# ISOLASI PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI EPIFIT YANG BERSIMBION DENGAN ALGA COKELAT Sargassum sp. SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER

# ISOLATION OF BIOACTIVE PEPTIDE FROM EPIPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH BROWN ALGAE Sargassum sp. AS ANTIBACTERIAL AND ANTICANCER AGENT

NUR ASMI H013181002



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

# ISOLASI PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI EPIFIT YANG BERSIMBION DENGAN ALGA COKELAT Sargassum sp. SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER

## Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi Ilmu Kimia

Disusun dan Diajukan Oleh

**NUR ASMI** 

Kepada

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

## **DISERTASI**

# ISOLASI PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI EPIFIT YANG BERSIMBION DENGAN ALGA COKELAT Sargassum sp. SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER

Disusun dan diajukan oleh:

**NUR ASMI** 

Nomor Pokok: H013181002

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi pada tanggal 16 Juli 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat

Prof. Ahyar Ahmad, PhD.

**Promotor** 

Prof. dr. Muh. Masrum Massi, PhD.

**Ko-Promotor** 

Dr. Hasnah Natsir, M.Si.

Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3

Ilmu Kimia

Dekan Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin

Dr. Eng Amiruddin, S.Si., M.Si.

Prof. Ahyar Ahmad, PhD.

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama

Nur Asmi

MIM

H013181002

Program Studi

Imu Kimia

Jenjang

**S3** 

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul: Isolasi Peptida Bioaktif dari Bakteri Epifit yang Bersimbion dengan Alga Cokelat Sargassum Sp. sebagai Agen Antibakteri dan Antikanker.

Benar-benar merupakan karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 8 Agustus 2021

Yang Menyatakan,

Nur Asmi

## PRAKATA

Allah, dengan kenikmatan dari-Nya menjadi sempurna semua amal kebaikan. Kami mohon pertolongan dan hanya kepada-Nya lah kami berharap. Tuhan Rabbul'alamin yang telah memberikan keberkahan ilmu, kekuatan dan kesabaran, sehingga penulisan disertasi dengan judul "Isolasi peptida bioaktif dari bakteri epifit yang bersimbion dengan alga cokelat Sargassum sp. sebagai agen antibakteri dan antikanker" dapat terselesaikan dalam rangka memenuhi persyaratan penyelesaian program Doktor (S3) pada program studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulisan disertasi ini bukan melalui jalan yang lurus-lurus saja, begitu banyak kendala, kesulitan dan hambatan yang dilalui penulis dari awal proses penelitian hingga menjadi satu disertasi yang ada di hadapan kita saat ini. Berkat pertolongan Allah Subhanahu Wata'ala yang begitu besar, Allah Ta'ala pertemukan dengan orang-orang dari berbagai pihak sehingga setiap permasalahan yang dihadapi dapat teratasi. Oleh karena itu, dalam lembaran ini penulis ingin menyampaikan penghargaan, terima kasih, dan rasa hormat yang tak terhingga kepada bapak Prof. Ahyar Ahmad, PhD. sebagai promotor, bapak Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD. dan Ibu Dr. Hasnah Natsir, M.Si. sebagai ko-promotor yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan memberi motivasi, bahkan menjadi seperti orang tua kami hingga akhirnya penulis dapat

menyelesaikan disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada Bapak Dr. Mansur Ibrahim, S.Si, M.Kes., sebagai penguji eksternal, bapak Dr. Abdul Karim, M.Si., ibu Dr. Paulina Taba, M.Phil, dan Ibu Dr. Zaraswati Dwyana M.Si. sebagai penguji internal yang telah banyak memberikan petunjuk dan saran untuk penyempurnaan disertasi ini.

Pada kesempatan ini penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada:

- Penyelenggara program Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan atas bantuan beasiswa bagi penulis, penulis bersyukur dan bangga akan menjadi lulusan PMDSU
- Rektor, Dekan Fakultas MIPA, Ketua Program Studi S3 Ilmi Kimia Universitas Hasanuddinyang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan jenjang program Magister dan Doktor di Universitas Hasanuddin.
- 3. Staff pengajar prodi S3 Ilmu Kimia Universitas Hasanuddin yang telah memberikan bekal ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis selama menempuh pendidikan di prodi S3 Ilmu Kimia semoga menjadi amal jariyah di hadapan Allah Azza Wajalla.
- Prof. Masugi Maruyama, MD, PhD., Dr. Harishkumar Madhyastha dan Dr. Radha Madhyastha atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melaksanakan program PKPI/ Sandwich-like di

