

Skripsi

**ISOLASI PROTEIN DAN HIDROLISAT PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION TERIPANG HITAM *Holothuria atra* SEBAGAI
AGEN ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN**

M. ILHAM ADI PUTRA

H031181506



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**ISOLASI PROTEIN DAN HIDROLISAT PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION TERIPANG HITAM *Holothuria atra* SEBAGAI
AGEN ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN**

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

Oleh

M. ILHAM ADI PUTRA

H031 18 1506



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI PROTEIN DAN HIDROLISAT PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION TERIPANG HITAM *Holothuria atra* DAN
POTENSINYA SEBAGAI AGEN ANTIKANKER DAN ANTIOKSIDAN**

Disusun dan diajukan oleh

M. ILHAM ADI PUTRA

H031 18 1506

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

Pada 11 Juli 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

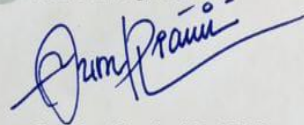
Menyetujui,

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Ahyar Ahmad
NIP. 19671231 199103 1 020

Pembimbing Pertama



Dr. Nur Umrani P., M.Si.
NIP. 19811209 200604 2 003

Ketua Program Studi



Dr. St Fauziah, M.Si.
NIP. 19720202 199903 2 00202

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : M. Ilham Adi Putra

NIM : H031181506

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Isolasi Protein dan Hidrolisat Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Teripang Hitam *Holothuria atra* Sebagai Agen Antikanker dan Antioksidan” adalah benar karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari Skripsi saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 11 Juli 2023

Yang Menyatakan



M. Ilham Adi Putra

PRAKATA

Bismillahirrahmananirrahim, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi Protein dan Hidrolisat Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Teripang Hitam *Holothuria atra* sebagai Agen Antikanker dan Antioksidan”**.

Shalawat dan salam tak lupa tercurahkan kepada Baginda Rasulullah SAW, kepada keluarganya, para sahabatnya, dan kepada umatnya hingga akhir zaman. Berhasilnya penulis dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini menandakan berakhirnya salah satu dimensi perjuangan sebagai syarat dalam memperoleh gelar sarjana di Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Kepada orang tua tercinta, ayahanda almarhum **Suryadi S.E**, dan ibunda **Sumi Sanuriah**, terima kasih untuk setiap semangat, bantuan, kasih sayang, dan doa yang senantiasa tak henti-hentinya diberikan kepada saya, semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang, keteguhan hati di atas agama Allah SWT, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat InsyaAllah. Terima kasih juga kepada Saudari saya **Rizky Amalia Suryadi, S.Ars., M.B.A.** yang selalu memberikan motivasi untuk saya, serta penyemangat bagi saya, semoga Allah senantiasa melindungi mereka di jalan kebenaran, Aamiin.

Ucapan terima kasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini, terutama kepada ayahanda **Prof. Ahyar Ahmad** selaku pembimbing utama dan Ibunda **Dr. Nur Umriani P, M.Si** selaku pembimbing pertama yang menjadi orang tua di kampus dan senantiasa meluangkan tenaga dan pikirannya dalam membimbing dan memberikan arahan yang baik, terutama dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebenarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin, S.Si, M.Si** selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.
2. Ketua Departemen Kimia Ibu **Dr. St. Fauziah, S.Si, M.Si** dan sekretaris jurusan ibu **Dr. Nur Umriani P, M.Si**, beserta dosen dan staf Departemen Kimia yang telah membantu penulis dalam perjalanan menyelesaikan pendidikan ini.
3. Dosen Penguji ujian sarjana kimia, yaitu ibu **Dr. Indah Raya, M.Si** selaku Ketua Tim Penguji dan bapak **Andi Muh. Anshar, S.Si, M.Si**, selaku Sekretaris Tim Penguji.
4. Seluruh **Analisis Laboratorium** di Departemen Kimia, terkhusus untuk **Kak Mahdalia S.Si, M.Si**, selaku analis Laboratorium Biokimia atas bantuan serta arahannya selama penelitian berlangsung. Terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.
5. Rekan partner penelitian **Muh. Jusliandi S.Si, Salman Amir, Reyke Tyara Datu dan Sitti Nurjihad** dan rekan penelitian Laboratorium Biokimia **Esry, Namira, Wahda, Ijul, Fatimah, Nining, Nadia, Feni, Viny, Anti, dan Sulfi**, terima kasih atas semangat, penghibur dikala suka dan duka, serta memberikan warna dalam kehidupan Laboratorium Biokimia.
6. Teman-teman **Kimia 2018** yang merupakan saudara seperjuangan dalam menimba ilmu di jurusan kimia. Terkhusus saudara-saudariku **HIBRIDISASI 2018**, terima kasih atas kebersamaan dan pengalaman, suka dan duka yang tak terlupakan “HMK Tempat Kita Dibina, HMK Tempat Kita Ditempa”.

7. **Kak Akbar, Kak Emi, Kak Bahrin, Kak Mira, Kak Yura, Kak Moel, Kak Fhadli, Kak Nure, Kak Nabeela, Kak Asmi, Kak Elva, Kak Nandar, Kak Lulu, Kak Dhiaz, Pak La Kolo, Bu Dijah, Bu Sarni Adek Riska, Adek Yolanda dan Adek Agnes** yang selalu menjadi tempat bertanya dan berkeluh kesah selama proses penelitian berlangsung sampai terselesaikan skripsi ini.
8. Coach, Kakak-Kakak, Teman-teman dan Adek-adek **UKM PSM UNHAS, Kak Arik, Kak Idho, Kak Baso, Kak Alam, Kak Firman, Kak Huma, Kak Fajrin, Kak Nila, Kak Ira, Kak Meldrix, Kak Ragil, Kak Zaza Ikhwan, Ingrid, Alfaath, Dhaif, Wahyu, Idef, Pute, Putu, Ryan, Lulu, Baso, Dzakwan, Fate, Eci, Maya, Willy, Syefa, Mercy, Dani, Havidz, Dylan**. Terima kasih atas kebersamaannya selama 3,5 tahun.
9. Teman Penyemangat dan penolong penelitian isolasi bakteri **Shamad S.Si** dan saudara pemberi semangat sekaligus teman main ML **Bro Nawir, Mas Faqih, Mas Zidane, Mas Ray, dan Mas Axel**
10. Semua pihak yang telah banyak membantu penulisan selama penelitian, terima kasih.

Penulis Sadar bahwa laporan skripsi ini tidak sempurna dan banyak kekurangan baik materi maupun teknik penulisannya, karena sejatinya kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Oleh karena itu, penulis berharap saran dan kritikan yang bersifat membangun dari pembaca, dan semoga dapat memberikan manfaat bagi siapa saja dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang biokimia.

Makassar, Juni 2023

Penulis

ABSTRAK

Bakteri simbios teripang hitam sering digunakan sebagai bahan baku obat, karena memiliki berbagai kandungan senyawa bioaktif. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbios penghasil protein bioaktif dari teripang hitam asal Pulau Samalona, Kecamatan Mariso, Kelurahan Mariso, Kota Makassar, Sulawesi Selatan. Selain itu, protein bioaktif yang telah diisolasi diidentifikasi aktivitas biologisnya yaitu antioksidan dan toksisitas. *Holothuria atra* yang teridentifikasi sebagai *Enterobacter* sp. menggunakan metode PCR dan sekuensing gen berbasis 16S rRNA (63F dan 1387R) serta uji biokimia. Protein ekstraseluler dan intraseluler diisolasi menggunakan metode fraksinasi amonium sulfat pada tingkat kejenuhan (F1) 0–20%, (F2) 20–40%, (F3) 40–60% dan (F4) 60–80%. Prapemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan dengan total protein ekstraseluler F1 3,124 mg; F2 10,692 mg; F3 20,979 mg; F4 28,609 mg dan protein intraseluler F1 33,291 mg; F2 9,086 mg; F3 21,894 mg; F4 32,914 mg. Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang menunjukkan bahwa fraksi protein F2 Ekstraseluler diperoleh nilai IC_{50} sebesar 78,42 ppm. Uji toksisitas dengan BSLT didapatkan pada fraksi protein F4 ekstraseluler memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} 54,21 ppm.

Kata kunci: Antikanker, Antioksidan, *Enterobacter* sp, Protein Bioaktif, Teripang Hitam.

