

**ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) DAN POTENSINYA SEBAGAI  
AGEN ANTIKANKER**

**ISOLATION OF PROTEIN AND BIOACTIVE PEPTIDES FROM RED  
ALGAE SYMBIONTS BACTERIA (*Eucheuma spinosum*) AND THEIR  
POTENTIAL AS AN ANTICANCER AGENT**

**RAFSANJANY RAMADAN**

**H012181006**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) DAN POTENSINYA SEBAGAI  
AGEN ANTIKANKER**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Kimia

Disusun dan diajukan oleh :

**RAFSANJANY RAMADAN**

Kepada

**PROGAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

**TESIS****ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI  
SIMBION ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) DAN POTENSINYA  
SEBAGAI AGEN ANTIKANKER**

Disusun dan diajukan oleh :

**RAFSANJANY RAMADAN**  
Nomor Pokok : H012181006

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis  
Pada Tanggal 12 Januari 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Komisi Penasehat

**Dr. Hasnah Natsir, M.Si**  
Ketua

Ketua Program Studi  
Magister Kimia,

**Dr. Hasnah Natsir, M.Si**

**Prof. Dr. Ahyar Ahmad**  
Anggota

Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin,



**Dr. Eng. Amiruddin, M.Si**

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rafsanjany Ramadan  
Nomor Mahasiswa : H012181006  
Program Studi : Kimia

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

Makassar, 01 Februari 2021  
Yang menyatakan



Rafsanjany Ramadan

## PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim, segala puji dan syukur kehadiran Allah yang telah memberikan rahmat, hidayah dan kemudahan yang selalu diberikan kepada hamba-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul “**Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma soinosum*) dan Potensinya Sebagai Agen Antikanker**” sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains. Sholawat dan salam kepada Nabi besar Muhammad S.A.W.

Kepada kedua orang tua tercinta, ayahanda **Ramadan**, dan ibunda **Hj. Mariam** 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, dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat Insya Allah. Terima kasih juga kepada kakak saya **Anjani** yang selalu memberikan motivasi untuk saya, serta menjadi penyemangat bagi saya, semoga Allah senantiasa melindungi dan diberikan jalan kebenaran, Aamiin.

Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tesis ini. Untuk itu, iringan doa dan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada **Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Prof. Dr. Ahyar Ahmad** selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran, ketelatenan dan

keikhlasan di tengah-tengah kesibukannya meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan serta pengarahan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS, Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc, dan Dr. Paulina Taba, M.Phil**, selaku komisi penilai, terima kasih atas masukan yang telah diberikan demi penyempurnaan penulisan tesis.
2. **Dr. Hasnah Natsir, M.Si**, selaku ketua program studi ilmu kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin terima kasih atas motivasi dan bantuannya,
3. Dekan Fakultas MIPA, Ketua Jurusan Kimia FMIPA, dan seluruh dosen Kimia pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah membagi ilmunya serta seluruh staf Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya,
4. Kepala Laboratorium dan seluruh Staff Laboratorium Biokimia, Kimia Analitik, Kimia Anorganik, Kimia Fisika, Kimia Organik dan Laboratorium Terpadu dan Laboratorium Science Building FMIPA Universitas Hasanuddin. Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan FIKP, dan Laboratorium Perternakan Fakultas Perternakan Universitas Hasanuddin, terima kasih atas segala bantuan fasilitas yang telah diberikan selama proses penelitian.

5. Pak **Irsan** selaku staff Program Studi S2 Kimia yang selalu membantu dan memberikan masukannya dalam penyelesaian administrasi.
6. Rekan partner penelitian biokimia **Yusriadi, Nurul Khaerah, dan Nada Pertiwi**, terkhususnya tim panel penelitian **Marinda** atas segala bantuan, dukungan, masukan, saran, doa dan semangatnya..
7. **Kak Asmi, kak Tika, kak Andis, dinda Nure, dinda Wirda, dinda Akbar, dinda Eva, dinda Nabeela, dinda April, dan dinda Habibi** yang selalu menjadi tempat bertanya dan berkeluh kesah selama proses penelitian berlangsung sampai terselesaikannya tesis ini.
8. Teman-teman yang sudah seperti saudara saya sendiri selama di makassar, **kak Sil, Fadlan, kak Andrew, Lukas, Ayup, Max, kak Husen, Sahar, Asri, Ajis, dan Ichsan** yang sudah memberikan bantuan baik materil dan non materil serta dukungan dan motivasinya selama ini hingga saya sampai pada tahap saat ini.
9. Teman-teman yang termasuk dalam Himpunan Mahasiswa Pasca Sarjana Kimia Unhas dan teman-teman seperjuangan Kimia Pascasarjana angkatan 2018: **Surya Pranowo, Yusriadi, Marinda, Nada Pertiwi, Nurul Khaerah, Andi Fikrah A, Mifta Huljannah, Asriani Hayatun, Nur Afni, Felly Cytae E. A, Septaria Yolan K, Nur Awalia, Adji Permatasari, Musrifa Tahar, dan Sulfitri**, terima kasih atas bantuan dan semangatnya.
10. Saudara-saudaraku "Ranger" **Udha, Idhe, Devi, Nur, Anggi, dan Jula**. Terima kasih karena selalu ada sebagai penghibur dan penyemangat

sampai pada tahap ini.

11. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama menyelesaikan penelitian, terima kasih.

Penulis sadar bahwa tesis 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 bidang biokimia terkhusus peptida bioaktif.

