

ISOLASI PROTEIN BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION SPONS

***Petrosia alfiani* DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER**

MOHAMMAD FHADLI AHMAD

H031 17 1502



DEPARTEMEN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2022

ISOLASI PROTEIN BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION SPONS

***Petrosia alfiani* DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Sains pada Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*

Oleh

MOHAMMAD FHADLI AHMAD

H031 17 1502



MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI PROTEIN BIOAKTIF DARI BAKTERI SIMBION SPONS

***Petrosia alflani* DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIKANKER**

Disusun dan diajukan oleh

MOHAMMAD FHADLI AHMAD

H031 17 1502

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

Universitas Hasanuddin

pada 8 November 2022

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

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

Pembimbing Pertama

Dr. Seniwati Dali, M.Si
NIP. 19581231 198803 2 003

Ketua Program Studi



Dr. St. Fauziah, M.Si

NIP. 19720202 199903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mohammad Fhadli Ahmad

NIM : H031 17 1502

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul **“Isolasi Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Spons *Petrosia Alfiani* dan Potensinya sebagai Antikanker”** adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 8 November 2022

Yang Menyatakan,



Mohammad Fhadli Ahmad

PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh, Alhamdulillah segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolasi Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Spons *Petrosia alfiani* dan Potensinya sebagai Antikanker” ini sebagai salah satu persyaratan wajib yang harus diselesaikan mahasiswa Departemen Kimia untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam tak lupa tercurahkan bagi junjungan dan tauladan umat manusia, Nabi Besar Muhammad SAW yang telah senantiasa menjadi penerang bagi kehidupan umat manusia di seluruh dunia saat ini.

Pertama-tama penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga karena penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dari berbagai pihak terutama dari kedua orang tua penulis Ayahanda tercinta Drs. H. Ahmad Abdir dan Ibunda tercinta Hj. Najmah, S.Pd, M.M.Pd yang telah mencintai, mendoakan serta memberikan motivasi yang membuat penulis tidak pernah patah semangat dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah senantiasa memberikan rahmat berupa kasih sayang dan kemuliaan bukan hanya di dunia tapi juga di akhirat, Insya Allah.

Terima kasih kepada saudara-saudara saya Sitti Syamsiah Ahmad dan Mohammad Toufiq Ahmad karena telah menjadi kakak yang selalu menjadi inspirasi dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah senantiasa melindungi mereka di jalan kebenaran, Aamiin. Dengan segala kerendahan hati, melalui kesempatan ini pula penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah berjasa selama proses penulisan hingga rampungnya skripsi ini, yakni kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin, Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc.
2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Ayahanda Dr. Eng Amiruddin, S.Si, M.Si beserta semua staf pendidik di Fakultas MIPA.
3. Ketua Departemen Kimia, Ibunda Dr. St. Fauziah, M.Si dan Sekretaris Departemen Kimia, Ibunda Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si beserta seluruh dosen dan staf Departemen Kimia yang telah membantu penulis dalam proses administrasi dan pengajaran selama menjalani masa perkuliahan mulai dari awal hingga akhir studi.
4. Ayahanda Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D selaku pembimbing utama dan Ibunda Dr. Seniwati Dali M.Si selaku pembimbing pertama yang menjadi orang tua di kampus yang senantiasa meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing, mengarahkan, dan memberi motivasi serta solusi dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Ayahanda Prof. Dr. Abd . Wahid Wahab, M.Sc dan Bapak Dr. Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si selaku dosen penguji, atas segala diskusi dan saran yang telah diberikan demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Seluruh Analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk Ibu Mahdalia, S.Si, M.Si dan Kak Andi Akbar, S.Si selaku Analis Laboratorium Biokimia atas segala fasilitas dan bantuan yang diberikan selama penelitian ini berlangsung.
7. Rekan-rekan KIMIA 2017 yang merupakan saudara seperjuangan dalam menimba ilmu di Departemen Kimia. Terkhusus saudara-saudariku AL17ATIK, terima kasih atas pengalaman, kebersamaan suka dan duka yang tak akan terlupakan, tak lupa juga kepada adik-adik H18RIDISASI, KONF19URASI, I20MER, dan DIME21SASI.