ABSTRACT

Symbiotic bacteria of black sea cucumber is commonly used as medicine precursor due to its varieties of bioactive compound content. The aim of this research is to isolate and identify symbiotic bacteria or black sea cucumber from Samalona Island, Subdistrict Mariso, District Mariso, Makassar City, South Sulawesi. In addition bioactive protein that has been isolated identified biological activity that is antioxidant and toxicity. *Holothuria atra*, identified as *Enterobacter* sp. using PCR method and gene sequencing with 16S rRNA-based (63F and 1387R) include biochemistry test, Extracellular and intracellular protein was isolated by ammonium sulphate fractionation method at saturation level (F1) 0–20%, (F2) 20–40%, (F3) 40–60% and (F4) 60–80%. Protein Pre-clearance done by dialysis method using cellophane tube with total extracellular protein F1 3,124 mg; F2 10,692 mg; F3 20,979 mg; F4 28,609 mg and protein intracellular F1 33,291mg; F2 9,086 mg; F3 21,894 mg; F4 32,914 mg. Antioxidant activity test by protein fraction F2 extracellular with IC₅₀ value 78,42 ppm and toxicity test by BSLT method showed protein fraction F4 to have the highest toxicity with LC₅₀ value 54,21 of ppm.

Key word: Anticancer, Antioxidant, *Enterobacter* sp, bioactive protein, black sea cucumber

DAFTAR ISI

	halaman
SAMPUL.....	i
LEMBAR PENGAJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
PRAKATA.....	v
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xx
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Maksud Penelitian	6
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Teripang Hitam (<i>Holothuria atra</i>).....	7

2.2 Senyawa Aktif pada Teripang Hitam (<i>Holothuria atra</i>).....	9
2.3 Bakteri Simbion.....	10
2.4 Hidrolisis Protein secara Enzimatik	10
2.5 Peptida Bioaktif.....	13
2.6 Tinjauan Umum Antikanker.....	15
2.7 Tinjauan Umum Peptida Antikanker.....	16
2.8 <i>Ribosome-Inactivating Protein (RIP)</i>	18
2.9 Tahapan Pemurnian Enzim.....	19
2.9.1 Ekstraksi	19
2.9.2 Fraksinasi dengan <i>Salting Out</i>	20
2.9.3 Dialisis.....	21
2.10 Metode Uji Aktivitas Antikanker dengan Uji Toksisitas Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	22
2.11 Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikridrazil).....	23
2.12 Uji Antikanker.....	24
BAB III METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Bahan Penelitian.....	26
3.2 Alat Penelitian	26
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.4 Prosedur Penelitian.....	27
3.4.1 Pembuatan Media	27
3.4.1.1 Pembuatan Media <i>Nutrien Agar (NA)</i>	27
3.4.1.2 Pembuatan Media <i>Nutrient Broth (NB)</i>	28
3.4.1.3 Pembuatan Media <i>Malt Yeast Agar (MYA)</i> ..	28
3.4.1.4 Pembuatan Media Inokulum	28

3.4.1.5 Pembuatan Media Produksi.....	28
3.4.2 Pembuatan Buffer	29
3.4.2.1 Pembuatan Buffer A.....	29
3.4.2.2 Pembuatan Buffer B	29
3.4.2.3 Pembuatan Buffer C	29
3.4.3 Preparasi Sampel	30
3.4.4 Preparasi Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i> (NB).....	30
3.4.4.1 Bagian Permukaan Teripang Hitam	30
3.4.4.2 Bagian Dalam Teripang Hitam	30
3.4.5 Isolasi Bakteri Symbion	31
3.4.6 Identifikasi Morfologi Bakteri Symbion	31
3.4.7 Isolasi DNA Kromosom Isolat Penghasil Peptida ..	32
3.4.8 Amplifikasi Gen 16S rRNA dan Analisis Pohon Filogenik.....	33
3.4.9 Elektroforesis Gel Agarosa dan Visualisasi Gen 16S rRNA	33
3.4.10 Sekuensing Gen 16S rRNA	34
3.4.11 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Protein Bioaktif	34
3.4.12 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri Symbion.....	35
3.4.13 Pemurnian Protein Bioaktif	36
3.4.12.1 Fraksinasi Ammonium Sulfat.....	36
3.4.12.2 Dialisis.....	36
3.4.14 Penentuan Kadar Protein	37
3.4.15 Hidrolisis Protein.....	38

3.4.16 Penentuan Derajat Hidrolisis	38
3.4.17 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM	39
3.4.18 Pembuatan Larutan Induk Asam Askorbat 500 ppm.....	39
3.4.20 Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Peptida dengan Metode DPPH.....	40
3.4.21.1 Penyiapan Larva Udang <i>Artemia salina</i>	42
3.4.21.2 Pengujian Toksisitas Fraksi Peptida dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	40
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Isolasi Bakteri Simbion Teripang Hitam <i>Holothuria atra</i>	42
4.2 Identifikasi Morfologi Bakteri Simbion	44
4.3 Identifikasi Spesifikasi Bakteri secara Molekuler	47
4.3.1 Ekstraksi DNA.....	47
4.3.2 Amplifikasi DNA dengan Metode PCR dan Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	49
4.3.3 Analisis Sekuens DNA Gen 16S rRNA Bakteri Penghasil Protein.....	52
4.4 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri	55
4.5 Pemurnian Protein Bioaktif	57
4.6 Hidrolisis Enzimatik.....	60
4.7 Uji Antioksidan Fraksi Protein Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	63
4.8 Uji Aktivitas Antikanker melalui Uji Toksisitas Fraksi Protein Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	67
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
5.1 Kesimpulan.....	72

5.2 Saran	72
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN	87

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Enzim Proteolitik Spesifik	13
2. Peptida yang Beredar di Pasaran.....	14
3. Peptida Antikanker dari Organisme Laut	17
4. Tingkat Toksisitas Berdasarkan Nilai LC ₅₀	23
5. Tingkat Kekuatan Antioksidan Berdasarkan Nilai IC ₅₀	24
6. Tingkat Kekuatan Antioksidan Berdasarkan Nilai LC ₅₀	25
7. Hasil Identifikasi Morfologi Bakteri Simbion	44
8. Hasil Analisis Sekuens DNA Bakteri ETH 7(2).....	52
9. Distribusi Kadar Protein Intraseluler dan Ekstraseluler Tiap Dialisat pada Beberapa Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	59
10.Data Kadar Protein Hidrolisat Protein Intraseluler dan Ekstraseluler ..	62
11.Nilai IC ₅₀ dari Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal DPPH	63
12.Uji Aktivitas Antikanker melalui Uji Toksisitas dari Setiap Fraksi Protein Bioaktif Bakteri <i>Enterobacter</i> sp.....	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Teripang Hitam <i>Holothuria atra</i>	8
2. Mekanisme Hidrolisis Protein Oleh Enzim Papain	11
3. Hidrolisis Enzimatik Secara Umum.....	12
4. Metatesis Sel Kanker	16
5. Reaksi DPPH Dengan Senyawa Antioksidan.....	24
6. Kode 1: ETH 71(0); Kode 2: ETH 7(2); Kode 3: ETH 10(1); Kode 4: ETH 10(2); Kode 5: ITH 7(1); Kode 6: ITH 7(2); Kode 7: ITH 10(1) Kode 8 ITH 10(2).....	43
7. Hasil Ekstraksi DNA isolat simbion penghasil protein ETH 7(1).....	49
8. Elektroferogram amplicon 16S rRNA M = <i>DNA Marker</i> (100 bp merk vivantis).....	51
9.a Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Produksi Intraseluler dan Pertumbuhan Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	55
9.b Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Produksi Intraseluler dan Pertumbuhan Bakteri <i>Enterobacter sp</i>	56
10.a Data Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Hidrolisat dan Persentase Derajat Hidrolisis Fraksi F4 (Ekstraseluler).....	61
10.b Data Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Hidrolisat dan Persentase Derajat Hidrolisis Fraksi F1 (Intraseluler)	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Lokasi Pengambilan Sampel Teripang Hitam <i>Holothuria atra</i>	88
2. Diagram Alur Penelitian	89
3. Bagan Prosedur Kerja Pembuatan Media	90
4. Bagan Kerja Preparasi Sampel.....	92
5. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Morfologi Bakteri Simbion	93
6. Bagan Kerja Produksi dan Ekstraksi Bioaktif.....	96
7. Bagan Kerja Fraksinasi Bioaktif dengan Amonium Sulfat.....	97
8. Bagan Kerja Dialisis	98
9. Bagan Kerja Prosedur Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Lowry	99
10. Bagan Kerja Hidrolisis Protein	100
11. Bagan Kerja Pembuatan Reagen Pengujian Antioksidan	101
12. Bagan Kerja Penentuan Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat dengan Metode DPPH.....	102
13. Bagan Kerja Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Protein dengan Metode DPPH.....	103
14. Bagan Kerja Penentuan Aktivitas Antioksidan Fraksi Peptida dengan Metode DPPH.....	104
15. Bagan Kerja Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	105
16. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl.....	106
17. Penentuan Protein dengan Metode Lowry	107
18. Hasil Uji Identifikasi Spesies Teripang Hitam <i>Holothuria atra</i>	108