Terima kasih

Makassar, Desember 2020  
Penulis

Rafsanjany Ramadan

## ABSTRAK

**RAFSANJANY RAMADAN:** Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) dan Potensinya sebagai Agen Antikanker.

(dibimbing oleh: Dr. Hasnah Natsir, M.Si dan Prof. Ahyar Ahmad)

Alga merah *Eucheuma spinosum* merupakan biota laut yang mengandung protein dan memiliki bakteri bersimbion, protein yang ada pada alga merah mampu dihasilkan oleh bakteri simbiotiknya. Tujuan penelitian ini yaitu menentukan kadar protein, menguji aktivitas sitotoksik peptida bioaktif, dan menganalisis konsentrasi optimum peptida bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan sel zigot bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. Metode yang dilakukan meliputi isolasi protein, fraksinasi, dialisis, hidrolisis, dan ultrafiltrasi hidrolisat protein. Skrening aktivitas yang dilakukan diantaranya uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk memperoleh nilai ( $LC_{50}$ ), dan uji mitotik/mitosis sel zigot bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. untuk memperoleh nilai ( $IC_{50}$ ). Hasil pengujian yang dilakukan memperlihatkan konsentrasi protein dari ekstrak kasar protein yaitu sebesar 14,325 mg/mL. Konsentrasi protein tertinggi diperoleh pada fraksi 40-60% sebesar 20,67 mg/mL. Hasil uji sitotoksik dari peptida bioaktif memperlihatkan bahwa peptida ukuran molekul <3 kDa memiliki aktivitas paling baik dibandingkan ukuran molekul peptida lainnya yakni sebesar 1,00  $\mu$ g/mL. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan memperlihatkan peptida bioaktif hasil hidrolisis protein yang diisolasi dari bakteri simbion alga merah berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen antikanker.

Kata kunci: Antikanker, antimitotik, BSLT, *Eucheuma spinosum*

## ABSTRACT

**RAFSANJANY RAMADAN:** *Isolation of Protein and Bioactive Peptides from Red Algae Symbionts Bacteria (Euclidean spinosum) and their Potential as an Anticancer Agent.*

*(supervised by: Dr. Hasnah Natsir, M.Si and Prof. Ahyar Ahmad)*

*Red algae Euclidean spinosum is a marine biota that contains protein and has symbiontized bacteria, the protein in red algae can be produced by its symbiont bacteria. The objectives of this study were to determine protein content, test the cytotoxic activity of bioactive peptides, and analyze the optimum concentration of bioactive peptides which can inhibit the growth of Tripneustes gratilla Linn sea urchin zygote cells. The methods used include protein isolation, fractionation, dialysis, hydrolysis, and protein hydrolyzate ultrafiltration. The activity screening carried out included the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) test to obtain a value (LC<sub>50</sub>), and the mitotic / mitotic test of Tripneustes gratilla Linn urchin zygote cells. to get the value (IC<sub>50</sub>). The results of the tests conducted showed that the protein concentration of the crude protein extract was 14.325 mg / mL. The highest protein concentration was obtained in the 40-60% fraction of 20.67 mg / mL. The cytotoxic test results of bioactive peptides showed that the peptides with molecular size <3 kDa had the best activity compared to other peptide molecular sizes, namely 1.00 µg / mL. Based on the results of the research that has been done, it shows that bioactive peptides from protein hydrolysis isolated from red algae symbionts have the potential to be developed as an anticancer agent.*

*Keywords: Anticancer, antimitotic, BSLT, Euclidean spinosum*

**DAFTAR ISI**

	<b>halaman</b>
HALAMAN PENGAJUAN	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xviii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
A. Latar belakang	1
B. Rumusan masalah	5
C. Tujuan	5
D. Manfaat penelitian	5

## BAB II KAJIAN PUSTAKA

A. Penyakit kanker	6
B. Alga laut	8
C. Bakteri simbion	10
D. Peptida bioaktif	11
E. Hidrolisis enzimatis	13
F. Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	15
G. Uji mitotik sel zigot bulu babi <i>Tripneustes gratilla</i> Linn.	16
H. Kerangka pikir	18
I. Hipotesis	20

## BAB III METODE PENELITIAN

A. Waktu dan tempat penelitian	21
B. Alat dan bahan	
1. Alat	21
2. Bahan	21
C. Prosedur penelitian	22
1. Pembuatan media kultur baru	22
2. Pemindehan isolat ke media kultur baru	23
3. Pembuatan media	23
A.) Media inokulum	23
B.) Media produksi	23
4. Penyiapan inokulum	23
5. Penentuan waktu pertumbuhan bakteri	24

6. Produksi bakteri	24
7. Ekstraksi protein dari isolat bakteri	24
8. Fraksinasi protein bioaktif	25
9. Dialisis	25
10. Penentuan kadar protein	26
11. Hidrolisis protein bioaktif	26
12. Pengukuran nilai derajat hidrolisis (DH)	27
13. Ultrafiltrasi hidrolisat protein bioaktif	27
14. Uji aktivitas	
A.) Uji toksisitas BSLT	27
B.) Uji antimitotik sel zigot bulu babi	28
15. Analisis data	
A.) Penentuan kadar protein	29
B.) Penentuan derajat hidrolisis	29
C.) Uji aktivitas toksisitas BSLT	30
D.) Uji aktivitas antimitotik	31

#### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi protein dari bakteri simbiosis alga merah <i>Eucheuma spinosum</i>	32
1. Peremajaan bakteri	32
2. Penentuan kurva pertumbuhan dan waktu optimum produksi protein bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23	33
3. Isolasi protein intraseluler	36
B. Pemurnian protein ekstraseluler dan intraseluler dari	

bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23	38
C. Hidrolisis protein secara enzimatik	41
D. Ultrafiltrasi hidrolisat protein	44
E. Pengukuran kadar protein dan total protein setiap fraksi peptida	46
F. Uji aktivitas toksisitas dengan metode BSLT ( <i>Brine shrip lethality test</i> )	48
1. Uji toksisitas fraksi dialisat ekstraseluler dan intraseluler dengan metode BSLT ( <i>Brine shrip lethality test</i> )	49
2. Uji toksisitas fraksi hidrolisat dan peptida dengan metode BSLT ( <i>Brine shrip lethality test</i> )	50
G. Uji sitotoksitas fraksi peptida dengan metode mitotik terhadap sel zigot bulu babi <i>Tripneustes gratilla</i> Linn.	53
<b>BAB V PENUTUP</b>	
A. Kesimpulan	60
B. Saran	61
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>halaman</b>
1. Peptida dan bioaktivitasnya	13
2. Enzim proteolitik spesifik	15
3. Parameter toksisitas berdasarkan nilai LC <sub>50</sub>	30
4. Parameter sitotoksitas berdasarkan nilai IC <sub>50</sub>	31
5. Kadar protein ekstraseluler dan intraseluler sebelum dan sesudah dialisis	40
6. Konsentrasi dan total protein tiap fraksi protein	47
7. Data pengamatan tingkat toksisitas dialisat protein ekstraseluler dan dialisat protein intraseluler dari bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23	49
8. Data pengamatan tingkat toksisitas hidrolisat protein dan peptida dari bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23	51
9. Data hasil perhitungan persen inhibisi fraksi peptida terhadap sel zigot bulu babi <i>Tripneustes gratilla</i> Linn.	55
10. Nilai IC <sub>50</sub> fraksi peptida terhadap sel zigot bulu babi <i>Tripneustes gratilla</i> Linn.	56
11. Protein dan peptida bioaktif dari bakteri simbion dan aktivitasnya	58

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>halaman</b>
1. Alga merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> )	10
2. Peptida dolastin	11
3. Hidrolisis enzimatis secara umum	14
4. Kerangka pikir	19
5. Pengaruh waktu pertumbuhan bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23 terhadap produksi protein ekstraseluler selama proses fermentasi	34
6. Pengaruh waktu pertumbuhan bakteri <i>Vibrio</i> sp. strain A23 terhadap produksi protein intraseluler selama proses fermentasi	34
7. Data hasil pengukuran konsentrasi hidrolisat protein dan persentase derajat hidrolisis (DH)	43
8. Nilai kadar protein dari berbagai ukuran molekul peptida	45
9. Perbandingan nilai LC <sub>50</sub> antara fraksi protein dan fraksi hidrolisat	52
10. Hasil pengamatan pembelahan sel zigot bulu babi <i>Tripneutes gratina</i> Linn. terhadap fraksi peptida	54

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>halaman</b>
1. Prosedur kerja	71
2. Pembuatan media tumbuh baru	72
3. Pemindahan isolat ke kultur baru	72
4. Pembuatan media	73
5. Penyiapan inokulum	74
6. Produksi bakteri penghasil protein	74
7. Isolasi protein bioaktif	75
8. Bagan kerja fraksinasi protein bioaktif dengan amonium sulfat	76
9. Bagan kerja dialisis	77
10. Prosedur penentuan kadar protein dengan metode Lowry	78
11. Hidrolisis protein menggunakan enzim pepsin	78
12. Ultrafiltrasi	79
13. Skema uji toksisitas BSLT	79
14. Bagan kerja uji antimitotik	80
15. Penentuan protein dengan metode Lowry	81
16. Pembuatan larutan buffer Tris-HCl	82
17. Kurva standar Bovin Serum Albumin pada $\lambda$ 660 nm	84
18. Data hasil penentuan waktu produksi optimum protein dan <i>optical density</i> (OD) dari bakteri symbion alga merah <i>Eucheuma spinosum</i>	85

19. Konsentrasi protein pada sampel ekstrak kasar ekstraseluler ( $\lambda$ 660 nm)	86
20. Konsentrasi protein pada sampel ekstrak kasar intraseluler ( $\lambda$ 660 nm)	87
21. Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan	88
22. Jumlah buffer yang ditambahkan pada proses dialisis	89
23. Tabel kejenuhan amonium sulfat	90
24. Pengukuran kadar protein pada tahap dialisis protein	91
25. Pengukuran kadar protein pada tahap hidrolisis protein dan ultrafiltrasi	93
26. Penentuan Derajat Hidrolisis (DH)	95
27. Penentuan total protein pada fraksi protein dan dialisat protein intraseluler berbagai tingkat kejenuhan	96
28. Penentuan total protein pada fraksi hidrolisat dan peptida	97
29. Penentuan nilai $LC_{50}$ fraksi protein ekstraseluler	98
30. Penentuan nilai $LC_{50}$ fraksi protein intraseluler	103
31. Penentuan nilai $LC_{50}$ fraksi hidrolisat protein	108
32. Penentuan nilai $LC_{50}$ fraksi peptida	112
33. Penentuan nilai $IC_{50}$ peptida	116
34. Isolat bakteri	120
35. Dokumentasi	121

**DAFTAR SINGKATAN**

<b>Singkatan</b>	<b>Arti</b>
NA	Nutrient Agar
BHIB	Brain Heart Infusiom Broth
OD	Optical Density
rpm	rotate per minute
LC	Lethal Concentration
IC	Inhibition Concentration
BSA	Bovine Serum Albumin
BSLT	Brine Shrimp Lethality Test
DH	Derajat Hidrolisis
TCA	Trichloroacetic Acid
MWCO	Molecular weight cut-off
kDa	Kilo dalton

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Kanker adalah salah satu masalah kesehatan yang kasus kematiannya terus menerus meningkat. Menurut data *World Health Organisation* (WHO) tahun 2018 menunjukkan bahwa sekitar 9,6 juta penduduk mengalami kematian akibat kanker, diantaranya 2,09 juta kasus kanker paru-paru, 2,09 juta kasus kanker payudara, 1,28 juta kasus prostat, 1,80 juta kasus kolorektal, dan 1,04 juta kasus kanker perut (WHO, 2019). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI) melaporkan terjadinya peningkatan penderita kanker di tahun 2013 dari 1,4‰ menjadi 1,79‰ pada tahun 2018. Provinsi yang memiliki penderita kanker terbanyak terdapat di provinsi D.I Yogyakarta sebesar 4,86%, diikuti provinsi Sumatera Barat dan Gorontalo.