8. Partner penelitian Biochemistry Squad, Nursalim, Moelkhaiva, Farda Aidul, Syamsuriadi, Arfadillah Rustam, Wahyudin Rauf, Ahmad Maldini, Yuyun Sukawati, Nurul Hudah, Sumiati, Riska, Wiwinda, Esse, dan Fitriani. Terima kasih atas semangat di kala suka dan duka yang memberikan warna dalam melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia.
9. Teman-teman KKN 105 Biringkanaya 1 Universitas Hasanuddin. Terimakasih atas segala pengalaman pengabdian kemasyarakatan dan kerjasamanya selama 50 hari di Desa Nelayan Untia.
10. Teman-teman Magang Laboratorium Forensik Polda Sulawesi Selatan, Fathir, Hasanuddin, Marfa dan Fatima. Terima kasih telah kebersamaan di proses masa-masa akhir kuliah sebagai bekal pengalaman di dunia kerja.
11. Teman-teman Kampus Mengajar SD Bahana Islamic School dan Pejuang Sosial Kemensos Kabupaten Pangkep. Terima kasih atas segala pengalaman berharga untuk terjun melihat kehidupan masyarakat social secara langsung.
12. Serta ucapan terima kasih kepada pihak-pihak lain yang telah memberikan bantuan secara langsung maupun tidak langsung, atas segala kebaikan yang telah diberikan penulis mengucapkan banyak terima kasih.

Penulis menyadari bahwa tulisan ini tidak luput dari kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kepada para pembaca, kiranya dapat memberikan sumbangan pemikiran demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Esa melimpahkan kasih dan rahmat-Nya kepada kita semua dan dapat memberikan manfaat bagi pihak-pihak dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar, 8 November 2022

Mohammad Fhadli Ahmad

ABSTRAK

Spons merupakan salah satu biota laut yang banyak dieksplorasi dan diteliti sebab mengandung molekul organik yang melimpah dan juga memiliki aktivitas farmakologis yang berpotensi digunakan sebagai bahan baku obat. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbiosis penghasil protein bioaktif dari spons *Petrosia alfiani* yang teridentifikasi sebagai *Enterobacter* sp., kemudian menentukan aktivitas dan toksisitas protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang dikumpulkan dari Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Kota Makassar, Sulawesi Selatan. Protein ekstraseluler dan intraseluler diisolasi melalui serangkaian proses ekstraksi dan fraksinasi amonium sulfat pada tingkat kejenuhan (F1) 0-20%, (F2) 20-40%, (F3) 40-60% dan (F4) 60-80%. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan dengan total protein ekstraseluler F1 20,689 mg; F2 7,538 mg; F3 4,231 mg; F4 36,065 mg dan protein intraseluler F1 34,780 mg; F2 9,655 mg; F3 23,341 mg; F4 20,238 mg. Fraksi protein menunjukkan bahwa waktu optimum hidrolisis pada hidrolisat protein yaitu selama 4 jam yang menghasilkan derajat hidrolisis sebesar 50,72 % untuk FH1 dan 58,67 % untuk FH2. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menunjukkan aktivitas tertinggi pada fraksi protein ekstraseluler F4 dan intraseluler F1 tergolong toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 49,980 $\mu\text{g/mL}$ dan 56,859 $\mu\text{g/mL}$ yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai alternatif agen antikanker.

Kata Kunci: antikanker, bakteri simbiosis, *Petrosia alfiani*, protein bioaktif, spons.

ABSTRACT

Sponges are one of the marine biota that are widely explored and researched because they contain abundant organic molecules and also have pharmacological activities that the potential to be used as medicinal raw materials. The purpose of this study was to isolate and identify the bioactive protein-producing symbiont bacteria from the *Petrosia alfiani* sponge identified as *Enterobacter* sp., then determine the activity and toxicity of the bioactive protein from the *Petrosia alfiani* sponge symbiont bacteria collected from Barrang Lompo Island, Ujung Tanah, Makassar City, South Sulawesi. Extracellular and intracellular proteins were isolated through a series of extraction and using the ammonium sulfate fractionation method at saturation levels (F1) 0-20%, (F2) 20-40%, (F3) 40-60% and (F4) 60-80%. Protein purification is carried out by dialysis using a cellophane bag with a total protein produced extracellular protein F1 of 20.689 mg; F2 7,538 mg; F3 4.231 mg; F4 36,065 mg and intracellular protein F1 34,780 mg; F2 9.655 mg; F3 23,341 mg; F4 20,238 mg. The protein fraction showed that the optimum hydrolysis time for protein hydrolyzate was 4 hours which resulted in the degree of hydrolysis of 50.72% for FH1 and 58.67% for FH2. The results of the toxicity test using the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) method showed the highest activity in the extracellular protein fraction F4 and intracellular fraction F1 classified as toxic with LC₅₀ values of 49.980 g/mL and 56.859 g/mL which have the potential to be developed as alternative anticancer agents.

Keywords: anticancer, bioactive protein, sponge *Petrosia alfiani*, symbiotic bacteria.