19. Penentuan Serapan Maksimum (λ maksimum).....	109
20. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) pada λ 650 nm.....	110
21. Seleksi Pengenceran Bertingkat.....	111
22. Penentuan Isolat Bakteri dengan Protein Peptida Tertinggi	112
23. Data Hasil Penelitian Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Teripang Hitam <i>Holothuria atra</i> dan Nilai <i>Optical Density</i>	113
24. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Ekstraseluler (λ 650 nm)	114
25. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler (λ 650 nm)	115
26. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan	116
27. Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat.....	117
28. Pengukuran Kadar pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein	118
29. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.....	120
30. Hidrolisis Protein	121
31. Harga Probit Sesuai dengan Persentasenya.....	122
32. Hasil Perhitungan LC_{50} Larva Udang <i>Artemia salina</i> L pada setiap Fraksi Protein Bakteri <i>Enterobacter sp</i> ETH 1(2).....	123
33. Data Toksisitas Fraksi Protein Terbaik	124
34. Nilai IC_{50} dari Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas DPPH.....	126
35. Kurva Pengukuran Aktivitas Asam Askorbat	133
36. Kurva Pengukuran Antioksidan Terbaik.....	139
37. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana dari Isolat ETH 7(1).....	145
38. Klasifikasi Bakteri <i>Enterobacter aerogenes</i> ETH 7(1).....	146

39. Urutan Nukleotida dan Kromatogram Isolat ETH 7(1) dari Hasil Gabungan (<i>Contig</i>) pada Program <i>DNA Baser</i>	147
40. Hasil BLAST Sekuens Protein ETH 7(1)	150
41. Pohon Filogenik Berdasarkan Sekuens DNA Pengkode 16S rRNA dari Isolat Bakteri ETH 7(1) dengan Sekuens DNA Pengkode 16S rRNA Bakteri GeneBank.....	151
42. Dokumentasi Penelitian	152

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

ppm	=	part per million
IC ₅₀	=	Inhibition Concentration 50
LC ₅₀	=	Lethal Concentration 50
BSLT	=	Brine Shrimp Lethality Test
WHO	=	World Health Organization
rpm	=	Rotasi per Menit
BSA	=	Bovine Serum Albumin
DH	=	Derajat Hidrolisis
µg/mL	=	Mikrogram per Mililiter
DPPH	=	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
°C	=	Derajat Celcius
cm	=	Sentimeter
EPA	=	Asam Eikosapentanoat
DHA	=	Asam Dokosaheksanoat
%	=	Persen
λ	=	Lamda
TCA	=	Asam Trikloroasetat
kDa	=	Kilo Dalton
MYA	=	Malt Yeast Agar
Arg	=	Arginin
Lys	=	Lisin
Trp	=	Triptofan
Met	=	Metionin

Cys	=	Sistein
His	=	Histidin
Tyr	=	Tirosin
Phe	=	Fenilalanin
®	=	Registered
HTI	=	Taltobulin
IGF	=	Insulin-Like Growth Factors
PDGF	=	Plateled-Derived Growth Factors
GM-CSF	=	Colony-Stimulating Factors
ILI	=	Influenza Like Illness
MCF-7	=	Michigan Cancer Foundation-7
HepG2	=	Hepatoma G2
RIP	=	Ribosome-Inactivating Proteins
rRna	=	Ribonukleat Ribosomal
JIP-60	=	Jasmonate-Induced Protein 60
PS	=	Parasporin
PBS	=	Phospat Buffer Saline
MTT	=	Mikrotetrazolium
ELISA	=	Enzyme-Linked Immunosobent Assay
ETH	=	Ekstraseluler Teripang Hitam
ITH	=	Intraseluler Teripang Hitam

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan wilayah yang sebagian besar adalah lautan dengan persentase mencapai 70% (Diyanti, 2017). Besarnya persentase wilayah lautan Indonesia menjadikan salah satu negara dengan keanekaragaman (biodiversitas) sumber daya biota laut terbesar di dunia (Arifin dkk., 2019). Sumber daya biota laut yang besar ini menarik banyak perhatian karena dapat dijadikan sumber target bahan penelitian dan dapat dijadikan berbagai macam produk (Rumengan dkk., 2014). Hal ini disebabkan biota laut mempunyai banyak kandungan senyawa bioaktif yang menunjukkan bioaktivitas farmakologi yang berpotensi dikembangkan sebagai antikanker, antibakteri (Umboh dkk., 2018), dan antioksidan (Nobsathian dkk., 2017). Hal ini membuat banyak industri farmasi memulai penelitian organisme laut sebagai bahan obat baru dari produk alami. Salah satu komoditas dari keanekaragaman biota laut yang sering dimanfaatkan adalah teripang (Krestiana dkk., 2015).

Teripang laut merupakan salah satu organisme laut yang mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, saponin, flavonoid, steroid dan triterpenoid (Hidayat dkk., 2018). Penelitian terkait aktivitas senyawa bioaktif teripang telah banyak dilakukan untuk dianalisis, seperti teripang hitam (*Holothuria atra*) (Halimatushadiyah dkk., 2018) sebagai antikanker, teripang emas (*Stichopus horrens*) sebagai antibakteri (Kusuma dkk., 2016) dan teripang susu (*Holothuria fuscogilva*) sebagai antioksidan (Avigail dkk., 2019). Banyak penelitian yang telah dilaporkan yang telah dilakukan untuk menganalisis senyawa-

senyawa bioaktif yang ada pada teripang dan telah dilaporkan terdapat sekitar 145 produk alami dari teripang merupakan bahan penting dalam industri farmasi (Chen dkk., 2021). Produk-produk alami berupa obat tradisional dan suplemen obat memiliki senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antikanker, antitumor, antibiotik, antibakteri, antiurisemia, antijamur dan antioksidan (Sasongko, 2020; Hasan, 2013).

Manfaat serta potensi teripang untuk memproduksi senyawa bioaktif dikarenakan iklim tropis dapat menghasilkan fluktuasi parameter lingkungan yang cukup tinggi. Timbulnya parameter ini menjadikan kehidupan biota laut dapat berinteraksi satu dengan lainnya dengan sangat dinamis. Organisme laut di dalam lingkungan memicu upaya untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder sebagai senyawa yang diperlukan untuk mempertahankan kelangsungan hidup baik sebagai upaya pertahanan diri terhadap predator maupun perbaikan genetisnya untuk diturunkan ke generasi berikutnya (Rimper, 2014). Timbulnya eksploitasi secara terus-menerus juga menimbulkan kesulitan dalam memperoleh suplai produk alami dikarenakan senyawa target bioaktif yang dihasilkan sangat sedikit dan perluasan perkembangan hasil olahan produk alami. Hal tersebut dapat mengurangi biodiversitas hewan yang ada di laut. salah satu metode alternatif yang dapat digunakan dan dikembangkan adalah dengan memanfaatkan bakteri simbiosis yang ada pada teripang laut.

Bakteri simbiosis yang terdapat pada teripang laut dapat menjadi solusi terhadap berkurangnya biodiversitas hewan laut akibat eksploitasi yang berlebihan (Sibero dkk., 2019) dikarenakan secara alami teripang laut akan bersimbiosis dengan berbagai macam mikroba yang ada disekelilingnya salah satunya ialah koloni bakteri (Muftihah., dkk 2017) karena bakteri memiliki kecenderungan bersimbiosis dengan suatu lapisan permukaan padat yang ada di sekelilingnya

(Sidharta, 2000). Pemanfaatan bakteri simbiosis pada teripang laut juga mudah dilakukan karena bakteri simbiosis dapat dikultur dan dikembangbiakkan dalam waktu yang cepat serta jumlah sampelnya yang dibutuhkan sedikit (Santosa dkk., 2020). Bakteri simbiosis memiliki kemampuan dalam menghasilkan protein aktif yang saat ini semakin banyak dimanfaatkan untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya (Sugireng dan Suwarny, 2021).