Angka peningkatan penderita kanker erat kaitannya dengan beberapa faktor antara lain faktor genetik; karsinogen; dan gaya hidup (Kemenkes RI, 2015; Kemenkes RI, 2018). Sejauh ini telah diterapkan beberapa metode dalam pengobatan penyakit kanker diantaranya melalui jalur operasi dengan upaya mengangkat sel kanker tersebut. Selain itu metode lain yang bisa dilakukan sebagai upaya penyembuhan kanker adalah kemoterapi, dan radioterapi. Namun metode ini belum memberikan

hasil yang maksimal, karena efek samping yang ditimbulkan dalam jangka pendek maupun jangka panjang serta dapat beresiko terhadap pertumbuhan sel sehat (Setiawan, 2015; Madan, dkk., 2015; Rahayuwati, dkk., 2017).

Resistensi sel kanker terhadap obat antikanker memicu para peneliti untuk terus melakukan pengembangan dan pencarian senyawa antikanker dengan cara kerja yang baru, yaitu target yang spesifik dan kurang memiliki efek samping (Hoskin & Rammoorthy, 2008; E-kobon, dkk., 2016). Diketahui bahwa bahan alam di darat maupun di laut banyak digunakan dalam pengobatan tradisional untuk penyembuhan berbagai macam penyakit. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu eksplorasi kandungan zat aktif yang terdapat pada bahan alam laut, dalam hal ini senyawa aktif dari rumput laut atau alga.

Indonesia merupakan negara kepulauan yang di dalam lautnya terdapat berbagai macam biota laut, salah satu diantaranya adalah alga merah (*Rhizophyta*). Alga merah merupakan spesies terbanyak di perairan Indonesia dibandingkan dengan alga lainnya (Pakidi, & Hidayat, 2016). Alga ini mengandung protein yang memiliki bioaktivitas antimikroba, antivirus, dan antikanker (Sugrani, dkk., 2019; Prsetyanigsih, & Rahardjo, 2018). Penelitian yang dilakukan Fan, dkk., (2014) menemukan bahwa alga memiliki 47% protein dari berat keringnya.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Goecke, dkk., (2010) ditemukan bahwa 55 spesies alga merah (*Rhizophyta*) bersimbion dengan

bakteri dan bakteri simbion alga mengandung senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya. Oleh karena itu bakteri simbion merupakan salah satu sumber yang tepat digunakan sebagai penghasil protein aktif selain itu, bakteri simbion ini mudah dikultur dan dikembangbiakkan dalam waktu yang cepat serta jumlah sampelnya yang dibutuhkan sedikit (Widyaningsih, & Sa'adah, 2018). Protein aktif yang potensial untuk dikembangkan salah satu diantaranya adalah peptida bioaktif.

Menurut Wang dan Zhang (2016) bahwa hidrolisis protein menjadi peptida dapat dilakukan secara enzimatik yaitu dengan enzim protease seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin yang menghasilkan peptida bioaktif. Beberapa peptida bioaktif dapat digunakan dalam pengobatan diantaranya hexapeptida dari *Ulva lactuca* sebagai antimikroba dan antifungi; cyclic pentapeptida dari *laxaura filamentous* sebagai antikanker; oligopeptida dari alga merah sebagai terapi dan diagnosis otak pada pusat sistem saraf penderita epilepsi; peptida dari *fusiformis* sebagai penurun kolesterol pada darah tikus; dipeptida dari *Undaria pinnatifida* menurunkan tekanan darah pada tikus; depsi-peptida dari *Bryopsis* sp. sebagai antikanker; peptida dari *Porphyra yezoensis* mampu menghambat aktivitas ACE (Holdt, & Kraan 2011; Prasetyaningsih, & Rahardjo, 2018).

Aktivitas antikanker dari peptida bioaktif dapat diketahui dengan melihat aktivitasnya terhadap perkembangan sel zigot bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn. atau biasa disebut antimitotik atau antimitosis. Peptida bioaktif sebagai agen antikanker memiliki keuntungan yakni

kecenderungan resistensi yang rendah. Berdasarkan hasil pengujian, peptida kationik tidak bersifat racun bagi sel normal mamalia. Selain itu aktivitas peptida antikankernya menunjukkan spektrum luas terhadap sel kanker dan menghambat pertumbuhan sel kanker tanpa mengubah sel normal (Mader, dkk, 2006; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Thundimadathil, 2012). Peptida bioaktif sebagai pengobatan dapat dibuat sebagai obat injeksi, hormon, vaksin, dan agen pengantar obat sitotoksik (Thundimadathil, 2012).

Hasil skrining aktivitas alga merah (*Eucheuma cottoni*) dan (*Eucheuma spinosum*) sebelumnya telah dilaporkan memiliki bioaktivitas terhadap antimikroba dan antikanker. Penelitian mengenai peptida bioaktif dari bakteri simbiosis alga merah (*Rhodophyta*) sebagai agen antikanker perlu terus dikembangkan karena, penggunaan peptida bioaktif sebagai bahan baku obat merupakan alternatif yang sangat baik dalam meminimalisir masalah yang timbul akibat kemoterapi konvensional (Thundimadathil, 2012).

Berdasarkan informasi pada latar belakang, maka dilakukan penelitian tentang isolasi protein dan peptida bioaktif dari bakteri simbiosis alga merah (*Eucheuma spinosum*) dan potensinya sebagai agen antikanker dengan harapan hasil penelitian ini dapat dikembangkan dan dimanfaatkan oleh dunia kesehatan untuk membuat produk obat antikanker yang baru dengan menggunakan bahan alam yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan.

### **B. Rumusan Masalah**

1. Berapa kadar protein yang diisolasi dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* ?
2. Bagaimana aktivitas sitotoksik dari peptida bioaktif bakteri simbion alga merah terhadap sel zigot bulu babi *Tripneutes gratilla* Linn. ?
3. Berapa konsentrasi optimum peptida bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan sel zigot bulu babi *Tripneutes gratilla* Linn. ?

### **C. Tujuan Penelitian**

1. Menentukan kadar protein yang diisolasi dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*.
2. Menguji aktivitas sitotoksik peptida bioaktif dari bakteri simbion alga merah terhadap sel zigot bulu babi *Tripneutes gratilla* Linn.
3. Menganalisis konsentrasi optimum peptida bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan sel zigot bulu babi *Tripneutes gratilla* Linn.