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Maksud Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Tinjauan Umum Spons.....	7
2.2 Tinjauan Umum Spons <i>Petrosia alfiani</i>	11
2.2.1 Taksonomi	11
2.2.2 Morfologi.....	11
2.3 Tinjauan Umum Bakteri Simbion Spons	12
2.4 Tinjauan Senyawa Protein.....	14
	ix

2.4.1	Defenisi Protein	14
2.4.2	Protein Antikanker	15
2.5	Tinjauan Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein... ..	16
2.5.1	Ekstraksi.....	16
2.5.2	Fraksinasi dengan Metode <i>Salting out</i>	17
2.5.3	Dialisis.....	18
2.6	Hidrolisis Protein	18
2.7	Metode Uji Aktivitas Antikanker Metode BSLT.....	19
BAB III METODE PENELITIAN		22
3.1	Bahan Penelitian	22
3.2	Alat Penelitian	22
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.4	Prosedur Penelitian	23
3.4.1	Preparasi Sampel.....	23
3.4.2	Pembuatan Media.....	23
3.4.2.1	Media <i>Nutrient Broth</i>	23
3.4.2.2	Media <i>Nutrient Agar</i>	23
3.4.2.3	Media Inokulum.....	24
3.4.2.4	Media Produksi	24
3.4.3	Penyegaran Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i>	24
3.4.3.1	Bagian Permukaan Spons <i>Petrosia alfiani</i>	24
3.4.3.2	Bagian Dalam Spons <i>Petrosia alfiani</i>	24
3.4.4	Isolasi Bakteri Simbion.....	25
3.4.5	Identifikasi Isolat Bakteri Simbion	25
3.4.6	Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri	26

3.4.7 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri Symbion	26
3.4.8 Pemurnian Protein Bioaktif.....	27
3.4.8.1 Fraksinasi Amonium Sulfat	27
3.4.8.2 Dialisis	27
3.4.9 Penentuan Kadar Protein.....	28
3.4.10 Hidrolisis Enzimatik Protein.....	29
3.4.11 Penentuan Derajat Hidrolisis.....	29
3.4.12 Uji Toksisitas dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	30
3.4.12.1 Penyiapan Larva Udang.....	30
3.4.12.2 Pelaksanaan Uji.....	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Isolasi Bakteri Symbion Spons <i>Petrosia alfiani</i>	31
4.2 Identifikasi Isolat Bakteri Symbion PA 8(3).....	32
4.3 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri	35
4.4 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri ...	38
4.5 Pemurnian Protein Bioaktif.....	39
4.6 Hidrolisis Enzimatik Protein	41
4.7 Uji Aktivitas Antikanker melalui Uji Toksisitas dari Setiap Fraksi Protein Bioaktif Isolat Bakteri <i>Enterobacter sp.</i> PA 8(3).....	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Spons <i>Petrosia alfiani</i>	12
2. Mekanisme enzimatik secara umum	19
3. Larva <i>Artemia salina</i> Leach	21
4. Isolat bakteri <i>Petrosia alfiani</i>	32
5. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein ekstraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>Enterobacter</i> sp. PA 8(3)	37
6. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein intraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>Enterobacter</i> sp. PA 8(3)	37
7. Persentase derajat hidrolisis hidrolisat protein bakteri <i>Enterobacter</i> PA 8(3) dari fraksi F4 (ekstraseluler) dan F1 (intraseluler)	42

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia.....	10
2. Hasil identifikasi isolat bakteri simbion PA 8(3).....	33
3. Distribusi kadar protein ekstraseluler dan intraseluler dari fraksi dialisat pada beberapa tingkat kejenuhan amonium sulfat.....	40
4. Nilai LC ₅₀ masing-masing fraksi protein ekstraseluler dan intraseluler dari bakteri <i>Enterobacter</i> sp. PA 8(3).....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Diagram Alur Penelitian	52
2. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam <i>Nutrient Broth</i>	53
3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri	54
4. Bagan Kerja Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif.....	56
5. Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat	57
6. Bagan Kerja Dialisis	58
7. Prosedur Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	59
8. Bagan Kerja Hidrolisis Enzimatis Protein	60
9. Uji Antikanker Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	61
10. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	62
11. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl	63
12. Penentuan Serapan Maksimum.....	65
13. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumine</i> pada λ 660 nm	66
14. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein Bioaktif dari Bakteri <i>Symbion Spons Petrosia alfiani</i>	67
15. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Ekstraseluler	68
16. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler	69
17. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan	70
18. Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat	71
19. Pengukuran Kadar pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein	72
20. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.	73