- Departemen *Applied Pysiology*, Fakultas Kedokteran, Universitas Miyazaki, Jepang.
- 5. Staff analis di Laboratorium Biokimia FMIPA Unhas, HUM-RC RSP Unhas dan Laboratorium Peternakan Unhas, ibu Mahdalia, S.Si, M.Si., kak Uli, kak Zul, kak Aso dan kak Trias yang telah membantu penulis dalam proses penelitian.
- Rekan-rekan seperjuangan program PMDSU Batch III (Faiizah, Ayun, Ayu, dr. Najdah, Okke, Arbaim, Afrisal, Rahma, Munirah, Arini, Lulu, Ana, Budi, Ega, Rani, Fatma, Fitri, Ida, Jyran, Agus, Sufardin dan Yasser)
- 7. Rekan-rekan seperjuangan S3 Ilmu Kimia, terutama Dr. Andis Sugrani, S.Pd., M.Si, Dr.(C) Nur Faizaah Aqiila Firman, S.Si, Dr. Desy Katrina S.Si. M.Si., Dr. Andi Budirohmi S.T M.T, Dr. Santi S.Si. M.Si, Dr. Ajeng Kurniati Roddu, S.Si., M.Kes., Apt., Dr. Fitriyanti Jumaetri Sami, S.Si., M.Si., Dr.(C) Iwan Dini S.Si., M.Si., dan rekan-rekan S3 lainnya atas segala bantuan, motivasi dan kebersamaannya.
- Rekan-rekan tim peneliti di Laboratorium Biokimia FMIPA UNHAS Sartika, S.Si. M.Si., Leliani, S.Si. M.Si., Tim peneliti S1 dan S2 atas segala bantuannya selama penulis melakukan penelitian di Laboratorium.
- 9. Ibu Andi Asvianti, Bapak Irsan, Andi Akbar, S.Si dan Emi Astuti, S.Si atas segala bantuan dan kerjasamanya yang baik.
- 10. Murabbiyah kami, Ustadzah Lutfah Djabrut, S.Si., Ustadzah Sitti Mulida Wahid, S.Pi., teman-teman Muslimah Zero Eleven, Abiidat 7 dan Mukminat 3, terima kasih untuk setiap nasehat dan supportnya.

Limpahan rasa hormat dan bakti serta do'a yang tulus, penulis persembahkan kepada Ayahanda Mirajuddin dan Ibunda Aminah B. S.Pd, yang telah mengasuh dan membimbing penulis dengan do'a dan kasih sayang yang tulus senantiasa mengiringi perjalanan dalam menuntut ilmu. Semoga *Allah Subhanahu Wata'ala* senantiasa melimpahkan kemuliaan kepada keduanya di dunia dan di akhirat. Tidak lupa kepada ibu Hj. Nur Alia dan bapak Kurniawan Jaya, SE., yang telah menjadi orang tua kedua selama menempuh pendidikan S1-S3 di Makassar, demikian pula support dari ibu Marliana SE., M.SE dan bapak Syamsuddin, S.Pd., hanya Allah yang mampu membalas kebaikan mereka.

Terima kasih dan cinta yang tulus kepada suami penulis Ali Muhakim, S.Si. atas kesabaran, do'a, dukungan, bantuan, cinta, pengertian serta pengorbanan yang tak terhingga, atas diskusi-diskusi yang panjang demi terselesainya disertasi ini. Semoga Allah merahmati setiap langkah kita hingga ke jannah-Nya. Terima kasih pula penulis hanturkan kepada kakak dan adik yang penulis cintai karena Allah Ta'ala: Muhammad Risal, S.Pd., Nurdayanti A.Md.Tem., Nurhidayah, Idriani, Amalia Jefri A.Md.Kep, Muh. Syadly Al Qadry, A.Md.Tem., Nur Annisa Istiqamah, Nur Badryyah dan segenap keluarga, terima kasih atas perhatian, bantuan, dukungan, dan do'a, semoga Allah Subhanahu Wata'ala senantiasa membalasnya dengan yang lebih baik.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, yang tidak bisa penulis tuliskan namanya satu persatu, penulis haturkan *jazakumullahu khairan katsira*, semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala melimpahkan balasan kebaikan kepada semuanya.

ix

Penulis menyadari begitu banyak kesalahan dalam disertasi ini

yang merupakan kekhilafan penulis, namun kebenaran dalam disertasi ini

adalah dari Allah Subhanahu wa Ta'ala semata. Penulis mengharapkan

kepada para pembaca yang budiman dapat menyampaikan kritikan dan

saran yang sifatnya membangun demi kesempurnaan disertasi ini.

Akhir kata, semoga disertasi ini bermanfaat bagi perkembangan

ilmu pengetahuan, dicatat sebagai amal shalih dan menjadi ilmu yang

bermanfaat yang tiada putus pahalanya. Aamin ya Rabbal A'lamin.