Protein-protein bioaktif yang dihasilkan dari bakteri simbiosis beragam dengan berbagai bioaktivitas terdapat pada teripang seperti penelitian yang dilakukan oleh Ibrahim pada tahun 2019 yang ditemukan bahwa protein bioaktif yang didapatkan oleh teripang kasur (*Stichopus vastus*) berupa kondroitin yang mempunyai profil asam amino glisin dan mempunyai bioaktivitas antimikroba dengan penghambatan bakteri *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *E. coli*, yaitu sebesar 12,26 mm, 11,00 mm, 10,33 mm dan 10,97 mm dan bioaktivitas antikanker dengan nilai LC_{50} sebesar 66,06 $\mu\text{g/mL}$. Teripang pasir *Holothuria scabra* memiliki protein bioaktif berupa kolagen yang mempunyai profil asam amino glisin dan histidin, dimana memiliki bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Nimah dkk., 2012) dan *Escherichia coli* sebesar $2,3 \pm 0,58$ mm, 6 ± 0 mm, dan $1,03 \pm 0,22$ mm. Teripang pasir *Holothuria scabra* juga memberikan bioaktivitas antioksidan dengan nilai sebesar IC_{50} 97,22 $\mu\text{g/mL}$ dan bioaktivitas antikanker dengan nilai LC_{50} yaitu 11,51 $\mu\text{g/mL}$. Penemuan yang dilakukan oleh Monika dkk tahun 2021 juga menemukan bahwa teripang *Stichopus hermannii* mempunyai kandungan protein bioaktif berupa α -2-macroglobulin dan lektin yang mempunyai profil asam amino glisin, dan histidin serta mempunyai bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* Clarke dan *E. coli* dengan daya hambat $5,69 \pm 4,78$ mm dan

6,49±5,59 mm (Monika dkk., 2021) dan bioaktivitas antikanker dengan nilai LC_{50} 109,67 $\mu\text{g/mL}$.

Protein aktif yang didapatkan dari bakteri simbiosis potensial untuk dikembangkan salah satu diantaranya adalah peptida bioaktif (Notonegoro dkk., 2018). Menurut Sitanggang dkk (2018) hidrolisis protein menjadi peptida dapat dilakukan secara enzimatik yaitu dengan menggunakan enzim proteolitik seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin yang menghasilkan peptida bioaktif. Peptida bioaktif secara biologi telah diisolasi dari beberapa jenis teripang seperti penelitian yang telah dilakukan dan diketahui bahwa teripang *Holothuria atra* mempunyai aktivitas terkuat sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} 14,27 $\mu\text{g/mL}$ dan dapat berpotensi sebagai antikanker (Putram., dkk 2017), sedangkan menurut Rasyid dkk (2021), yaitu dengan nilai IC_{50} 12,16 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antikanker pada *Holothuria atra* menurut Fadhillah pada tahun 2019 menunjukkan nilai sebesar LC_{50} 253,995 $\mu\text{g/mL}$ terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan penelitian yang dilakukan oleh Baramuli dkk tahun 2021 dengan nilai LC_{50} yang didapatkan sebesar 30,01 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan metode BSLT. Penelitian yang dilakukan oleh Setiadi pada tahun 2014 juga menemukan bahwa bakteri teripang *Holothuria scabra* juga diketahui mempunyai aktivitas antikanker dengan nilai LC_{50} 158,401 $\mu\text{g/mL}$ terhadap larva udang *Artemia salina* L.

Hubungan aktivitas antikanker dengan aktivitas antioksidan disebabkan pada potensi dari masing-masing bioaktivitas yang saling berkaitan. Menurut Salimi (2021), peranan aktivitas antioksidan sangat penting karena dapat menghambat reaksi oksidasi. Radikal bebas merupakan salah satu penyebab timbulnya penyakit degeneratif seperti kanker, stroke, hipertensi dan penyakit kronik lainnya yang

disebabkan oleh stress oksidatif pada manusia. Aktivitas antioksidan dapat menghambat reaksi oksidasi dengan radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif dan dapat menghambat kerusakan sel (Nurmaulawati dkk., 2021). Radikal bebas merupakan salah satu penyebab terjadinya kanker.

Senyawa pada larva udang *Artemia salina* Leach dilaporkan terdapat senyawa saponin yang efektif sebagai senyawa agen antikanker. Senyawa saponin (triterpen glikosida) dihasilkan sebagai salah satu bentuk pertahanan diri secara kimiawi bagi teripang (Janakiram, 2015). Selain digunakan sebagai bentuk pertahanan diri akan predator, senyawa saponin juga memiliki efek biologis termasuk sitotoksik melawan sel tumor, aktivitas kekebalan tubuh dan antikanker (Ridhowati dan Asnani, 2015).

Berdasarkan latar belakang, maka dilakukanlah penelitian ini untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa bioaktif protein dan peptida dari teripang *Holothuria atra*. Isolat dengan aktivitas terbesar, kemudian dikultur dan difermentasi dalam media untuk menghasilkan protein aktif selanjutnya dilakukan pemurnian dengan proses fraksinasi dan dialisis. Selanjutnya, Ekstrak kasar dan fraksi protein yang telah didapatkan kemudian dihidrolisis secara enzimatik, kemudian, diuji aktivitas antioksidan dengan metode reduksi DPPH dan diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Jadi, penentuan aktivitas antikanker peptida bioaktif dari teripang hitam *Holothuria atra* dapat diketahui dengan melihat kemampuan inhibisi dan toksisitas peptida bioaktif.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. jenis bakteri apa yang terdapat pada bakteri simbion teripang hitam *Holothuria atra* yang dapat menghasilkan peptida bioaktif?

2. bagaimana aktivitas antioksidan peptida bioaktif dari teripang hitam *Holothuria atra*?
3. bagaimana aktivitas toksisitas peptida bioaktif dari teripang hitam *Holothuria atra* terhadap *Artemia salina* L.?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah mengetahui dan mengidentifikasi teripang hitam *Holothuria atra*, kemudian menentukan aktivitas antioksidan dan menentukan toksisitas peptida bioaktif dari teripang hitam *Holothuria atra*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbiosis teripang hitam *Holothuria atra* yang memproduksi protein dan hidrolisat peptida bioaktif,
2. menentukan aktivitas antioksidan protein dan hidrolisat peptida bioaktif dari simbiosis teripang hitam *Holothuria atra*,
3. menentukan aktivitas toksisitas protein dan hidrolisat peptida bioaktif dari simbiosis teripang hitam *Holothuria atra* terhadap *Artemia salina* L.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai jenis-jenis bakteri simbiosis yang dapat menghasilkan peptida bioaktif dari teripang hitam *Holothuria atra* serta dapat memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan, dan toksisitas peptida bioaktif sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat yang baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teripang Hitam (*Holothuria atra*)

Teripang atau sering disebut gamat, gamet atau timun laut karena bentuknya yang menyerupai ketimun, dengan karakteristik tubuh lunak bentuk tubuh silindris, dan berotot melingkar yang memanjang dari mulut hingga anus. Secara taksonomi teripang termasuk kelas *Holothuridae* bersama-sama dengan bintang laut, bintang mengular, lili laut dan bulu babi dalam filum *Echinodermata*. Hampir semua jenis teripang dapat dengan mudah dikenali berdasarkan bentuk tubuhnya yang bulat memanjang seperti timun atau mentimun. Permukaan tubuhnya yang bertekstur halus licin hingga kasar, berwarna hitam polos, hijau, hingga merah terang atau putih dengan bercak-bercak hitam (Sugama dkk., 2019).

Terdapat sekitar 1135 spesies teripang yang telah tersebar di seluruh dunia dan sebanyak 257 spesies teripang diantaranya terdapat di perairan Indonesia. Salah satu jenis teripang yang berhasil dibudidayakan adalah teripang hitam (*Holothuria atra*). Teripang hitam (*Holothuria atra*) keseluruhan tubuhnya berwarna hitam dan umumnya ditutupi dengan pasir halus. Spesies ini memiliki 3 habitat antara lain di pasir, di permukaan karang, dan di air yang dalam (Silaen dkk., 2018). Memiliki podia pada permukaan dorsal yang kecil. Tentakel berwarna hitam dan anus terletak di ujung tanpa gigi atau papila. Spesies ini dapat dibedakan dengan warna kemerahan yang dilepaskan ketika tubuhnya digosok (Purcell dkk., 2012).