### **D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan pengetahuan bagi masyarakat awam mengenai potensi alga laut sebagai penghasil bakteri simbion.
2. Memberikan informasi mengenai protein dan peptida bioaktif sebagai salah satu agen antikanker.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Penyakit Kanker**

Kanker adalah pertumbuhan sel yang tidak normal yang membelah terus menerus dan penyebarannya ke jaringan yang berada disekitarnya. Tumor ganas dan neoplasma merupakan istilah umum yang lainnya diberikan. Triliunan sel yang berada di tubuh semuanya dapat dipengaruhi sel kanker (National Cancer Institute, 2015; WHO, 2019).

Awal mula kanker terjadi di sel, sel merupakan bagian dasar dari tubuh, proses perubahan sel-sel normal menjadi sel kanker perlu untuk diketahui dan dipahami. Saat sel mengalami penuaan maka terjadi penurunan fungsi, sel akan mati selanjutnya sel digantikan dengan sel-sel yang baru. Awal sel kanker terjadi dikarenakan rusaknya proses kematian sel yang terprogram atau disebut apoptosis. Ketika terjadi gangguan atau mutasi terhadap DNA, sel akan mengalami pertumbuhan yang tidak normal (National Cancer Institute, 2015).

Tumor terbagi menjadi dua, yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Tumor jinak memiliki ciri-ciri, yaitu tumbuh secara terbatas, memiliki selubung, tidak menyebar dan bila dioperasi, dapat dikeluarkan secara utuh sehingga dapat sembuh sempurna, sedangkan tumor ganas memiliki ciri-

ciri, yaitu dapat menyusup ke jaringan sekitarnya, dan sel kanker dapat ditemukan pada pertumbuhan tumor tersebut (Kemenkes RI, 2015).

Tahun 2018 diperkirakan kanker penyumbang 9,6 juta kematian secara mendunia. Kanker yang umum terjadi pada pria diantaranya kanker paru-paru, prostat, kolorektal, lambung, dan hati. Sedangkan pada wanita kanker yang umum terjadi diantaranya kanker serviks, payudara, paru-paru, kolorektal, dan teroid. Penyebab utama kematian pada pria disebabkan karena kanker paru-paru, sedangkan penyebab kematian utama pada wanita di negara kurang disebabkan kanker kanker serviks dan kanker payudara (WHO, 2019).

Indonesia di Asia Tenggara menempati urutan ke 8 angka kejadian penyakit kanker. Riskesdas melaporkan terjadi peningkatan prevalensi tumor/kanker dari 1,4‰ pada tahun 2013 menjadi 1,79‰ tahun 2018. Provinsi yang memiliki prevalensi kanker terbesar terdapat di provinsi Yogyakarta sebesar, Sumatra barat dan Gorontalo dengan nilai berturut-turut sebesar 4,86‰, 2,47‰ dan 2,44‰ (Kemenkes RI, 2018).

Kanker muncul dari transformasi sel normal menjadi sel tumor dalam proses multistage yang umumnya berkembang dari lesi pra-kanker menjadi tumor ganas. Perubahan ini adalah hasil dari interaksi antara faktor genetik seseorang dan 3 kategori agen eksternal, termasuk:

- 1 Karsinogen fisik, seperti radiasi ultraviolet dan ionisasi;
- 2 Karsinogen kimia, seperti asbes, komponen asap tembakau, aflatoksin (kontaminan makanan), dan arsenik (kontaminan air minum); dan

3 Karsinogen biologis, seperti infeksi dari virus, bakteri, atau parasit tertentu.

WHO, melalui lembaga penelitian kankernya, Badan Internasional untuk Penelitian Kanker (IARC), mempertahankan klasifikasi agen penyebab kanker (WHO, 2019).

## **B. Alga Laut**

Alga dikenal sebagai rumput laut, yang memiliki struktur sel terorganisir dan organ yang secara struktural berbeda dan memiliki kemampuan untuk tumbuh dalam ukuran besar. Sifat alga yang beragam, kemampuan untuk beradaptasi dan berkembang dalam berbagai lingkungan yang berbeda telah membuat mereka ada di mana-mana bumi, meskipun mereka paling umum di lingkungan air (Laurens, 2017).

Alga terdiri dari mikroalga dan makroalga. Mikroalga adalah spesies uniselular atau multiselular sederhana yang tumbuh secara cepat, dapat bertahan hidup pada kondisi dan lingkungan dengan tekanan ekstrem seperti panas, dingin, anaerob, salinitas, foto oksidasi, tekanan osmotik, dan paparan radiasi ultraviolet (UV). Makroalga (rumput laut) umumnya hidup pada habitat laut, merupakan spesies multiselular, namun tidak memiliki akar, batang atau daun yang nyata. Makroalga memiliki thaloid atau stipe yang fungsinya menyerupai akar dan batang (Baweja, dkk., 2016).

Secara sistematis, rumput laut dikelompokkan ke dalam division *Thallophyta*. Berdasarkan kandungan pigmennya, rumput laut dikelompokkan menjadi 4 kelas yaitu sebagai berikut:

1. *Rhodophyceae* (ganggang merah)
2. *Phaeophyceae* (ganggang coklat)
3. *Chlorophyceae* (ganggang hijau)
4. *Charophyceae* (ganggang biru-hijau)

*Euclima* sp. dan *Hypnea* sp. menghasilkan metabolit primer senyawa hidrokoloid yang disebut karaginan. *Gracilaria* sp. dan *Gelidium* sp. Menghasilkan metabolit primer senyawa hidrokoloid yang di sebut agar. Sementara, *Sargassum* sp. menghasilkan metabolit primer senyawa hidrokoloid yang disebut alginate. Rumput laut yang menghasilkan karaginan disebut karaginofit, penghasil agar disebut agarofit, dan penghasil alginate disebut alginofit (Anggadiredja, dkk., 2010).