Makassar, 8 Agustus 2021

Nur Asmi

#### ABSTRAK

**NUR ASMI**. Isolasi peptida bioaktif dari bakteri epifit yang bersimbion dengan alga cokelat *Sargassum* sp. sebagai agen antibakteri dan antikanker (dibimbing oleh: **Ahyar Ahmad, Muh. Nasrum Massi,** dan **Hasnah Natsir**).

Terapi berbasis peptida merupakan pendekatan baru yang cukup menjanjikan dalam pencarian senyawa bioaktif karena dari berbagai hasil penelitian menunjukkan senyawa-senyawa tersebut mempunyai dampak positif bagi kesehatan. Penelitian ini bermaksud mengeksplorasi dan mengidentifikasi bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp dan mengisolasi peptida bioaktif dari bakteri epifit yang dapat digunakan sebagai agen antibakteri dan antikanker. Tahapan metode penelitian meliputi isolasi dan identifikasi bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp., isolasi protein dari bakteri epifit, fraksinasi, hidrolisis protein dan ultrafiltrasi. Pada setiap tahapan dilakukan skrining aktivitas antibakteri dan antikanker. Sekuen peptida yang diperoleh dikarakterisasi dengan menggunakan LC-MS/MS. Analisis in silico dilakukan untuk memprediksi aktivitas antibakteri dan antikanker sekuen peptida yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri epifit simbion dari alga Sargassum sp (isolat strain SG-A1) teridentifikasi memiliki homologi terdekat dengan Enterobacter sp. strain E23 dengan maximum identity 99,69%. Peptida bioaktif hasil hidrolisis dari bakteri epifit strain SG-A1 ditemukan pada peptida dengan kisaran berat molekul <5 kDa. Uji aktivitas antibakteri peptida dari bakteri epifit strain SG-A1 paling aktif terhadap bakteri gram positif Staphylococcus aureus. Aktivitas antibakteri dan antikanker fragmen peptida (F4h1) memiliki aktivitas yang sedangkuat dengan diameter hambatan 13,87±0,06 mm dan nilai IC<sub>50</sub> 35,66 µg/mL. Studi in silico memberikan informasi sekuen yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antibakteri adalah sekuen F4h1g dan sekuen yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antikanker adalah sekuen F4h1c, F4h1e, dan F4h1i. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa peptida bioaktif dari bakteri epifit simbion menjanjikan untuk dikembangkan sebagai bahan obat antibakteri dan antikanker.

Kata kunci: antibakteri, antikanker, bakteri epifit, Sargassum sp., peptida

## **ABSTRACT**

**NUR ASMI**. Isolation of Bioactive Peptide from Epiphytic Bacteria Associated with Brown Algae *Sargassum* sp. as Antibacterial and Anticancer Agent. (supervised by **Ahyar Ahmad, Muh. Nasrum Massi,** and **Hasnah Natsir**).

Peptide-based therapy is a promising new approach in the search for bioactive compounds because various research shows that these compounds positively impact health. This study explores and identifies the epiphytic bacteria symbiont brown algae Sargassum sp. and isolates bioactive peptides from epiphytic bacteria that can be used as antibacterial and anticancer agents. The stages of the research method include the isolation and identification of the brown alga symbiont epiphytic bacteria Sargassum sp., isolation of protein from epiphytic bacteria, fractionation, protein hydrolysis into peptides, and ultrafiltration. At each stage, antibacterial and anticancer activity were screened. The peptide sequences were characterized using LC-MS/MS. In silico analysis was performed to predict the antibacterial and anticancer activity of the peptide sequences. The results showed that the epiphytic bacteria from the algae Sargassum sp. (isolate strain SG-A1) was identified as having the closest homology to Enterobacter sp. strain E23 with a maximum identity of 99,69%. Hydrolyzed bioactive peptides from epiphytic bacteria strain SG-A1 were found in peptides with a molecular weight range of < 5 kDa. The peptide antibacterial activity test of the epiphytic bacteria strain SG-A1 was the most active against gram-positive Staphylococcus aureus. The antibacterial and anticancer activity of the peptide fragment (F4h1) has medium activity with a diameter of 13.87±0.06 mm and an IC50 value of 35,66 µg/mL. The in silico study provides information that the sequences responsible for antibacterial activity are the F4h1g sequence and the sequences responsible for the anticancer activity are the F4h1c, F4h1e, and F4h1i. This study indicates that bioactive peptides from symbiont epiphytic bacteria are promising to be developed as antibacterial and anticancer drugs.

