting bagi tubuh, karena zat ini berfungsi sebagai zat pembangun dan pengatur. Protein adalah sumber asam amino yang mengandung unsur-unsur C, H, O, dan N (Winarno, 1992). Protein merupakan bagian terpenting dari sel-sel tubuh dan merupakan bagian terbesar dari substansi kering dari organ-organ tubuh dan otot-otot. Segala jenis protein mengandung unsur nitrogen, karbon, hidrogen, oksigen, dan belerang (Sediaoetama, 1976).

Protein memiliki empat tingkat struktur dasar yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuaterner. Struktur primer menunjukkan jumlah, jenis dan urutan asam amino dalam molekul protein. Oleh karena ikatan antarasam amino

an peptida, maka struktur primer protein juga menunjukkan ikatan peptida
annya diketahui. Pada rantai polipeptida terdapat banyak gugus C=O dan
H. Kedua gugus ini dapat berikatan satu sama lain karena adanya ikatan



hidrogen. Apabila ikatan hidrogen ini terbentuk antara gugus-gugus yang terdapat dalam satu rantai polipeptida, akan terbentuk struktur heliks. Ikatan hidrogen dapat terjadi antara dua rantai polipeptida atau lebih dan membentuk konfigurasi α yaitu bentuk rantai sejajar yang berkelok-kelok dan disebut struktur lembaran berlipat. Struktur α heliks dan lembaran berlipat merupakan struktur sekunder protein. Struktur tersier menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk lipatan atau gulungan, dan membentuk struktur yang lebih kompleks. Struktur ini dimantapkan dengan adanya beberapa ikatan antara gugus R pada molekul asam amino yang membentuk protein. Struktur kuantener menunjukkan derajat persekutuan unit-unit protein. Sebagian besar protein globular terdiri atas beberapa rantai polipeptida yang terpisah dimana rantai polipeptida ini saling berinteraksi membentuk persekutuan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

2.4 Tinjauan Protein Antikanker

Hubungan struktur aktivitas obat berkaitan dengan struktur dari suatu senyawa aktif obat dengan efek yang ditimbulkannya. Struktur senyawa aktif obat akan berikatan dengan reseptor target yang berkaitan dengan efek farmakologis yang akan ditimbulkan. Misalnya senyawa antikanker, salah satu senyawa yang berkhasiat sebagai antikanker Jenis-jenis protein antikanker yang telah berhasil diisolasi yaitu:

1. *Ribosome Inactivating Protein* (RIP)

Ribosome Inactivating Protein (RIP) merupakan protein yang umumnya dari tanaman dan bersifat sitotoksik terhadap sel mamalia. Hal ini karena rRNA N-glikosidase dan purin glikosidase sehingga menyebabkan sel mamalia. Selain itu, RIP juga mampu menginduksi apoptosis bagi



sel yang rusak, dan bersifat antioksidan sehingga RIP merupakan kandidat antikanker yang baik. RIP dapat dikonjugasi dengan antibodi monoklonal sebagai imunotoksin sehingga mempunyai efek yang selektif hanya terhadap sel target (Sudjadi dan Sismindari, 2011).

2. Parasporin

Parasporin (PS) merupakan kumpulan protein Cry genealogis heterogen yang disintesis dari *Bacillus thuringiensis*. Hal yang menonjol dari protein parasporin adalah aktivitas cytocidal yang kuat khusus untuk sel-sel kanker manusia. Protein menunjukkan aktivitas cytocidal hanya bila dicerna oleh protease. Saat ini kelompok protein diklasifikasikan menjadi empat famili: PS1, PS2, PS3 dan PS4 (Ohba dkk., 2009).

2.5 Tinjauan Isolasi Dan Pemurnian Protein

Dasar dari pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama. Secara umum isolasi protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu ekstraksi, fraksinasi dengan *salting out* dan dialisis (Dennison, 2002).

2.5.1 Ekstraksi

Material yang memiliki aktifitas enzim diperlakukan untuk memindahkan protein ke dalam bentuk terlarut sehingga dapat dimanipulasi. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman maka perlu dilakukan metode penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan. Kemudian untuk mendapatkan ekstrak

ini dilakukan filtrasi atau sentrifugasi untuk memisahkan material yang padat dan debris sel, maka didapatkan homogenat (Palmer, 1991).



Enzim-enzim yang terdapat dalam sitoplasma dapat diekstrak dengan penghancuran membran plasma sel sehingga enzim dapat keluar kedalam medium ekstraksi. Namun enzim terlarut dalam organel atau sel eukariotik membutuhkan penghancuran membran sel yang lebih keras. Dari material berupa sereal atau tepung enzim dapat diekstrak dengan hanya menempatkan dalam medium cair dan pengadukan (Palmer, 1991).