21. Hidrolisis Protein	74
22. Tabel Harga Probit	75
23. Hasil Perhitungan LC ₅₀ Larva Udang <i>Artemia salina</i> L. pada Setiap Fraksi Protein Bakteri <i>Enterobacter</i> sp. PA 8(3)	76
24. Data Toksisitas Fraksi Protein Ekstraseluler.....	77
25. Data Toksisitas Fraksi Protein Intraseluler	82
26. Data Toksisitas Fraksi Hidrolisat Protein	87
27. Isolat Bakteri	89
28. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana	90
29. Klasifikasi Sampel Spons <i>Petrosia alfiani</i>	91
30. Klasifikasi Bakteri <i>Enterobacter</i> sp. PA 8(3)	92
31. Dokumentasi	93

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BSLT	<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
DH	Derajat Hidrolisis
Fp	Faktor pengenceran
LC	<i>Lethal Concentration</i>
mg/mL	milligram per mililiter
Nm	nanometer
OD	<i>Optical Density</i>
PA	<i>Petrosia alfiani</i>
Ppm	<i>part per million</i>
Rpm	<i>revolutions per menits</i>
SIM	<i>Sulfid Indol Motility</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TSIA	<i>Triple Sugar Iron Agar</i>
VP-MR	<i>Voger Proskaur-Methyl Red</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara kepulauan terbesar di dunia, terdiri dari 17.480 pulau dengan garis pantai 95.000 km dan merupakan yang terpanjang kedua di dunia setelah Kanada, dimana 2/3 wilayah negaranya merupakan lautan, dikenal sebagai negara dengan *mega biodiversity* (Wahyudin dkk., 2019). Oleh karena itu, Indonesia dapat dianggap sebagai jantung keanekaragaman hayati dunia, termasuk keanekaragaman hayati pesisir dan laut yang dimilikinya (Wahyudin dan Mahipal, 2013).

Secara geografis, Indonesia memiliki wilayah perairan yang luas sehingga tentunya mengandung kekayaan molekul organik bahan alam laut yang seharusnya dapat dijadikan sebagai objek penelitian dan pengembangan. Beberapa biota laut seperti spons dan alga telah banyak diteliti, dieksplorasi dan dikembangkan untuk digunakan sebagai sumber bahan baku obat di industri farmasi. Eksplorasi dan penelitian biota laut untuk keperluan farmasi telah berkembang pesat dalam beberapa dekade terakhir ini, mengingat banyaknya kandungan senyawa bioaktif yang dimiliki. Salah satu dari keanekaragaman biota laut yang dapat dimanfaatkan dalam eksplorasi penelitian adalah spons.

Spons merupakan salah satu biota laut yang sangat prospektif sebagai sumber senyawa bahan-bahan alami seperti peptida, terpenoid, steroid, asetogenin, alkaloid, halida siklik, dan senyawa nitrogen lainnya. Senyawa-senyawa ini memiliki aktivitas farmakologis seperti *antifouling*, antitumor, antiinflamasi, antivirus, antibakteri, antijamur, antimalaria (Nowin dkk., 2019). Spons merupakan

biota laut yang hidup menetap di dasar perairan, tergolong sebagai filum poripera yang memiliki peran yang cukup penting di dalam ekosistem terumbu karang. Selain itu, spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentase keaktifannya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999).

Spons *Petrosia alfiani* adalah spesies baru yang ditemukan oleh de Voogd dan Van Soest (2002) yang tersebar di kawasan perairan kepulauan Spermonde, Barat-Selatan Sulawesi. *Petrosia alfiani* berbentuk bulat (globular) besat atau seperti ranting dengan panjang maksimum 20 cm, lebar 10 cm dan tinggi 4 cm, berwarna kuning, berubah menjadi merah-coklat pada udara terbuka. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, beberapa jenis dari sponge ini memiliki beragam senyawa bioaktif, diantaranya yang berhasil diisolasi dari sponge *Petrosia* sp. yakni senyawa Menzamin A dari perairan Bunaken, Manado (Gemini dkk., 2005), Van Soest dan Braekman (1999) menemukan beberapa senyawa bioaktif dari family *petrosidae* diantaranya polihidroksilat asetilin, siklik 3-alkilpiperidin, dan siklopropanosterol dan senyawa Aragusterol A (steroid) diperoleh dari kepulauan Similan, Thailand (Pailee dkk., 2017) aktif sebagai senyawa sitotoksik yang merupakan sifat dasar suatu senyawa yang berpotensi sebagai antikanker (El Sayed dkk., 2001). Pada sponge ini juga ditemukan senyawa poliasetilen, dideoxypetrosynol A yang menunjukkan aktivitas antitumor pada sel melanoma kulit manusia (Cho dkk., 2004). Aktivitas antibakteri juga ditemukan pada 5,8-epidioksi-24 etilkolest-6-en-3-ol yang merupakan senyawa steroid dari sponge *Petrosia nigrans* yang diperoleh dari perairan Pesisir Selatan, Kepulauan Sumatera Barat (Handayani dkk., 2011).