**Keywords**: antibacterial, anticancer, epiphytic bacteria, *Sargassum* sp., peptide

# **DAFTAR ISI**

			halaman
PRAKA	ATA		v
ABSTR	RAK		x
ABSTR	RAC	Т	xi
DAFTA	R T	ABEL	xv
DAFTA	R G	SAMBAR	xvii
DAFTA	R L	AMPIRAN	xix
DAFTA	R A	RTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xxii
BAB I.	PE	NDAHULUAN	1
	A.	Latar Belakang	1
	B.	Rumusan Masalah	7
	C.	Tujuan Penelitian	7
	D.	Manfaat Penelitian	8
BAB II.	TIN	NJAUAN PUSTAKA	9
	A.	Tinjauan Umum Alga Laut	9
	B.	Asosiasi Alga dengan Bakteri	10
	C.	Hidrolisis Protein	12
	D.	Peptida Bioaktif	16
	E.	Identifikasi Senyawa Peptida	22
	F.	Analisis In Silico	25
	G.	Mekanisme Kerja Peptida Antibakteri dan Peptida	26

	H.	Ker	angka Pikir	33
	I.	Hip	otesis	35
BAB III.	ME	TOE	DE PENELITIAN	37
	A.	Wa	ktu dan Tempat	37
	B.	Alat	t dan Bahan	37
	C.	Pro	sedur Penelitian	39
		1.	Pengambilan sampel	39
		2.	Preparasi sampel	39
		3.	Karakterisasi bakteri simbion	40
		4.	Identifikasi spesies bakteri secara molekuler	43
		5.	Penentuan waktu produksi optimum protein	46
		6.	Isolasi protein	47
		7.	Fraksinasi	47
		8.	Dialisis	48
		9.	Penentuan kadar protein	48
		10.	Hidrolisis protein	49
		11.	Penentuan derajat hidrolisis	50
		12.	Ultrafiltrasi	50
		13.	Sekuensing peptida	50
		14.	Uji antibakteri	51
		15.	Uji toksisitas BSLT	52
		16.	Uji antiproliferasi	53
		17	Analisis In Silico	57

BAB IV.HA	SIL DAN PEMBAHASAN	58
A.	Isolasi Bakteri Epifit dari Alga Cokelat Sargassum sp	58
B.	Kurva pertumbuhan bakteri epifit isolat strain SG-A1	58
C.	Isolasi peptida dari hidrolisat protein bakteri epifit isolat SG-A1	65
D.	Uji Aktivitas Antibakteri dan Toksisitas	70
E.	Uji Sitotoksisitas dan Antiproliferasi	76
F.	Analisis LC-MS/MS	82
G.	Analisis In Silico	84
Н.	Target interaksi peptida	104
BAB V. KE	SIMPULAN DAN SARAN	108
A.	Kesimpulan	. 108
B.	Saran	109
DAFTAR P	USTAKA	109
LAMPIRAN	I-LAMPIRAN	127

## **DAFTAR TABEL**

Noi	mor halam	an
1.	Bakteri simbion alga cokelat ( <i>Phaeophyceae</i> )	11
2.	Spesifisitas enzim proteolitik	13
3.	Kondisi optimum enzim protease	14
4.	Residu-residu asam amino penyusun peptida	18
5.	Peptida dari organisme laut	20
6.	Peptida yang beredar di pasaran	21
7.	Mekanisme kerja antibakteri dan antikanker peptida bioaktif	32
8.	Kategori diameter hambatan bakteri	52
9.	Klasifikasi nilai toksisitas LC <sub>50</sub>	53
10.	Klasifikasi nilai sitotoksisitas IC <sub>50</sub>	56
11.	Hasil uji biokimia isolat bakteri epifit simbion alga Sargassum sp.	59
12.	Kadar protein fraksi protein, hidrolisat protein dan peptida dari bakteri epifit isolat strain SG-A1	67
13.	Aktivitas antibakteri dan toksisitas fraksi protein, hidrolisat protein dan peptida dari bakteri epifit isolat strain SG-A1	72
14.	Indeks selektivitas ekstrak kasar, fraksi protein, hidrolisat, dan fragmen peptida	80
15.	Prediksi aktivitas antibakteri dan antikanker peptida dari bakteri epifit yang bersimbion dengan alga cokelat <i>Sargassum</i> sp	86
16.	Nilai amfipatik, muatan kationik, dan indeks alifatik sekuen peptida	90
17.	Perbandingan sekuens asam amino peptida dari bakteri epifit isolat SGA1	93

18.	Interaksi peptida dengan ATPase sebagai target protein	98
19.	Interaksi peptida dengan caspase-8 sebagai target protein	103