Holothuria atra dapat hidup pada suatu perairan yang memiliki kisaran temperatur 31,3 °C – 39,4 °C. Spesies ini dapat memakan karang mati yang memiliki ukuran hingga 2 cm. *Holothuria atra* aktif pada siang hari untuk mencari

makan. Warna tubuh *Holothuria atra* umumnya hitam dan sebagian besar permukaan tubuhnya tertutup oleh pasir (Putra, 2015). Tertutupnya permukaan tubuh teripang ini menyebabkan pasir terefleksinya cahaya matahari sehingga *Holothuria atra* memiliki temperatur tubuh yang agak rendah dibandingkan dengan teripang jenis lainnya (Setyastuti dkk., 2014). Menurut Aba dan Rusliadi (2020), klasifikasi *Holothuria atra* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Divisi : Echinodermata
Kelas : Holothuridae
Ordo : Aspidochirotida
Famili : Holothuridae
Genus : *Holothuria*
Spesies : *Holothuria atra*



Gambar 1. Teripang Hitam *Holothuria atra* (Setyastuti, 2015)

Holothuria atra merupakan spesies yang kelimpahannya paling banyak ditemukan di wilayah Indo-Pasifik. Teripang jenis ini tidak hanya ditemukan pada daerah pantai berpasir namun juga dapat ditemukan pada substrat-substrat lainnya dan juga pada ekosistem terumbu karang. *Holothuria atra* memiliki bentuk panjang

dan silindris dengan panjang 15-30 cm. Warna tubuh hitam keseluruhan baik dorsal maupun ventral. Papilla dan kaki tabung tersebar tidak beraturan. Mulut terletak di ujung anterior bagian ventral dengan tentakel berbentuk perisai (*paltate*) berjumlah 20. Tipe spikula pada bagian dorsal yaitu *table* dan *rosettes*, pada bagian ventral yaitu *pseudo-plates*, sedangkan untuk tentakel tidak terdapat spikula (Ikhsan, 2015).

2.2 Senyawa Aktif pada Teripang *Holothuria atra*

Senyawa aktif merupakan senyawa kimia bahan alam yang mempunyai aktivitas biologi yang penting. Keanekaragaman yang luas dari sumber protein yang terdapat di lautan menyebabkan komposisi dari urutan utama dari asam amino dan protein laut berbeda dengan protein darat. Hal ini menyebabkan protein laut memiliki kemungkinan menjadi sumber protein penting untuk pemilihan peptida antikanker baru melalui hidrolisis enzimatik (Zarei dkk., 2014).

Teripang hitam *Holothuria atra* mengandung beberapa senyawa bioaktif yang cukup potensial diantaranya sebagai antimikroba, antitumor, antikanker, dan antioksidan. Senyawa toksik yang terdapat pada teripang ini dikenal dengan nama triterpen glikosida (saponin), yaitu senyawa kompleks yang terdiri dari steroid dan triterpenoid. Nama umum dari senyawa triterpen glikosida yang terdapat pada teripang *Holothuria atra* adalah holothurin a dan holothurin b. Hal tersebut berhubungan dengan mekanisme pertahanan teripang. Triterpen glikosida diproduksi pada bagian kulit dan di dalam tubulus cuvier teripang. Senyawa tersebut dilaporkan memiliki efek biologis yang luas seperti antifungi yang terbukti efektif untuk mematikan fungi jenis *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae*, sebagai ikhtiotoksik, hemolitik, aktivitas imunomodulator dan aktivitas sitotoksik melawan sel tumor (kanker) pada manusia dan mencit, kandungan lemaknya mengandung asam lemak tidak jenuh seperti EPA (asam

eikosapentanoat) dan DHA (asam dokosaheksanoat) yang baik untuk jantung, agen penyembuh luka dan antitrombotik (Hakam, 2012). Selain itu, teripang hitam *Holothuria atra* ini juga mempunyai senyawa bioaktif berupa senyawa sterol yang secara ilmiah berperan sebagai antioksidan yang dapat meredam berbagai penyakit degeneratif dan aktivitas radikal bebas dalam tubuh (Lubis dkk., 2016).

2.3 Bakteri Simbion

Bakteri simbion adalah bakteri yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif serta memiliki peran penting secara ekologi kimia dan sebagai produk alami berupa metabolit sekunder (Rozirwan dkk., 2015). Bakteri simbion cenderung menghasilkan metabolit sekunder yang mirip atau bahkan sama persis dengan inangnya. Kandungan metabolit sekunder dari bakteri simbion merupakan salah satu bahan substansi bioaktif yang sangat berguna bagi manusia, karena dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antikanker, antitumor, antibakteri dan antifungi (Sardiani dkk., 2015).

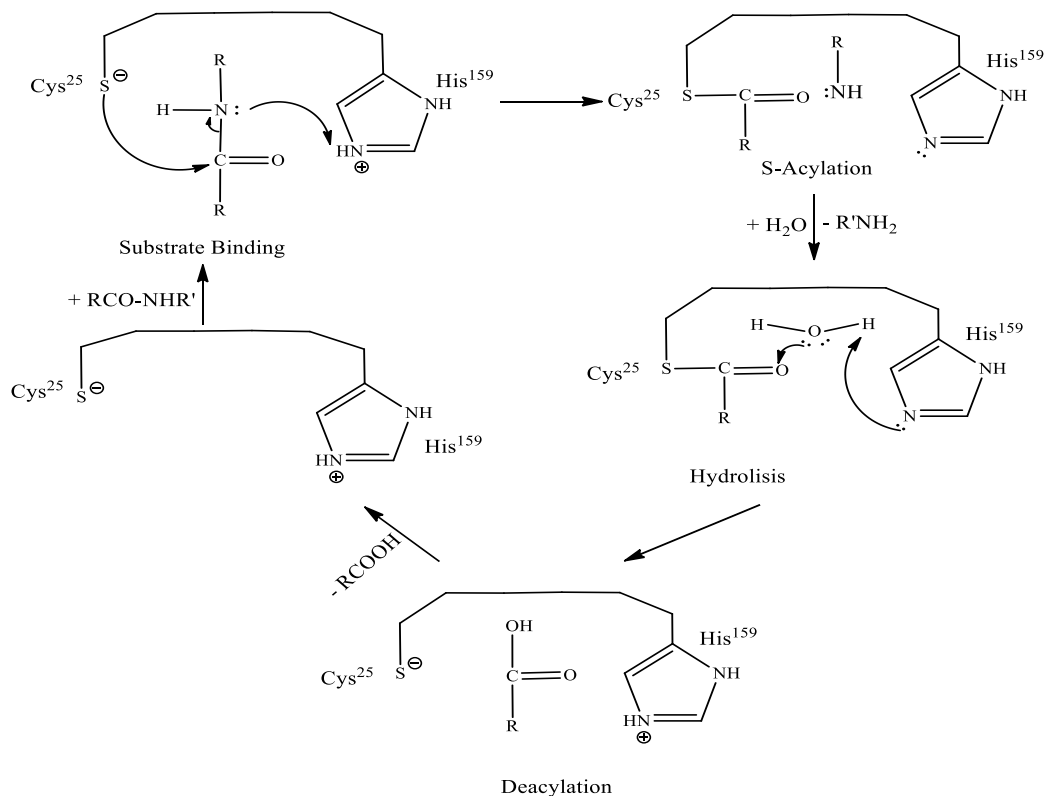
Salah satu ciri penting bakteri simbion yaitu, bakteri simbion secara dominan dapat diwariskan berdasarkan variasi genetik. Variasi genetik yang diwariskan mencakup variasi dalam genom dan dalam komposisi sitoplasma. Tidak semua bakteri simbion mempengaruhi interaksi inang dengan spesies lain secara langsung (Ferrari dan Vavre, 2012). Beberapa simbion dengan ekstraseluler atau campuran dapat dimodifikasi menggunakan plasmid yang dihancurkan oleh kromosom (Masson dan Lemaitre, 2020).

2.4 Hidrolisis Protein Secara Enzimatis

Hidrolisis protein merupakan proses pelepasan ikatan peptida dari protein yang bertujuan untuk mengubah bentuk protein dari kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana yaitu asam amino dan peptida sehingga dapat dengan mudah untuk

dimanfaatkan oleh tubuh. Hidrolisis protein dapat dilakukan secara kimia, termal, fermentasi, asam, basa, dan enzimatik. Hidrolisis protein dengan asam dapat dengan menggunakan asam kuat seperti HCl dan H₂SO₄ pekat, sedangkan pemecahan protein menjadi molekul yang lebih sederhana dengan larutan basa dapat menggunakan KOH dan NaOH (Puspawati dkk., 2020).