Kanker merupakan penyakit yang diawali dengan pertumbuhan sel secara tidak terkendali yang mana berkemampuan untuk menyusup dan menimbulkan kerusakan pada sel-sel sehat yang ada di dalam tubuh. Menurut Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2019) penyakit kanker adalah salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Kanker telah menjadi penyakit nomor satu yang dapat menyebabkan kematian di negara-negara maju, menggeser penyakit jantung berdasarkan hasil dua survei global terhadap tren kesehatan yang dilaksanakan selama satu dekade ini. Kematian akibat kanker di seluruh dunia diperkirakan akan terus meningkat, dengan perkiraan 13,1 juta kematian pada tahun 2030.

Angka peningkatan penderita kanker erat kaitannya dengan beberapa antara lain faktor genetik, karsinogen, dan gaya hidup (Kemenkes RI, 2019). 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 dan Rammoorthy, 2008). Dalam beberapa tahun terakhir, bahan alam sebagai target bahan uji telah banyak dimanfaatkan oleh peneliti dimana keberadaannya yang melimpah di alam dan juga penggunaan bahan alam dapat meminimalisir efek samping yang ditimbulkan (Nurhajrah, 2013).

Saat ini penelitian tidak hanya terfokus pada spons, tetapi juga pada bakteri simbiosis spons. Spons laut diketahui menjadi tempat hidup beberapa jenis bakteri yang jumlahnya mencapai 40 % dari biomassa spons (Putra dkk., 2017). Adanya interaksi metabolit bioaktif yang dihasilkan oleh biota laut dengan bakteri yang bersimbiosis menyebabkan bakteri terinduksi untuk menghasilkan suatu metabolit bioaktif yang spesifik yang dikenal dengan protein bioaktif (Nofiani, 2008). Penggunaan bakteri simbiosis dapat menjadi salah satu solusi agar tidak terjadi eksploitasi secara berlebihan pada pemanfaatan spons.

Senyawa-senyawa yang telah berhasil diisolasi dari spons sebagai antikanker antara lain metilheksadekanat dari spons *Ianthellabasta*, fraksi protein dari spons *Lamellodysidea herbacea*, ekstrak spons laut *Aaptos suberitoides* yang menghambat pertumbuhan kanker serta uji toksisitas pada spons laut *Clathria* sp. (Sukmarianti dkk., 2013; Sumilat, 2017; Puji dkk., 2012; Sadarun dkk., 2010).

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

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

1.2 Rumusan Masalah

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

1. apakah bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* mengandung senyawa bioaktif dari kelompok protein?
2. apakah protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* berpotensi sebagai antikanker?
3. bagaimana toksisitas protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

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

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* penghasil protein bioaktif.
2. menentukan fraksi protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang memiliki potensi sebagai antikanker.
3. melakukan pengujian toksisitas protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

1.4 Manfaat Penelitian

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Spons

Biota laut merupakan kekayaan alam yang tak ternilai harganya. Berbagai usaha telah dilakukan manusia untuk menyingkap rahasia yang terkandung dalam biota laut dan produknya. Salah satunya yaitu dengan menemukan senyawa-senyawa bioaktif baru yang memiliki potensi sebagai sumber bahan baku obat yang telah memberikan harapan baru untuk penanganan berbagai jenis penyakit yang belum ditemukan obatnya (Rasyid, 2008).

Salah satu organisme laut yang merupakan sumber senyawa bioaktif baru adalah spons laut. Kemajuan di bidang pengembangan metode dan sarana analisis kimia serta uji aktivitas biologi termasuk uji efek atau aktivitas farmakologi, telah memungkinkan dalam beberapa tahapan tertentu dapat dilakukan isolasi, identifikasi, struktur molekul, dan penentuan aktivitas atau efek farmakologi dari molekul bioaktif spons laut (Suparno, 2005).

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

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

Menurut Kozloff (1990) sponge dapat diklasifikasikan berdasarkan pada pengelompokan secara umum dan komponen rangka yang dimiliki yaitu :

1. Kelas Calcarea atau Calcispongiae adalah kelas spons yang hidup di daerah pantai yang dangkal, bentuk tubuhnya sederhana. Spikulanya terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk *calcite*. Sebagian besar sponge dari kelas ini bentuknya kecil-kecil dan berwarna putih keabu-abuan dan ada beberapa jenis berwarna kuning, merah jambu dan hijau.
2. Kelas Demospongiae adalah kelompok spons yang paling dominan di antara filum porifera. Spons ini tersebar luas di alam, serta jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak, berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa (*Dictyoceratida*, *Dendroceratidada* dan *Verongida*) spikulanya hanya terdiri dari serat spongin, serat kolagen atau spikulanya tidak ada.
3. Kelas Hexactinellida merupakan sponge yang hidup di daerah dalam dengan kedalaman 50 meter bahkan ada yang dapat tumbuh hingga 1 meter, disebut juga sebagai spons gelas. Spikula dari silikat dan tidak mengandung sponging.