## **DAFTAR GAMBAR**

No	mor halam	an
1.	Struktur umum asam amino (a) dan Asam amino lisin beserta penomoran atom karbonnya (b).	16
2.	Ilustrasi skematis mekanisme membranolitik peptida antibakteri dan antikanker. Model Barrel-Stave (A), Model Toroidal (B) dan Model Karpet (C) (Sumber: Camilio, 2014)	27
3.	Ilustrasi skematis mekanisme non-membranolitik peptida antibakteri dan antikanker (Sumber: Wang et al. 2017)	29
4.	Kerangka pikir	34
5.	Isolat bakteri epifit simbion alga cokelat <i>Sargassum</i> sp. Isolat strain SG-A1 (a) dan isolate SG-A2 (b)	58
6.	Hasil Elektroforesis Produk PCR	60
7.	Pohon filogenetik bakteri isolat strain SG-A1 (a) dan isolat SG-A2 (b). Pohon filogenetik ini direkonstruksi menggunakan metode Neighbor-Joining	61
8.	Kurva pertumbuhan bakteri epifit isolat strain SG-A1	64
9.	Hasil skrining toksisitas terhadap protein ekstrak kasar hasil kultivasi	65
10.	Persentase Derajat Hidrolisis (DH) hidrolisat protein bakteri epifit isolat strain SG-A1	68
11.	Garis tren aktivitas antibakteri hidrolisat protein terhadap bakteri S. aureus dan E. coli	74
12.	Garis tren toksisitas fraksi protein dan hidrolisat protein terhadap Artemia salina	75
13	Garis tren toksisitas fragmen pentida terhadan Artemia salina	75

14.	Efek sitotoksik ekstrak kasar, fraksi protein dan fraksi hidrolisat protein dari bakteri epifit isolat strain SG-A1 terhadap viabilitas sel kanker paru LK-2 dan sel fibroblas M5S. Setiap nilai adalah ratarata ± SD dari tiga percobaan independen.	78
15.	Efek sitotoksik fragmen peptida dari bakteri epifit isolat strain SG-A1 terhadap viabilitas sel kanker paru LK-2 dan sel fibroblas M5S. Setiap nilai adalah rata-rata ± SD dari tiga percobaan independen.	78
16.	Uji proliferasi sel. Pengaruh viabilitas sel pada ekstrak kasar, fraksi protein, fraksi hidrolisat protein, dan fragmen peptida terhadap sel LK-2 (a) dan sel M5S (b) setelah perlakuan dengan konsentrasi sampel yang berbeda pada waktu inkubasi 0, 6, 12, dan 16 jam. Setiap nilai mewakili rata-rata dari tiga eksperimen independen.	81
17.	Kromatogram Liquid Chromatography (LC) peptida F4h1	82
18.	Spektrum Mass Spectrometry MS peptida F4h1	83
19.	Persentase komposisi asam amino yang berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri peptida dari bakteri epifit yang bersimbion dengan alga cokelat <i>Sargassum</i> sp	87
20.	Persentase komposisi asam amino yang berpengaruh terhadap aktivitas antikanker peptida dari bakteri epifit yang bersimbion dengan alga cokelat <i>Sargassum</i> sp.	87
21.	Prediksi struktur sekunder peptida antibakteri dan antikanker menggunakan software PEP-FOLD3.	90
22.	Struktur ATPase (Sumber: https://www.chegg.com/)	96
23.	<ul> <li>a. Interaksi antara peptida terhadap ATPase Staphylococcus aureus, biru adalah ATPase Staphylococcus aureus protein, kuning menunjukkan peptide;</li> <li>b. Interaksi hidropobisitas;</li> <li>c. Interaksi ikatan hidrogen.</li> </ul>	97
24.	Interaksi antara bioaktif peptida terhadap protein caspase-8, struktur 3D kompleks peptida dengan protein caspase-8. Merah muda adalah protein caspase-8, kuning adalah peptida bioaktif	100

## **DAFTAR LAMPIRAN**

N	lomor	halaman
1	. Skema kerja pengambilan sampel	127
2	. Skema kerja preprasi sampel	127
3	. Skema kerja isolasi bakteri epifit simbion alga cokelat	128
4	. Skema kerja purifikasi bakteri	129
5	. Skema kerja uji morfologi bakteri	130
6	. Skema kerja uji SCA (Simon Citrat Agar)	130
7	. Skema kerja uji katalase	131
8	. Skema kerja uji TSIA (Triple Sugar Ion Agar)	131
9	. Skema kerja uji gelatinase	132
1	0. Skema kerja uji motilitas	132
1	1. Skema kerja uji MR-VP (Metil Red- Voge Prosauer)	133
1	2. Skema kerja uji fermentasi karbohidrat	133
1	3. Skema kerja penentuan waktu produksi optimum protein	133
1	4. Skema kerja isolasi protein	134
1	5. Skema kerja fraksinasi protein dengan ammonium sulfat	135
1	6. Penambahan ammonium sulfat fraksionasi protein	136
1	7. Skema kerja dialisis protein	137
1	8. Skema kerja penentuan kadar protein	138
1	9. Skema kerja hidrolisis protein dengan enzim pepsin	138
2	0. Skema kerja ultrafiltrasi hidrolisat protein	139
2	Skema keria uii toksisitas BSLT	139