Salah satu jenis rumput laut dari kelas *Rhodophyceae* (ganggang merah) adalah *Euclima spinosum*. Menurut Anggadiredja, dkk., (2010) klasifikasi *Euclima spinosum* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Rhodophyta  
Kelas : Rhodophyceae  
Ordo : Gigartinales  
Famili : Solieriaceae  
Genus : Euclima

Spesies : *Eucheuma spinosum* (*Eucheuma denticulatum*)



**Gambar 1.** Alga merah (*Rhodophyceae*)  
(Sumber: Othman, dkk., 2018)

### C. Bakteri Simbion

Bakteri simbion merupakan bakteri yang dapat hidup dan menetap dengan suatu organisme. Senyawa bioaktif yang terkandung pada sel inangnya mampu dihasilkan oleh bakteri simbion. Contohnya bakteri *Endoecteniscidia frumentesis* yang diisolasi dari tunikata *Ecteniscidia turbinata* di perairan Karibia (Perez-Matos, dkk., 2007).

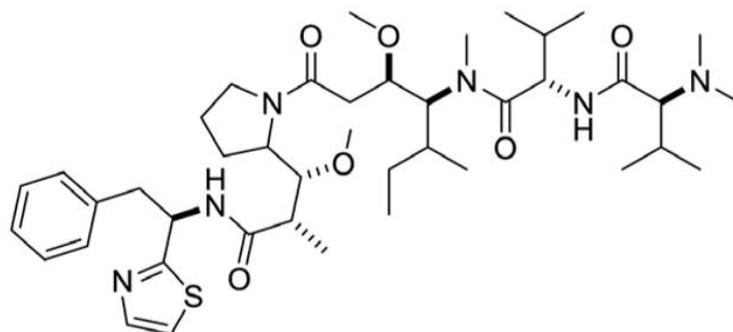
Penelitian mengenai hubungan interaksi antara alga dan makroalga telah dikembangkan kurang lebih 100 tahun, (Hollants, dkk., 2012). Dimana 40 tahun terakhir ini beberapa penelitian telah mengemukakan bahwa makroalga (55 *Rhodophyta*, 46 *Phaeophyceae*, 36 *Chlorophyta*) telah bersimbion dengan bakteri, total dari 148 makroalga 12 alga yang belum diidentifikasi (Goecke, dkk., 2010).

Bakteri simbion makroalga memiliki aktivitas yang cukup tinggi, keadaan tersebut disebabkan karena adanya simbion mutualisme. Bakteri

membantu melindungi permukaan makroalga dari patogen dan meningkatkan pertumbuhan, sebaliknya makroalga memberi tempat dan nutrisi yang diperlukan bakteri (Hollants, dkk., 2012; Goecke, dkk., 2010). Bakteri yang hidup pada suatu inang tertentu besar kemungkinan dapat menghasilkan metabolit bioaktif 5-10 kali lebih besar, dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas. Hal ini menunjukkan metabolit bioaktif bakteri simbiosis dari laut merupakan salah satu sumber yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat (Long dan Azam, 2001).

#### D. Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif merupakan peptida yang tersusun dari gabungan asam amino yang dihubungkan melalui ikatan kovalen khususnya ikatan amida atau yang dikenal dengan ikatan peptida (Sánchez and Vázquez, 2017). Umumnya peptida terdiri atas 2-20 residu asam amino (Fan, dkk., 2014; Wang dan Zang, 2015; Montalvão, 2016). Berikut dibawah ini contoh struktur peptida.



**Gambar 2.** Peptida Dolastin  
(Sumber: Aneiros, 2004)

Peptida bioaktif yang berasal dari produk-produk alami dan sintesis dapat banyak ditemukan dari spesies-spesies laut. Peptida dari spesies laut sangat berpotensi untuk dijadikan bahan baku obat, karena spektrum bioaktivitasnya yang luas, seperti: antivirus, antitumor, antioksidan, antimikroba, kardioprotektif (antihipertensi, antikoagulan, dan antiaterosklerotik) analgesik, antidiabetes, imunomodulator, menekan nafsu makan, dan aktivitas neuroprotektif (Cheung, dkk., 2015; Fan, dkk., 2014).

Peptida bioaktif dapat diperoleh melalui reaksi enzimatik dengan cara protein diekstrak dari alga laut atau dari bakteri simbiotiknya pada suhu dan tekanan yang tinggi. Hasil ekstraksi protein selanjutnya dihidrolisis menggunakan enzim proteolitik dengan kondisi optimum (Wang dan Zhang, 2016).

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 (Fields, dkk., 2009). Hasil peptida bioaktif yang diperoleh memperlihatkan aktivitas biologis yang bervariasi (Montalvão, 2016). Tabel 1 memperlihatkan beberapa penelitian mengenai bioaktivitas dari peptida.

**Tabel 1.** Peptida dan bioaktivitas dari beberapa sumber

<b>Simbol</b>	<b>Sumber</b>	<b>Aktivitas</b>	<b>Pustaka</b>
PGWNQWFL	navicula incerta	Antioksidan	Fan, dkk., 2014
YLLP	Kluyveromyces marxianus var.	ACE inhibitory	Mohanty, dkk., 2016
FIMGPY	Okamejei kenojei	Antikanker	Pan, dkk., 2016
VPP	L helveticus	ACE inhibitor	Sánchez dan Vázquez 2017
LHY	Sardinella aurita	Antioksidan	Sánchez dan Vázquez 2017

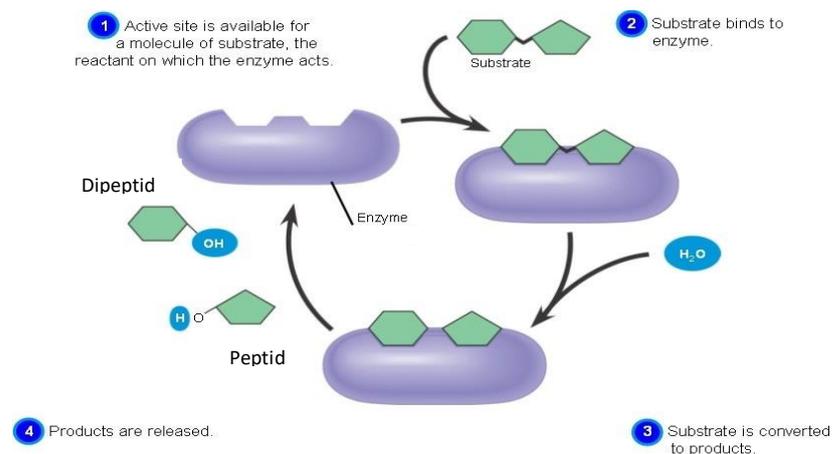
### **E. Hidrolisis Enzimatik**

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. Melakukan hidrolisis dapat dilakukan dengan berbagai metode diantaranya menghidrolisis dengan asam, basa, dan menggunakan enzim (Vaclavik dan Christian, 2008).