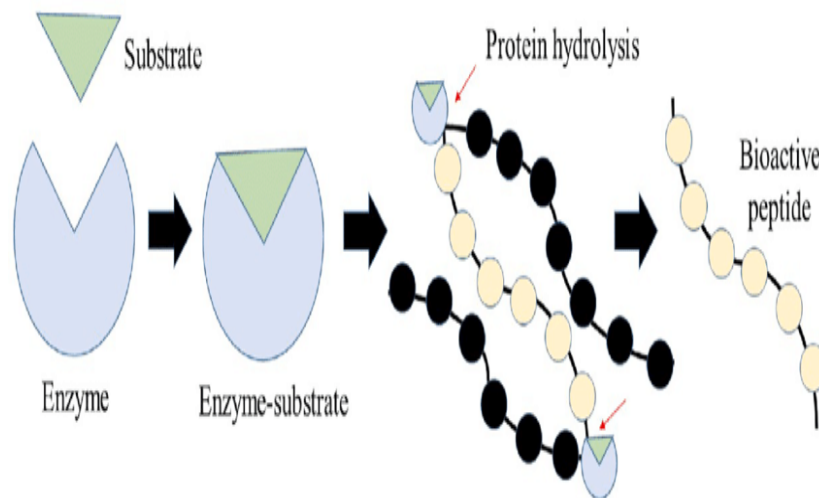
Hidrolisis secara enzimatik dapat menggunakan enzim proteolitik, bisa menggunakan satu jenis atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Setiap hasil hidrolisis protein akan mengalami degradasi hidrolitik dan menghasilkan perbandingan asam amino yang berbeda-beda. Hidrolisis protein dapat berasal dari tumbuhan (kacang-kacangan), hewan (daging, telur, susu dan olahannya) Enzim yang digunakan dapat berasal dari mikroba (*alcalase*), hewan (pepsin, tripsin), dan tumbuhan (papain, bromelin) (Lehninger, 1997).



Gambar 2. Mekanisme hidrolisis protein oleh enzim papain (Widadi, 2011)
Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keuntungan dibandingkan hidrolisis

asam antara lain, proses hidrolisis enzimatik tidak menyebabkan terjadi proses

degradasi gula hasil hidrolisis, lebih mudah diproses menggunakan suhu rendah, pH netral, memiliki potensi untuk memberikan hasil fermentasi alkohol dengan kemurnian yang tinggi, dan biaya pelaksanaan dan pemeliharaan proses hidrolisis cenderung lebih rendah karena tidak ada bahan yang korosif (Kurniawan dkk., 2012). Penggunaan enzim proteolitik dalam proses hidrolisis memiliki keuntungan yakni spesifisitas dalam pemutusan ikatan peptida pada residu asam amino tertentu sehingga menyebabkan terhindarnya kerusakan asam amino tertentu seperti triptofan dan glutamin (Wang dan Zhang, 2013).



Gambar 3. Hidrolisis enzimatik secara umum (Casas dkk., 2021)

Enzim dan peptida memiliki ikatan spesifisitas yang besar, diibaratkan seperti gembok dan kunci. Interaksi enzim dan substrat memiliki karakteristik pada residu asam amino yang disebabkan sisi aktif dari enzim. ikatan peptida yang mengalami hidrolisis dapat diprediksi posisinya sehingga enzim proteolitik dapat bekerja secara spesifik (Tavano, 2013). Berikut beberapa jenis enzim serta posisi hidrolisisnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Enzim proteolitik spesifik (Tavano, 2013)

Enzim Protease	Lokasi Hidrolisis
----------------	-------------------

Papain	Asam amino yang mengandung rantai sampai hidrofobik besar pada posisi P2 rantai sampai hidrofobik, residu aromatik lebih disukai
Pepsin	N-Terminal Arg dan Lys pada posisi P1
Tripsin	Rantai samping hidrofobik, residu aromatik lebih disukai
Subtilisin	Hidrolisis protein dengan spesifisitas luas untuk ikatan peptida, dan preferensi untuk residu yang tidak bermuatan P1.
Termolisis	C-Terminal Leu dan Phe pada posisi P1
Kimotripsin	N-Terminal Tyr, Trp, Phe dan Leu pada posisi P1

2.5 Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif didefinisikan sebagai bagian khusus dari protein dengan sekuen asam amino yang memiliki aktifitas biologis. Peptida bioaktif merupakan peptida yang tersusun dari gabungan asam amino yang dihubungkan melalui ikatan kovalen khususnya ikatan amida atau yang dikenal dengan ikatan peptida. Peptida memiliki 2 – 20 asam amino dengan berat molekul kurang dari 6000 Da. Bioaktifitasnya ditentukan berdasarkan panjang rantai, komposisi dan sekuen asam aminonya (Castro dan Sato, 2015).

Peptida bioaktif dapat diperoleh dari sumber protein nabati maupun hewani yang ada di daratan. Sumber protein nabati pada peptida bioaktif umumnya berasal dari biji-bijian dan kacang-kacangan seperti gandum, biji-bijian, beras, jagung, kedelai, sedangkan sumber protein hewani umumnya berasal dari daging, susu, telur dan ikan. Sumber protein nabati dan hewani ini telah banyak diteliti sebagai sumber penghasil peptida bioaktif (Ortiz-Martinez dkk., 2014; Lafarga dan Hayes, 2014). Selain sumber protein yang ada di daratan, peptida bioaktif yang berasal dari produk-produk alami dan sintesis dapat banyak ditemukan dari spesies-spesies laut. Peptida bioaktif dapat dihasilkan dengan beberapa cara (Abdelhadi dkk., 2017; Capriotti dkk., 2015) yaitu hidrolisis enzimatis dengan enzim pencernaan, fermentasi dengan memanfaatkan aktivitas mikroba, dan sintesis

kimia. Peptida dari spesies laut sangat berpotensi untuk dijadikan bahan baku obat karena spektrum bioaktivitasnya yang luas, seperti antivirus, antitumor, antioksidan, antimikroba, antidiabetes (kencing manis), immu-nomodulator, menekan nafsu makan, antiadipogenik (antiobesitas), dan aktivitas neuroprotektif (Cheung, dkk., 2015).

Kandungan dan susunan asam amino sangat mempengaruhi aktivitas peptida yang telah terlepas dari protein prokursornya. Interaksi urutan asam amino spesifik yang membentuk bagian protein memodulasi proses alami dalam tubuh. Hasil peptida bioaktif yang diperoleh memperlihatkan aktivitas biologis yang bervariasi dengan aplikasi berupa produk industri farmasi (Montalvão, 2016).

Tabel 2. Peptida yang beredar di pasaran (Montalvão, 2016)

Komponen	Aplikasi	Status
Ziconotide Prialt [®]	Analgesik	Disetujui FDA
Adcetris [®]	Obat Terapi Kanker	Disetujui FDA
Glembatumumab vedotin	Obat Terapi Kanker	Studi Klinis
Katsuobushi oligopeptide	Antihipertensi	Sebagai Nutrasetikal
Dermochlorella [®]	<i>Skin toner</i>	Sebagai Produk Kecantikan
Plitidepsin	Obat Terapi Kanker	Studi Klinis
HTI-286	Obat Terapi Kanker	Studi Praktinis
Kahalalide F	Obat Terapi Kanker	Studi Klinis
Elisidepsin	Obat Terapi Kanker	Studi Klinis
Protizen [®]	Ansiolitik/Obat penenang	Sebagai Nutrasetikal
Seacure [®]	Suplemen Kesehatan Pencernaan	Sebagai Nutrasetikal
Nutripeptin [®]	Pengontrol Glukosa Darah	Sebagai Nutrasetikal
Hydro MN peptida [®]	Pengontrol Glukosa Darah	Sebagai Nutrasetikal

2.6 Tinjauan Umum Antikanker

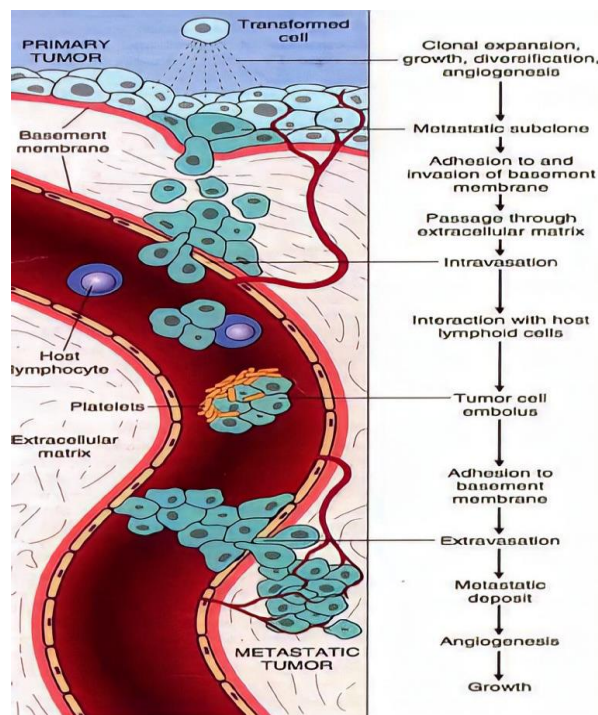
Kanker adalah penyakit dengan pertumbuhan tidak menular yang ditandai dengan pertumbuhan set tidak normal/terus-menerus dan tidak terkendali yang dapat merusak jaringan sekitarnya. Sel kanker bersifat ganas dapat berasal atau tumbuh dari setiap jenis sel di tubuh manusia (Arafah dan Notobroto, 2017). Sel kanker mempunyai abnormal fenotip yang beragam antara lain diferensiasi, peningkatan motalitas, tingkat invasi, dan perberdaan dalam sensitivitas terhadap obat (Wang dkk., 2015). Walaupun terdapat beragam fenotip yang terjadi, penyebab utama dari sel kanker adalah desregulasi kontrol terhadap siklus sel. Keadaan ini menyebabkan sel akan berkembang tanpa mekanisme kontrol siklus sel tersebut (Budhy, 2019).