22.	Uji antiproliferasi140
23.	Pembuatan larutan buffer Tris-HCI141
24.	Lokasi pengambilan sampel alga cokelat <i>Sargassum sp.</i> di Pulau Lae-lae, Makassar, Sulawesi Selatan143
25.	Sekuen 16S rRNA bakteri epifit strain SG-A1 dan SG-A2, hasil BLAST dan rekontruksi Pohon Filogenik144
26.	Perhitungan kadar/ konsentrasi protein, hidrolisat protein dan peptida149
27.	Perhitungan derajat hidrolisis protein dari bakteri epifit isolat strain SG-A1153
28.	Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi protein, hidrolisat protein dan fragmen peptidadari bakteri epifit isolat strain SG-A1 terhadap bakteri <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>
29.	Perhitungan LC <sub>50</sub> hasil kultivasi isolat strain SG-A1156
30.	Perhitungan LC <sub>50</sub> ekstrak kasar dan fraksi protein isolat strain
	SG-A1158
31.	Perhitungan LC <sub>50</sub> hidrolisat protein isolat strain SG-A1160
32.	Perhitungan LC <sub>50</sub> fragmen peptida isolat strain SG-A1162
33.	Hasil perhitungan IC <sub>50</sub> ekstrak kasar, fraksi protein potensial, fraksi hidrolisat potensial, dan fragmen peptida terhadap sel kanker LK2
34.	Hasil perhitungan IC <sub>50</sub> ekstrak kasar, fraksi protein potensial, fraksi hidrolisat potensial, dan fragmen peptida terhadap sel normal fibroblast M5S
35.	Proliferasi sel fragmen peptida, ekstrak kasar, fraksi protein dan hidrolisat protein potensial terhadap sel kanker LK2 pada berbagai variasi waktu yang berbeda
36.	Proliferasi sel fragmen peptida, ekstrak kasar, fraksi protein dan hidrolisat protein potensial terhadap sel normal fibroblast M5S pada berbagai variasi waktu yang berbeda169

37.	pengujian sitotoksikpengujian sitotoksik	.170
38.	Hasil identifikasi peptida ≤ 5 kDa dari isolat strain SG-A1 dengan program MASCOT	.176
39.	Struktur kimia peptida ≤ 5 kDA Dari isolat strain SG-A1	.177
40.	Interaksi ikatan peptida dengan ATPase	.181
41.	Interaksi ikatan peptida dengan caspase-8	.189
42.	Daftar nama perangkat lunak yang digunakan untuk analisis bioinformatik	.207

## **DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN**

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan		
ACPs	Anticancer Peptides		
AMPs	Antimicrobial Peptides		
ATP	Adenosine triphosphate		
APS	Ammonium Persulfate		
Bcl-2	B-cell lymphoma-2		
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large		
BLAST	Basic Local Alligment Search Tool		
BSA	Bovine Serum Albumin		
BSLT	Brine Shrimp Lethality Test		
CD31	Cluster of Differentiation 31		
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid		
DH	Derajat Hidrolisis		
DMSO	Dimetil Sulfoksida		
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetat		
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay		
ESI	Electrospray Ionisation		
IC	Inhibition Consentration		
Da	Dalton		
Lc	Lethal Consentration		
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry		