Hidrolisis protein dengan asam dapat dengan menggunakan asam kuat seperti HCl dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, sedangkan semecahan protein menjadi molekul yang lebih sederhana dengan larutan basa dapat menggunakan KOH dan NaOH, selanjutnya hidrolisis secara enzimatik dapat menggunakan enzim proteolitik, bisa satu jenis atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Setiap hasil hidrolisi protein akan menghasilkan proporsi

atau campuran asam amino yang berbeda (Vaclavik dan Christian 2008; Sediaoetama, 2008).

Metode hidrolisis secara enzimatik lebih diminati dibandingkan secara kimiawi sebab mudah untuk dikontrol. 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 (Kristinsson 2007; Winarno 2010). Enzim proteolitik yang dapat digunakan dalam proses hidrolisis diantaranya pepsin, tripsin, dan kimotripsin (Wang dan Zhang, 2013).



**Gambar 3.** Hidrolisis enzimatik secara umum  
(Sumber: Anonim 2016)

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 diramalkan posisinya

karena enzim proteolitik bekerja secara spesifik (Tavano, 2013). Berikut beberapa jenis enzim serta posisi hidrolisisnya dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Enzim proteolitik spesifik (Tavano, 2013)

<b>Enzim Protease</b>	<b>Lokasi Hidrolisis</b>
Papain	Asam amino yang mengandung rantai sampai hidrofobik besar pada posisi P2 Rantai samping 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 besar dalam P1.
Termolisin	C-terminal Leu dan Phe pada posisi P1
Kimotripsin	N-terminal Tyr, Trp, Phe, Leu, pada posisi P1

#### **F. Uji Toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Toksisitas merupakan parameter kemampuan suatu bahan kimia dalam merusak sel organisme (Cahyono, 2004). Uji sitotoksik adalah pengujian toksisitas yang dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang berfungsi untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Penerapan uji sitotoksik pada kultur sel merupakan salah satu cara penetapan *in vitro* untuk mendapatkan obat-obat sitotoksik. Sistem ini merupakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel (Agustiani, 2014).

Uji toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach merupakan prapengujian untuk penelitian yang berkorelasi dengan uji sitotoksik (Millati,

2016). Menurut Meyer, dkk., (1982), tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat nilai  $LC_{50}$ -nya. Semakin rendah nilai  $LC_{50}$ -nya maka semakin toksik suatu senyawa dan semakin berpotensi sebagai senyawa antikanker (Meyer, dkk.,1982).

BSLT merupakan pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak (Millati, 2016). Berdasarkan hasil penelitian yang lakukan Carballo, dkk., (2002), mengenai kelayakan penggunaan metode BSLT untuk pengujian aktivitas farmakologi produk bahan alam, menunjukkan adanya korelasi positif antara BSLT dan uji sitotoksik (50% spesies yang aktif dalam BSLT juga aktif dalam uji sitotoksik). Menurut Widyastuti (2009), nilai  $LC_{50}$  untuk sitotoksik umumnya adalah sepersepuluh nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari BSLT.

#### **G. Uji mitotik sel zigot bulu babi *Tripneustes gratilla* Linn.**

Penghambatan pembelahan sel merupakan suatu ukuran aktivitas antimitotik dari senyawa kimia. Senyawa kimia yang bersifat antimitotik seperti Vinblastine dan Podophyllotoxin telah ditunjukkan penghambatannya terhadap pembelahan sel telur bulu babi setelah fertilisasi (Thomson, 2001).

Studi penghambatan pada perkembangan sel telur bulu babi merupakan model yang cocok untuk mendeteksi aktivitas sitotoksik dari senyawa baru. Sel bulu babi juga digunakan secara luas sebagai model untuk mengevaluasi perkembangan toksikologi (Malpezzi, 1994).

Beberapa tahun terakhir ini embrio dan telur bulu babi telah digunakan sebagai model untuk mempelajari pembelahan sel dan perkembangan embrio. Juga telah dimanfaatkan untuk mendeteksi aktivitas sitotoksik dan teratogenik suatu senyawa baru. Seringkali pada beberapa studi penelitian, ditekankan pada perkembangan sel telur bulu babi sebagai model suatu multiseluler untuk evaluasi aktivitas anti-tumor (Sousa, dkk., 2009).

Sel zigot bulu babi memiliki sensitivitas selektif terhadap obat dan mengalami tahapan pembelahan seperti halnya sel kanker, sehingga banyak digunakan dalam penelitian antikanker (Johannes, dkk., 2013). Misalnya, untuk melihat pengaruh suatu senyawa dalam menghambat laju pembelahan dan pertumbuhan sel atau yang sering disebut sebagai sifat antimitotik. Mekanisme ini juga merupakan indikator yang dapat digunakan dalam menemukan senyawa-senyawa yang dapat dijadikan bahan dalam pembuatan obat antikanker (Rusdy, dkk., 2017).