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

Spons adalah salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons laut telah banyak diketahui manfaatnya. Senyawa bioaktif tersebut dihasilkan oleh sel-sel spons itu sendiri, mikrosimbiotiknya, atau keduanya secara bersama-sama. Spons merupakan sumber senyawa bahan alam seperti terpenoid, poliketida, alkaloid, dan masih banyak lagi senyawa-senyawa yang lain. Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi biomedik yang berguna bagi penyembuhan penyakit tertentu pada manusia, misalnya sebagai antikanker, antibiotik, antitumor, antiinflamasi, inhibitor enzim, dan sifat-sifat lainnya (Ralph, 1998).

Spons juga diduga mengandung senyawa peptide, glikosida, saponin, steroid, amina, asam fenolik dan squalen serta turunannya yang dihasilkan dari metabolit sekunder. Spons juga kaya akan senyawa kimia seperti keratin, asam amino bebas, sterol, asam lemak, brominat phenol, derivat senyawa dibromotyrosine dan bromopyrol. Spons yang telah berhasil dipisahkan komponen bioaktifnya mengandung sterol yang telah diidentifikasi dari spons seperti elianasterol, poriferasterol dan chondrillasterol (Ralph, 1998). Beberapa senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons Indonesia dapat dilihat pada Tabel 1.

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

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

Dari spons *Theonella swinhoei* yang dikumpulkan dari perairan Kepulauan Barrang Lompo, Sulawesi Selatan, telah diisolasi senyawa aktif yang diberi nama Barangamide A. Senyawa merupakan senyawa baru berupa undecapeptidesiklik yang memiliki tiga unit N-methylated aminoacid, dan tiga β -alanine yang saling berikatan secara bergantian. Barangamide A telah diuji aktivitasnya terhadap sel leukemia limposit dan menunjukkan aktivitas sitotoksik yang ditunjukkan dengan IC_{50} 1.3-2.4 μ m/mL. Bitungolides A diisolasi dari spons *Theonella swinhoei* yang dikumpulkan dari perairan Bitung. Bitungolide merupakan substance berupa polyketides. Bitungolides menunjukkan aktivitas sitotoksik IC_{50} 10 μ g/mL (Rachmat, 2008).

2.2 Tinjauan Umum Spons *Petrosia Alfiani*

2.2.1 Taksonomi

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

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

2.2.2 Morfologi

Morfologi luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisika, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindungi atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam spons cenderung memiliki tubuh yang simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama pada perairan yang dangkal (de Voogd dan Van Soest, 2002).

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

atau tumbuhan. Kelompok spons lain mempunyai bentuk lebih teratur melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk yang dimiliki spons dapat beragam. Beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, seperti cawan atau seperti kubah. Ukuran spons juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5 cm. Jenis-jenis spons tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya. Morfologi spons *Petrosia alfiani* dapat dilihat pada Gambar 1 (de Voogd dan Van Soest, 2002).



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

2.3 Tinjauan Umum Bakteri Simbion Spons

Bakteri adalah sel prokariotik yang khas, uniseluler dan tidak mengandung struktur yang terbatas membran didalam sitoplasmanya. Sel bakteri secara khas berbentuk bulat (kokus), batang (basilus) atau spiral (spirillum), dengan diameter bakteri sekitar 0,5-1,0 μm dan panjang 1,5-2,5 μm . Selain itu, bakteri memiliki informasi genetik berupa DNA tapi tidak terlokalisasi dalam nukleus dan tidak mempunyai membran inti (Irianto, 2006). Bakteri memiliki struktur dasar yang meliputi dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, dan granula penyimpanan. Beberapa bakteri dengan jenis tertentu memiliki struktur tambahan

yang meliputi kapsul (lapisan lendir), flagellum (bulu cambuk), pilus, fimbria, klorosom, vakuola gas, dan endospore (Pelczar, 1988). Bakteri dapat diklasifikasikan dengan berbagai cara, salah satu klasifikasi yang sering digunakan adalah pewarnaan Gram. Berdasarkan pewarnaan Gram bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram negatif adalah merah, sedangkan Gram positif adalah warna ungu (Hifizah, 2012).

Spons adalah hewan berpori yang termasuk *filter feeder* yaitu hewan yang memiliki cara makan dengan cara menyaring air laut yang mengandung makanan melalui pori-pori. Mikroorganisme laut seperti halnya makhluk hidup lainnya sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor abiotik (sifat fisik dan kimia) lingkungan sekitarnya. Faktor tersebut tidak saja mempengaruhi keberadaan suatu jenis mikroba dalam laut, tetapi juga mempengaruhi pertumbuhan, perbanyakan, dan kegiatan-kegiatan yang penting bagi organisme yang lain.