Medium ekstraksi (larutan buffer) dimana enzim akan keluar setelah sel mengalami pemecahan harus dijaga temperaturnya dibawah 4 °C agar enzim dalam sel hidup tidak aktif sehingga meminimalkan kehilangan aktifitas. Selain itu pH yang dipakai adalah pH dimana enzim tersebut stabil serta harus jauh dari titik isoelektrik enzim karena pada titik ini kelarutan protein paling rendah (Scopes,1994).

2.5.2 Fraksinasi Dengan *Salting out*

Metode yang paling banyak dipakai adalah fraksinasi dengan menggunakan konsentrasi garam yang tinggi, biasa disebut *salting-out*. Kelarutan protein dalam media air diperkuat oleh pembentukan interaksi ionik lemah termasuk ikatan hidrogen antara molekul terlarut dengan air (Scopes, 1994).

Ikatan hidrogen antara protein dengan air menstabilkan protein dalam larutan, namun disamping itu terbentuk pula interaksi antara yang bersifat non-polar antara sesama molekul protein. Interaksi ini membentuk suatu daerah non-polar tunggal yang memaksa air keluar dan membentuk suatu lingkungan

ofobik (Scopes, 1994).

dengan mengendapkan enzim dengan metode ini maka enzim akan dari mono-, oligo- sakarida, nukleotida, asam amino bebas, protein lain



yang tertinggal dalam larutan. Konsentrasi garam ditingkatkan bertahap dengan tujuan mendapatkan endapan protein yang diinginkan dan membuang endapan protein yang tidak diinginkan. Kemudian endapan tersebut dilarutkan kembali dan sisa garam dihilangkan dengan dialisis, maka sampai disini didapatkan ekstrak enzim kasar (Palmer, 1991).

2.5.3 Dialisis

Dialisis merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel ketika membran menjadi batas antara dua larutan yang berbeda konsentrasi. Membran bertindak seperti saringan dengan ukuran pori tertentu. Molekul dengan jari-jari molekul yang lebih besar dari ukuran pori akan tertahan seluruhnya sedangkan yang berjari-jari lebih kecil akan lolos (Scopes, 1994).

2.6 Tinjauan Hidrolisis Protein

Protein terdiri atas rantai asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida sehingga membentuk beragam struktur yang kompleks. Reaksi hidrolisis protein bertujuan untuk mengubah protein menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu asam amino dan peptida melalui pemutusan ikatan peptida, sehingga dapat lebih mudah untuk dimanfaatkan oleh tubuh. Hidrolisis protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu hidrolisis asam, basa dan enzimatis. Setiap protein akan menghasilkan campuran atau proporsi asam amino yang khas setelah reaksi

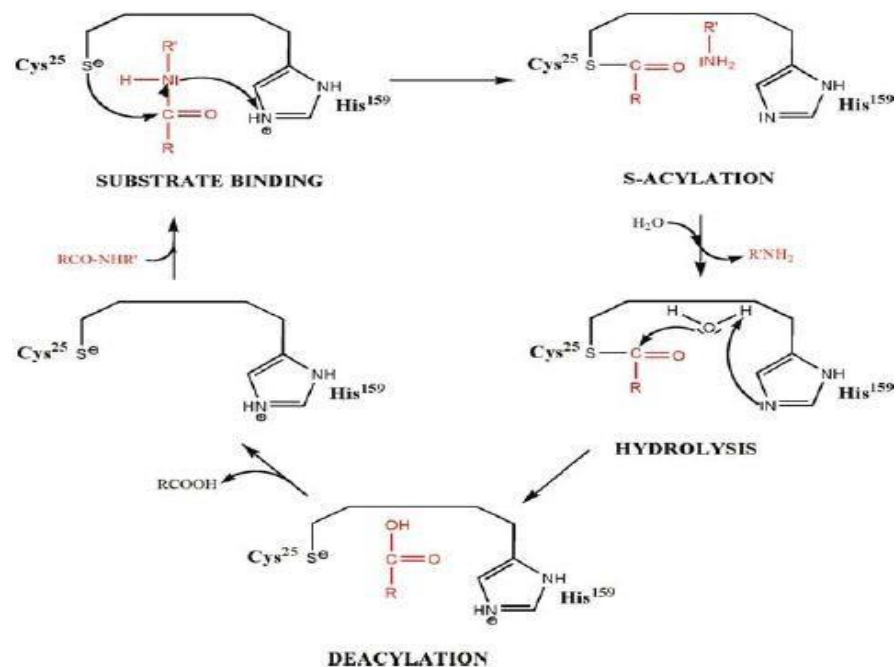
(Vaclavik dan Christian 2008).