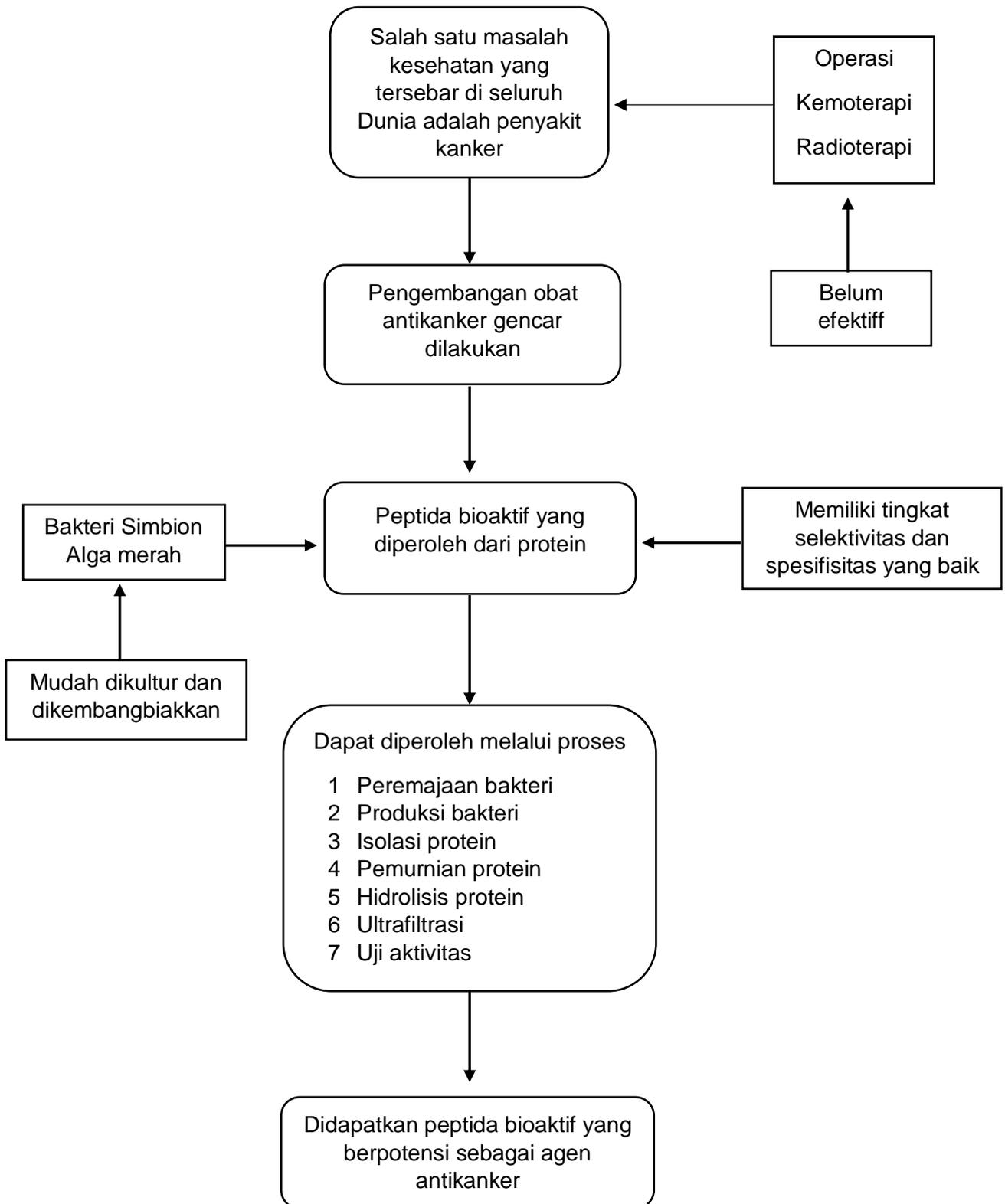
Menurut Jamaluddin (1996) bahwa pada umumnya kerja dari antikanker berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel yang esensial. Pada sel kanker maupun sel normal tidak mengalami perbedaan yang kualitatif, maka bahan antikanker bersifat sitotoksik dan bukan bersifat kankerotoksik.

Peptida yang bermuatan positif salah satu parameter fisikokimia yang membuat interaksi elektrostatis terhadap dinding sel kanker yang bermuatan negatif. Peptida yang menempel pada permukaan membran sel

kanker akan mengganggu stabilitas dan fluiditas membran dengan pembentukan pori (model *toroidal* dan *model barrel-stave*) maupun pembentukan non-pori (model karpet). Ketiga model tersebut disebut dengan mekanisme membranolitik, disamping itu juga peptida dapat bekerja secara non-membranolitik (E-Kobon, dkk., 2016; Goyal dan Mattoo, 2016; Wang 2017).

## H. Kerangka Pikir

Penyakit kanker merupakan salah satu masalah kesehatan yang tersebar di seluruh Dunia. Beberapa pengobatan telah dilakukan untuk mengatasi penyakit tersebut, diantaranya melalui jalur operasi, kemoterapi, dan radioterapi, namun beberapa pengobatan tersebut belum memberikan hasil yang maksimal bahkan dapat memberikan dampak negatif. Pengembangan obat antikanker gencar dilakukan. Peptida bioaktif merupakan salah satu agen antikanker yang berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut. Peptida bioaktif dapat diperoleh dari bakteri yang bersimbion dengan tumbuhan laut alga, untuk mendapatkan peptida bioaktif dapat dilakukan dengan beberapa tahapan diantaranya peremajaan bakteri, produksi bakteri, isolasi protein, pemurnian protein, hidrolisis protein, dan ultrafiltrasi protein. Peptida bioaktif yang diperoleh diuji aktivitasnya untuk melihat potensi antikanker.



**Gambar 4.** Kerangka Pikir

## I. HIPOTESIS

Hipotesis yang dapat diajukan dalam penelitian ini berdasarkan kerangka berfikir diantaranya:

1. Protein yang diisolasi dari bakteri yang bersimbion dengan alga merah memiliki konsentrasi bervariasi di setiap fraksinya.
2. Peptida hasil isolasi dari protein bakteri simbion memiliki aktivitas sitotoksik yang baik.
3. Peptida bioaktif memiliki konsentrasi yang bervariasi terhadap aktivitas sitotoksiknya.