Mikroba selain sebagai makanan juga dijadikan simbiosis dari spons karena mikroba memakai tubuh dari spons yang berpori-pori sebagai inangnya untuk tempat hidup dan perlindungan (Taylor dkk., 2007). Senyawa bioaktif yang terkandung pada sel inangnya mampu dihasilkan oleh bakteri simbiosis. Bakteri simbiosis memiliki aktivitas yang cukup tinggi karena keadaan tersebut disebabkan karena adanya simbiosis mutualisme (Ramadan, 2020). Bakteri yang hidup pada 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).

2.4 Tinjauan Senyawa Protein

2.4.1 Defenisi Protein

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

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

Protein memiliki empat tingkat struktur dasar yaitu struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener. Struktur primer menunjukkan jumlah, jenis dan urutan asam amino dalam molekul protein. Oleh karena ikatan antar asam amino ialah ikatan peptida, maka struktur primer protein juga menunjukkan ikatan peptida yang urutannya diketahui. Pada rantai polipeptida terdapat banyak gugus C=O dan gugus N-H. Kedua gugus ini dapat berikatan satu sama lain karena adanya ikatan hidrogen. Apabila ikatan hidrogen ini terbentuk antara gugus-gugus yang terdapat dalam satu rantai polipeptida, akan terbentuk struktur heliks. Ikatan hidrogen dapat terjadi antara dua rantai polipeptida atau lebih dan membentuk konfigurasi α yaitu bentuk rantai sejajar yang berkelok-kelok dan disebut struktur lembaran berlipat. Struktur α heliks dan lembaran berlipat merupakan struktur sekunder protein.

Struktur tersier menunjukkan kecenderungan polipeptida membentuk lipatan atau gulungan, dan membentuk struktur yang lebih kompleks. Struktur ini dimantapkan dengan adanya beberapa ikatan antara gugus R pada molekul asam amino yang membentuk protein. Struktur kuantener menunjukkan derajat persekutuan unit-unit protein, sebagian besar protein globular terdiri atas beberapa rantai polipeptida yang terpisah dimana rantai polipeptida ini saling berinteraksi membentuk persekutuan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

2.4.2 Protein Antikanker

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

1. *Ribosome Inactivating Protein (RIP)*

Ribosome Inactivating Protein (RIP) merupakan protein yang umumnya berasal dari tanaman dan bersifat sitotoksik terhadap sel mamalia. Hal ini karena aktivitas rRNA N-glikosidase dan purin glikosidase sehingga menyebabkan kematian sel mamalia. Selain itu, RIP juga mampu menginduksi apoptosis bagi sel yang rusak, dan bersifat antioksidan sehingga RIP merupakan kandidat antikanker yang baik. RIP dapat dikongjugasi dengan antibodi monoklonal sebagai imunotoksin sehingga mempunyai efek yang selektif hanya terhadap sel target (Sudjadi dan Sisindari, 2011).

2. Parasporin

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

2.5 Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein

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

2.5.1 Ekstraksi

Material yang memiliki aktifitas enzim diperlakukan untuk memindahkan protein ke dalam bentuk terlarut sehingga dapat dimanipulasi. Bila material awal merupakan sel hewan atau tanaman maka perlu dilakukan metode penghancuran sel dan melepaskan enzim ke dalam larutan. Kemudian untuk mendapatkan ekstrak yang jernih dilakukan filtrasi atau sentrifugasi untuk memisahkan material yang tidak larut dan debris sel, maka didapatkan homogenat (Palmer, 1991).

Enzim-enzim yang terdapat dalam sitoplasma dapat diekstrak dengan penghancuran membran plasma sel sehingga enzim dapat keluar 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 (Palmer, 1991).

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

2.5.2 Fraksinasi dengan Metode *Salting out*

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

Ikatan hidrogen antara protein dengan air menstabilkan protein dalam larutan namun di samping 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 (Scopes, 1994).

Dengan mengendapkan enzim dengan metode ini maka enzim akan terpisah dari mono-, oligo- sakarida, nukleotida, asam amino bebas, protein lain yang tertinggal dalam larutan. Konsentrasi garam ditingkatkan bertahap dengan tujuan mendapatkan endapan protein yang diinginkan dan membuang endapan protein yang tidak diinginkan. Kemudian endapan tersebut dilarutkan kembali dan sisa garam dihilangkan dengan cara dialisis, maka sampai disini didapatkan ekstrak enzim kasar (Palmer, 1991).