Hidrolisis asam maupun basa merupakan proses yang keras dan pada suhu tinggi. Hidrolisis asam maupun basa dapat memutuskan ikatan



peptida pada protein, namun juga dapat merusak sejumlah asam amino yang terkandung pada produk yang dihasilkan. Hidrolisis protein menggunakan enzim proteolitik merupakan cara yang lebih efisien dan aman karena dapat menghasilkan hidrolisat protein yang terhindar dari kerusakan asam amino tertentu akibat penggunaan asam kuat, basa kuat, maupun suhu tinggi pada reaksi hidrolisis asam maupun basa. Reaksi hidrolisis protein menggunakan enzim akan memutus ikatan peptida yang ditargetkan secara spesifik (BD Biosciences 2009).

Hidrolisis protein enzimatis menggunakan enzim papain. Papain merupakan enzim proteolitik yang berasal dari pepayah (Purnomo,2005). Enzim papain memiliki kemampuan untuk memecah molekul protein. Mekanisme hidrolisis protein oleh enzim papain dapat dilihat pada Gambar 2. Faktor yang mempengaruhi kecepatan hidrolisis secara enzimatis adalah suhu, waktu, pH, inhibitor, serta konsentrasi enzim dan substrat (Damodaran 1996).



Gambar 2. Mekanisme hidrolisis protein oleh enzim papain (Grzonka dkk., 2007).



2.7 Metode Uji Aktivitas Antikanker dengan Uji Toksisitas Metode Bslt (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat perlu dilakukan uji khasiat terhadap bahan aktifnya. Salah satu metode yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) yang merupakan skrining awal bahan aktif dari suatu ekstrak tumbuhan. *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) adalah suatu *bioassay* untuk mendeteksi bioaktivitas dari suatu tumbuhan. *Bioassay* dianggap sebagai metode yang berguna untuk tahap awal dalam mengetahui tingkat toksisitas ekstrak tumbuhan dalam mendeteksi racun jamur, toksisitas ekstrak tumbuhan serta toksisitas logam berat. *Bioassay* ini mudah dilakukan, murah dan hanya memerlukan sedikit bahan uji. Metode ini merupakan skrining awal yang dapat disempurnakan oleh *bioassay* lainnya yang lebih spesifik dan lebih mahal setelah senyawa aktif dari suatu bahan uji dapat dipisahkan seperti Lemna Minor Bioassay, Crown-Gall Potato Disc Bioassay serta Pengujian pada sel telur babi. Metode ini diperkenalkan oleh Meyer tahun 1982, uji letalitas ini telah berhasil dipakai sebagai *bioassay-guide* untuk fraksinasi agen-agen sitotoksik dan antitumor (Srisadono, 2008).

Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan hampir selalu toksik pada dosistinggi, oleh karena itu daya bunuh senyawa aktif terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk membuktikan ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan juga memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian.

Organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah *Artemia* (udang laut) *Artemia salina* (Suhirman dkk, 2012).



Artemia yang termasuk dalam spesies *Artemia salina* Leach adalah udang yang termasuk dalam famili *Artemidae* yang merupakan udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai zooplankton yang menempati perairan-perairan yang memiliki kadar garam tinggi. *Artemia* dapat digunakan di Laboratorium *bioassay* untuk menentukan toksisitas dengan perhitungan konsentrasi yang menimbulkan 50% kematian (LC_{50}) yang telah dilaporkan untuk racun dari ekstrak tanaman atau tumbuhan. Istilah untuk telur *artemia* adalah *siste* yaitu telur yang telah berkembang menjadi embrio dan kemudian diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan. *Artemia* yang direndam dalam air laut bersuhu 25 °C maka akan menetas dalam waktu 24-36 jam menjadi larva (naupli). *Artemia* dapat tumbuh dengan baik pada suhu antara 25 °C - 30 °C dengan kadar garam yang tinggi dengan pH = 8. Larva yang telah menetas memiliki warna merah, yang dapat dilihat pada gambar berikut ini (Panjaitan, 2011).



Gambar 3. Larva *Artemia salina* Leach (Dumitrascu, 2011)



tingkat toksisitas senyawa antikanker terhadap hewan uji dalam ekstrak
n dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dilakukan dengan

cara menghitung tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC_{50} . Suatu senyawa dianggap aktif apabila senyawa memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm dan tingkat kematian dari larva udang sebanyak 50% terhadap ekstrak uji (Lisdawati dkk, 2006).