Kasus kematian akibat kanker yang terus meningkat tiap tahunnya menimbulkan dampak yang besar dalam bidang kesehatan masyarakat. Menurut data *World Health Organization* (WHO) tahun 2020 terdapat sebanyak 396,914 kasus penduduk Indonesia mengalami kematian akibat kanker, diantaranya 16,6% (65.858) kasus kanker payudara, 9,2% (36.633) kasus kanker Rahim, 8,8% (34.783) kasus kanker paru-paru, 8,6% (34.189) kasus kanker kolorektal, dan 5,4% (21.392) kasus kanker perut. Jumlah kanker di Indonesia mengalami peningkatan dalam 5 tahun terakhir yang mana terdapat 946.068 kasus kanker yang terjadi.

Perkembangan suatu kanker dipengaruhi oleh faktor angiogenesis atau pertumbuhan pembuluh darah baru. Perkembangan suatu kanker menjadi lebih besar dikaitkan dengan nutrisi dan oksigen dari pembuluh darah. Bila suatu kanker tidak mendapatkan suplai darah yang bagus, maka kanker tersebut akan membesar. Hal ini berhubungan dengan hipoksia, yang menginduksi apoptosis melalui aktivitas kanker (Nugrahaningsih dkk., 2015).

Pertumbuhan pembuluh darah baru mempunyai dua pengaruh terhadap perkembangan suatu neoplasma atau kanker. Perfusi suplai dan oksigen pada

kanker terjadi di mana pembentukan sel-sel endotel baru mestimulasi pertumbuhan beberapa sel yang berdekatan dengan cara mengeluarkan polipeptida seperti *insulin-like growth factors (IGF)*, *platelet-derived growth factor (PDGF)*, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factors (GM-CSF)*, dan *Influenza Like Illness (ILI)*. Pertumbuhan pembuluh darah baru angiogenesis dibutuhkan tidak hanya untuk perkembangan kanker (Kumar dkk., 2005).



Gambar 4. Metatesis Sel Kanker (Kumar dkk., 2005)

2.7 Tinjauan Umum Peptida Antikanker

Peptida kecil yang mempunyai bioaktivitas antikanker merupakan alternatif yang potensial untuk pendekatan terapi kanker. Saat ini banyak terapi berbasis peptida untuk pengobatan berbagai jenis tumor sedang dievaluasi dan dikembangkan dalam berbagai tahapan praklinis dan klinis. Analisis awal menunjukkan bahwa keberadaan asam amino Cys, Gly, Ile, Lys, dan Trp yang

mendominasi di berbagai posisi pada peptida berkaitan dengan adanya aktivitas antikanker (Tyagi dkk., 2013).

Tabel 3. Peptida antikanker dari Organisme Laut (Tyagi dkk., 2013)

Peptida	Simbol	Berat Molekul (BM) (Da)	Aktivitas
Leu-Ala-Asn-Ala-Lys	LANAK	515,29	Antikanker dan Antioksidan
Phe-Ile-Met-Gly-Pro-Tyr	FIMGPY	726,9	Antikanker
Gln-Pro-Lys	QPK	343,4	Antiapoptosis
Tyr-Ala-Leu-Arg-Ala-Nya	YALRAH	670,77	Antiproliferasi sel PC-3
Arg-Gin-Ser-Nya-Phe-Ala-Asn-Ala-Gln-Pro	RQSHFANAQP	1155	Antiproliferasi sel MCF-7 dan MDA-MB-231

Aktivitas antikanker peptida terhadap sel antikanker dipengaruhi oleh panjang atau pendeknya rantai peptida. Tidak ada kesimpulan terkait hal tersebut dikarenakan pada sel MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), aktivitas antikanker pada sel ini akan menurun seiring dengan penurunan panjang peptida. Sedangkan pada sel HepG2 (*Hepatoma G2*) aktivitas antikanker pada sel ini akan meningkat seiring dengan penurunan panjang peptida. Hal ini disebabkan sel-sel kanker MCF-7 menggunakan peptida panjang untuk mengaktifkan aktivitas antikanker, sedangkan pada sel kanker HepG2 menggunakan peptida pendek untuk mengaktifkan aktivitas antikanker (Zhang dan Zhang, 2013).

Aktivitas antioksidan juga terjadi pada peptida dimana peptida lebih banyak berhubungan dengan komposisi, struktur, dan hidrofobisitas asam aminonya. Tyr,

Trp, Met, Lys, Cys, dan His. Asam amino Tyr (Y), Trp (W), Met (M), Lys (K) dan Cys (C) adalah contoh asam yang memberikan residu aromatik, dimana asam amino ini dapat menyumbangkan proton pada radikal yang mengalami kekurangan elektron (Carasco-Castilla dkk., 2012). Sedangkan asam amino aromatik yang memiliki gugus fenol, indol, dan *imidazole* seperti Trp, Tyr, Phe, His dapat berperan sebagai donor elektron dan secara efisien menangkap senyawa radikal. Aktivitas antioksidan peptida juga dipengaruhi oleh urutan asam amino, dimana posisi asam amino yang berubah dari urutan awal akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang berbeda pula (Duan dkk.,2014).

2.8 Ribosome-Inactivating Protein (RIP)

Ribosome-Inactivating Protein (RIP) adalah protein yang mempunyai aktivitas enzimatis N-glikosidase sehingga mampu menghambat sintesis protein. RIP mempunyai sifat sitotoksik terhadap sel mamalia serta aktivitas lain seperti antivirus, antibakteri, antioksidan, antikanker, fotoprotektif, dan kemopreventif. RIP ditemukan pada tanaman termasuk tanaman yang dapat dimakan seperti sayur yang merupakan sumber pangan sehari-hari dan sitotoksik terhadap sel mamalia (Walsh dkk., 2013).

RIP bersifat basa karena pendekatan waktu pemurnian menggunakan kromatografi penukar ion sehingga protein yang terikat fase diam merupakan protein basa, RIP tersebut menunjukkan harga pI antara 9-11. Efek sitotoksik RIP tersebut disebabkan kemampuannya memotong adenin4324 pada 28S rRNA sehingga faktor perpanjangan tidak dapat berikatan dan sintesis protein berhenti. Aktivitas rRNA N-glikosidase ini merupakan penanda aktivitas RIP. Selain itu, RIP mempunyai aktivitas memotong DNA dan asam nukleat lainnya (Sudjadi dkk., 2007).

Berdasarkan struktur, RIP dikelompokkan dalam tiga tipe RIP. RIP tipe 1 seperti trikosantin yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal, dengan ukuran sekitar 30 kDa. Trikosantin bersifat abotifasien yang dimurnikan dari jamu tradisional China Tian Hua Fen. RIP tipe 2 berupa risin yang diisolasi dari *Ricinus communis*, terdiri dari dua sub unit yang diikatkan dengan ikatan disulfida, berukuran sekitar 60 kDa. RIP tipe ini mempunyai lektin yang dapat berinteraksi dengan reseptor pada membrane sel sitosol. Sedangkan sub unit yang aktif masuk ke dalam sitosol. Sedangkan RIP tipe 3 seperti JIP60 yang diisolasi dari *Hordeum vulgare*, merupakan protein untai tunggal yang tidak membawa bagian lektin. RIP jenis ini disintesis dalam bentuk tidak aktif yang kemudian diubah menjadi bentuk aktif melalui proses proteolysis (Peumans dkk., 2001).

2.9 Tahapan Pemurnian Enzim

Tahapan pemurnian enzim sangat erat kaitannya dengan pemurnian protein. Dasar pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama, secara umum, pemurnian protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu ekstraksi, fraksinasi dengan *salting out* dan dialisis (Akbar, 2017; Dennison 2003).