LK-2 The human lung cancer cell lines

MALDI Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

MR-VP Methyl Red-Voges Proskauer

MS Mass Spectroscopy

MTT Mikrotetrazolium

MWCO Molecular weight cut-off

NA Nutrient Agar

NB Nutrient Broth

NCBI National Center for Biotechnology Information

OD Optical Density

OPA Ortho-phthalaldehyde

ROS Reactive Oxygen Species

rRNA ribosome-Ribonucleic Acid

RT-PCR Reverse Transcription Polymerase

Chain Reaction

rpm rotate per minute

SDS PAGE Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide

Gel Electrophoresis

TEMED Tetra Metilen Diamin

TBE Tris/Borat/EDTA

TCA Trichloroacetic Acid

TNF R1 Tumor necrosis factor receptor 1

TNBS 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid

TOF Time of Flight

TSIA Triple Sugar Iron Agar

PBS Phosphate buffered saline

PMF Protein/Peptides Mass Fingerprint

VEGF-A Vascular endothelial growth factor A

### **BABI**

## **PENDAHULUAN**

## A. Latar Belakang

Penyakit degeneratif seperti penyakit infeksi dan kanker adalah beban ganda dunia kesehatan. Penyakit infeksi menjadi penyebab kematian yang relatif tinggi. Penyakit infeksi dapat menyebabkan kematian sekitar 3,5 juta orang setiap tahunnya (WHO, 2019). Selain penyakit infeksi, penyakit kanker juga menjadi salah satu penyakit penyebab kematian utama pada manusia (Wang and Zhang, 2013). Studi deskriptif terbaru melaporkan bahwa peningkatan penyakit kanker terjadi dari tahun ke tahun. Hal ini merujuk pada data angka kematian akibat penyakit kanker. Pada tahun 2018, angka kematian akibat penyakit kanker berada pada kisaran 9,6 juta dan diprediksi akan meningkat 7 kali lipat pada tahun 2030 (WHO, 2019). Prevalensi penyakit kanker di Indonesia juga cukup tinggi. Menurut data Kemenkes RI 2019, prevalensi kanker di Indonesia meningkat dari 1.4 per 1000 penduduk di tahun 2013 menjadi 1,79 per 1000 penduduk pada tahun 2018.

Pengobatan penyakit infeksi dan kanker terus mengalami pengembangan. Pengobatan penyakit infeksi dapat ditangani dengan antibiotik. Namun, mekanisme resistensi antibiotik terus mengalami peningkatan kasus secara global (WHO, 2020). Demikian pula dengan terapi antikanker dalam dekade terakhir telah mengalami kemajuan yang

signifikan dalam diagnosis, pengobatan dan pencegahan beberapa jenis kanker yang melibatkan: pembedahan, kemoterapi, radiasi, terapi biologis dan hormonal (Biemar and Foti, 2013). Namun, masalah utama dengan perawatan ini adalah timbulnya efek samping yang merugikan (Mahassni and Al-Reemi, 2012; Deslouches and Di, 2017). Oleh karena itu, penemuan bahan bioaktif baru dibutuhkan dalam upaya menangani permasalahan tersebut.

Salah satu bahan alam yang paling melimpah dan potensial mengasilkan senyawa bioaktif yaitu alga (Ahmad *et al.*, 2014). Salah satu jenis alga adalah alga cokelat yang telah dilaporkan memiliki kandungan nutrisi yang bervariasi (Harnedy and FitzGerald, 2011; Ortiz *et al.*, 2006). Berdasarkan kajian literatur, pemanfaatan *Sargassum* sp. yang paling banyak adalah pada pemanfaatan kandungan fucoidannya, sedangkan penelitian yang memanfaatkan kandungan protein/peptida dari alga *Sargassum* sp. masih sedikit, padahal protein memiliki aktivitas biologis yang dapat dijadikan sebagai sumber bahan obat alami seperti antibakteri maupun antikanker (Zheng *et al.*, 2010; Saadaoui *et al.*, 2020).

Beberapa literatur memperlihatkan potensi *Sargassum* sp. sebagai agen antibakteri dan antikanker. Arifuddin dkk (2001), melaporkan bahwa fraksi protein 40-60 % dari alga cokelat *Sargassum echinocarpum* J.G Agardh efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambat >14 mm yang termasuk dalam kategori kuat. Senyawa bioaktif dari alga cokelat *Sargassum* sp. juga memiliki aktivitas antikanker yang tinggi melawan beberapa jenis

kanker, termasuk kanker paru melalui penargetan molekul pada mekanisme apoptosis. Senyawa bioaktif alga memicu apoptosis melalui beberapa jalur. Penelitian baru-baru ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari *Sargassum fusiforme* menurunkan ekspresi CD31, VEGF-A dan kepadatan pembuluh mikro tumor. Selain itu, senyawa bioaktif dari *Sargassum fusiforme* menghambat ekspresi VEGF-A dalam sel tumor dan reseptornya VEGFR2 dalam sel endotel vena umbilikalis manusia (Chen et al., 2017). Oleh karena itu, *Sargassum fusiforme* dianggap sebagai obat antikanker paru alternatif.

Alga umumnya hidup di alam bersama dengan komunitas bakteri dan dapat mempertahankan hubungan simbiosis. Alga kaya dengan bakteri epifit. Bakteri epifit merupakan bakteri yang hidup di permukaan alga (Chakraborty et al., 2017). Bakteri laut sering menghasilkan zat antikanker dan antibakteri sebagai sarana untuk menjaga hubungan antara lingkungan mikro epifit, menghambat organisme pesaing dan patogen mikroba (Egan et al., 2013). Bakteri sering ditemukan di permukaan banyak spesies alga laut yang dikumpulkan dari habitat alami. Strain bakteri ini dapat diambil dari laut bersama dengan sel alga atau ditemukan sebagai akibat kontaminasi dalam kultur alga (Jasti et al., 2005). Populasi bakteri yang diamati pada tanaman industri dan agregasi alga laut alami menunjukkan bahwa mereka menggunakan zat organik yang disekresikan oleh sel alga baik hidup atau mati. Namun demikian telah dilaporkan bahwa banyak alga menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dengan adanya bakteri daripada tanpa kehadiran bakteri

tersebut (Villarreal-Gómez *et al.,* 2010). Beberapa bakteri laut telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba, khususnya bakteri yang bersimbion dengan organisme lain. Bakteri tersebut memiliki kemampuan yang hampir sama dengan inangnya untuk menghasilkan senyawa bioaktif (Nofiani, 2008), salah satunya pada alga.