2.5.3 Dialisis

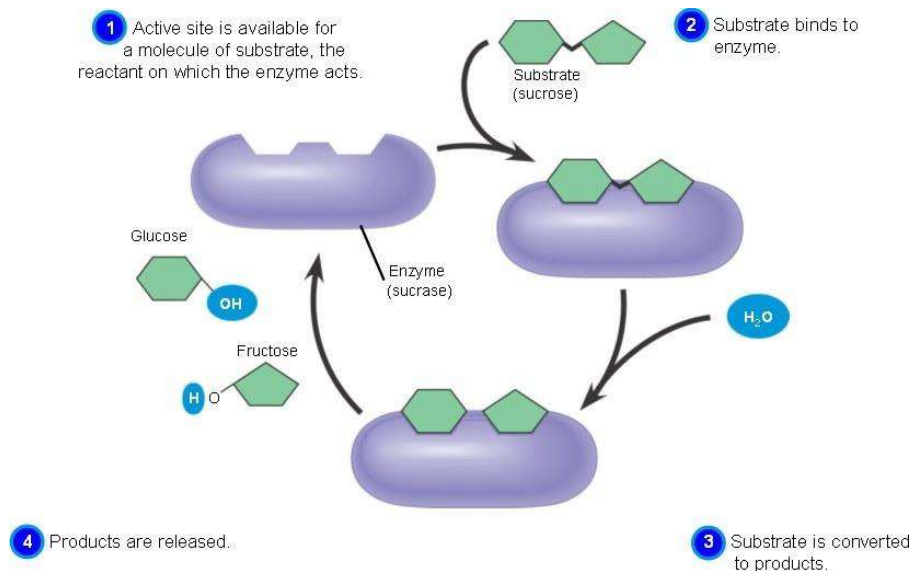
Dialisis merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan molekul kecil seperti garam atau larutan protein dari enzim yang didapatkan melalui tahapan sebelumnya. Prinsip dialisis adalah difusi zat terlarut melalui membran semipermeabel ketika membran menjadi batas antara dua larutan yang berbeda konsentrasi.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

2.6 Hidrolisis Protein

Protein terdiri atas rantai asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida sehingga membentuk beragam struktur yang kompleks. Reaksi hidrolisis protein bertujuan untuk mengubah protein menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu asam amino dan peptida melalui pemutusan ikatan peptida, sehingga dapat lebih mudah untuk dimanfaatkan oleh tubuh. Hidrolisis protein dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu hidrolisis asam, basa dan enzimatis. Setiap protein akan menghasilkan campuran atau proporsi asam amino yang khas setelah reaksi hidrolisis (Vaclavik dan Christian, 2008).

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

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



Gambar 2. Mekanisme enzimatis secara umum

Enzim dan peptida memiliki ikatan yang spesifik 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)

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

Zat yang berkhasiat sebagai obat perlu dilakukan uji khasiat terhadap bahan aktifnya. Salah satu metode yang digunakan adalah *Brine Shrimp Lethality Test*

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

Senyawa aktif yang terdapat dalam tumbuhan hampir selalu toksik pada dosis tinggi, oleh karena itu daya bunuh senyawa aktif terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk membuktikan ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas dan juga memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian. Salah satu organisme yang sesuai untuk hewan uji adalah *Artemia* (udang laut) jenis *Artemia salina* (Suhirman dkk., 2006).

Artemia yang termasuk dalam spesies *Artemia salina* Leach adalah udang yang termasuk dalam famili *Artemidae* yang merupakan udang-udangan tingkat rendah yang hidup sebagai zooplankton yang menempati perairan-perairan yang memiliki kadar garam tinggi. *Artemia* dapat digunakan di laboratorium *bioassay* untuk menentukan toksisitas dengan perhitungan konsentrasi yang menimbulkan 50 % kematian (LC_{50}) yang telah dilaporkan untuk racun dari ekstrak tanaman atau

tumbuhan. Istilah untuk telur artemia adalah *siste* yaitu telur yang telah berkembang menjadi embrio dan kemudian diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan. Artemia yang direndam dalam air laut bersuhu 25 °C maka akan menetas dalam waktu 24-36 jam menjadi larva (naupli). Artemia dapat tumbuh dengan baik pada suhu antara 25-30 °C dengan kadar garam yang tinggi dengan pH = 8 (Panjaitan, 2011). Larva yang telah menetas memiliki warna merah, yang dapat dilihat pada Gambar 3.



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

Tingkat toksisitas senyawa antikanker terhadap hewan uji dalam ekstrak tumbuhan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan dengan cara menghitung tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC_{50} . Suatu senyawa dianggap aktif apabila senyawa memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm dan tingkat kematian dari larva udang sebanyak 50% terhadap ekstrak uji (Lisdawati dkk., 2006).