2.9.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan hewan atau tanaman yang aktif secara medis dari komponen yang tidak aktif melalui penggunaan pelarut. Selama proses ekstraksi, pelarut berdifusi ke dalam jaringan tanaman/hewan dan melarutkan senyawa dengan polaritas yang sama. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman maka perlu dilakukan metode penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan. Kemudian untuk mendapatkan

ekstrak yang jernih dilakukan filtrasi atau sentrifugasi untuk memisahkan material yang tidak larut dan debris sel, maka didapatkan homogenat (Bandiola, 2018; Arya dkk., 2018).

Enzim-enzim yang terdapat dalam sitoplasma dapat diekstrak dengan penghancuran membran plasma sel sehingga enzim dapat keluar ke dalam 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 (Arya dkk., 2018). 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 (Akbar, 2017; Scopes,1994).

2.9.2 Fraksinasi dengan *Salting Out*

Pemisahan protein (enzim) dapat dilakukan dengan melakukan fraksinasi. Pemisahan protein dengan cara pengendapan fraksional menggunakan ammonium sulfat, hal ini bertujuan meningkatkan kadar protein (kemurnian) dalam fraksi dari campuran kompleks. Kemurnian enzim yang tinggi ditunjukkan oleh aktivitas spesifik yang tinggi. Ammonium sulfat sering digunakan dalam pengendapan protein untuk proses pemurnian melalui *salting out* karena memiliki kekuatan ionik yang cukup tinggi karena tidak menimbulkan kerusakan pada protein. Selain itu, metode *salting out* memiliki kelarutan yang tinggi dalam air, relatif murah, tidak berbahaya, dan memiliki efek penstabil pada beberapa enzim (Su'i dan Suprihana, 2013).

Kelarutan protein pada melalui *salting out* dalam media air diperkuat oleh pembentukan interaksi ionik lemah termasuk ikatan hidrogen antara molekul terlarut dengan air. Ion-ion garam ammonium sulfat akan berkompetisi dengan protein untuk menarik protein untuk menarik molekul air (Alviyulita dkk., 2014). 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 yang hidrofobik (Su'i dan Suprihana, 2013).

Dengan mengendapkan enzim dengan metode ini maka enzim akan terpisah dari mono-, oligo- sakarida, nukleotida, asam amino bebas, protein lain yang tertinggal dalam larutan. Pengendapan protein disetimbangkan dengan cara supernatant enzim yang bebas sel yang telah ditambahkan ammonium sulfat didiamkan semalaman (Arjita, 2009). 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 (Selvia dkk., 2013).

2.9.3 Dialisis

Dialisis merupakan metode pemurnian protein, dimana sampel protein yang telah mengendap kemudian dibersihkan dari garam pengotor. Garam yang berlebih di dalam sampel dapat dihilangkan dengan cara menempatkan sampel di dalam kantung (membran) dialisis semipermeabel yang direndam di dalam larutan buffer.

Molekul yang berukuran kecil akan keluar melalui membran, sedangkan molekul yang besar akan tertahan di dalam membran dialisis. Ukuran pori kantung dialisis yang terbuat dari bahan selulosa asetat ini dinyatakan dalam satuan Dalton, yang menunjukkan berat molekul minimum yang dapat tertahan di dalam membran (Dyannar, 2011).

2.10 Metode Uji Aktivitas Antikanker dengan Uji Toksisitas Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)

Senyawa aktif dari bahan alam menjadi prioritas dalam penemuan obat baru untuk mengatasi masalah pengobatan kanker karena agen antikanker dari bahan alam mampu mengobati sumber penyakit dengan memperbaiki sel-sel, jaringan, dan organ tubuh yang rusak serta meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Bioaktivitas suatu bahan alam sebagai antikanker dapat diketahui dengan melakukan penelitian awal, yaitu uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT merupakan salah satu metode untuk skrining tanaman obat yang berpotensi sebagai antikanker (Ningdyah dkk., 2015).

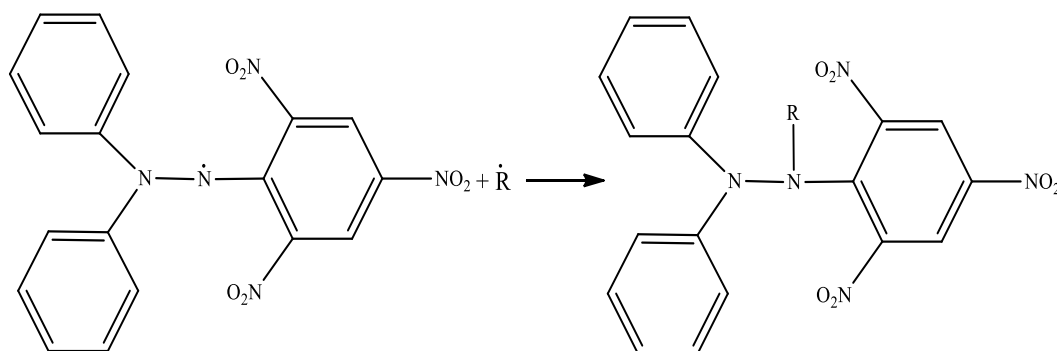
Uji BSLT dilakukan untuk menunjukkan adanya kemampuan bioaktivitas dari suatu ekstrak kasar. Keuntungan dari uji ini yaitu cepat, mudah, hasilnya dapat diulang, serta tidak membutuhkan biaya yang mahal (Hamidi dkk., 2014). Uji BSLT dilakukan dengan membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Kemudian masing-masing ditambahkan air berisi 10 larva *Artemia salina* L. Setelah 24 jam, pengamatan dilakukan terhadap jumlah larva yang mati kemudian dibandingkan dengan jumlah larva awal. Perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali dan dihitung persen (%) kematian larva (Zuraida, 2019). Nilai persen kematian larva selanjutnya di plot ke dalam grafik dengan nilai konsentrasi larutan ekstrak untuk menentukan nilai LC_{50} ekstrak tersebut.

Tabel 4. Tingkat Toksisitas Berdasarkan Nilai LC₅₀ (Meyer dkk, 1982)

Nilai LC ₅₀ (ppm)	Kategori Toksisitas
≤ 30	Sangat Toksik
30 – 1000	Toksik
>1000	Tidak Toksik

2.11 Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikridrazil)

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Penyakit kanker, stroke, jantung, dan penuaan dini disebabkan karena radikal bebas dalam tubuh (Rahman dkk., 2016). Senyawa yang dapat menangkap radikal bebas dinamakan antioksidan. Salah satu uji yang dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (2-2-difenil-1-pikrihidrazil). Metode DPPH (2-2-difenil-1-pikrihidrazil) merupakan uji untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam menangkap radikal bebas. Metode ini lebih sering digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan karena ini lebih secara cepat, sederhana, dan tidak membutuhkan biaya yang mahal (Muthia dkk., 2019).



Gambar 5. Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan (Kedare dan Singh, 2011)
Aktivitas antioksidan pada DPPH diukur berdasarkan transfer elektron yang

dilakukan antioksidan. Senyawa DPPH akan menghasilkan radikal bebas aktif bila dilarutkan dalam alkohol. Absorbansi berkurang ketika radikal bebas DPPH

dihambat oleh antioksidan melalui donor hidrogen untuk membentuk DPPH stabil. Reaksi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning (Suryowati dkk., 2015). Aktivitas antioksidan diketahui melalui nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang menyebabkan hilangnya 50 % dari aktivitas DPPH (Mulia dkk., 2016).

Tabel 5. Tingkat Kekuatan Antioksidan Berdasarkan Nilai IC₅₀ (Putri dkk., 2018)

Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Tingkat Kekuatan Antioksidan
<50	Sangat Kuat
50 – 100	Kuat
101 -250	Sedang
250 – 500	Lemah

2.12 Uji Antikanker

Pengujian antikanker dapat dilakukan dengan uji antiproliferatif yaitu dengan metode Mikrotetrazolium (MTT) *Assay*. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromida] (MTT) diabsorpsi ke dalam sel hidup (MCF-7) dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam PBS (*Phosphate Buffer Saline*) berwarna biru (Amir dan Murcitra, 2017). Konsentrasi formazan yang berwarna biru dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi Ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif. Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Jumlah sel yang hidup dihitung dengan *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader (Mulia dkk, 2016).

Tabel 6. Tingkat Toksisitas Berdasarkan Nilai LC₅₀ (Tunjung dan Sayekti, 2019)

Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori Toksisitas
< 10	Sangat Kuat
10 – 100	Kuat
100 – 500	Sedang

BAB III
METODE PENELITIAN