Bakteri simbion merupakan salah satu target yang menjanjikan untuk studi penelitian di masa depan (Ryan *et al.*, 2008). Meskipun ada banyak bakteri yang terkait dengan alga, struktur dan bioaktivitas senyawa yang dihasilkannya hanya sedikit yang diketahui. Penggunaan bakteri simbion juga dapat menjadi salah satu solusi agar tidak terjadi eksploitasi secara berlebihan pada pemanfaatan alga.

Villarreal-Gómez *et al* (2010), melaporkan adanya bakteri simbion yang diisolasi pada permukaan alga cokelat *Sargassum muticum*. Isolat bakteri strain sm36 menunjukkan aktivitas antikanker dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 5,531µg/mL. Beberapa Penelitian tentang bakteri penghasil senyawa bioaktif lainnya, seperti: *Bacillus sp.* dari *Sargassum thunbergi* sebagai antimikroba telah dilaporkan (Zheng *et al.*, 2005). Sejauh ini belum banyak data penelitian yang mengeksplorasi kelompok senyawa protein/peptida dari bakteri simbion alga laut sebagai bahan baku obat antibakteri dan/atau antikanker.

Terapi berbasis peptida dari bahan alam merupakan pendekatan baru dan menjanjikan untuk pengembangan agen antibakteri dan antikanker dengan mengurangi atau tanpa efek samping. Hal ini mencerminkan potensi peptida sebagai agen terapi (Thundimadathil,

2012; Cicero *et al.*, 2017). Hingga saat ini ada sekitar 60 jenis peptida yang telah disetujui beredar dipasaran (Thundimadathil, 2012) dan sejumlah besar dari peptida bioaktif sudah dalam fase klinis dan praklinis (Cheung *et al.*, 2015).

Peptida bioaktif menjadi senyawa yang lebih diperhatikan karena hasil penelitian menunjukkan senyawa-senyawa tersebut mempunyai dampak positif bagi kesehatan. Peptida bioaktif telah diketahui dapat terlibat dalam berbagai fungsi biologis, termasuk sebagai atibakteri dan antikanker (Fan et al., 2014). Peptida bioaktif berpotensi menjadi agen antibakteri dan antikanker karena mampu melawan berbagai patogen seperti bakteri, jamur dan virus (Felicio et al., 2017), ukurannya kecil dan memiliki kemampuan untuk menembus membran sel, serta mudah disintesis dan dimodifikasi (Thundimadathil, 2012; Ali et al., 2013). Peptida bioaktif juga memiliki aktivitas, spesifisitas dan selektivitas yang tinggi terhadap sel kanker (Tyagi et al., 2013; Ali et al., 2013), interaksi obat-obat minimal dan tidak menumpuk di organ tertentu (misalnya ginjal atau hati) yang dapat membantu meminimalkan efek samping toksik senyawa obat tersebut (Ali et al., 2013).

Sumber peptida bioaktif dapat diperoleh dari bahan alam melalui hidrolisis protein. Cara yang paling umum adalah melalui hidrolisis enzimatik dari seluruh molekul protein menggunakan enzim proteolitik, seperti enzim pepsin (Wang and Zhang, 2016). Enzim pepsin bertindak sebagai enzim endopeptidase yang bekerja pada substrat sepanjang situs

pusat aktif dari kerangka endopeptidase dan dibelah pada bagian tengah, sehingga dapat menghasilkan fragmen-fragmen peptida. Pola sekuen asam amino dalam fragmen peptida yang dihasilkan diperkirakan terkait dengan mekanisme fungsional pada peptida bioaktif tersebut.

Metode *in silico* (*molecular docking*) merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk memprediksi, menegakkan hipotesis yang terkait mekanisme fungsional peptida (Thenawidjaja dkk., 2017), yang pada akhirnya menghasilkan penemuan dan pengembangan peptida yang dihasilkan sebagai agen antibakteri dan antikanker baru. Prediksi bioaktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan target protein ATPase subunit c dari bakteri *Staphylococcus aureus* dan prediksi bioaktivitas antikanker menggunakan target protein protein caspase-8.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti akan mengembangkan senyawa antibakteri dan antikanker dengan target yang spesifik. Oleh karena itu, peneliti menganggap perlu untuk melakukan eksplorasi terhadap protein/peptida bioaktif dari bakteri epifit simbion alga cokelat *Sargassum* sp. dengan harapan hasil penelitian ini dapat menjadi rujukan dalam pengembangan senyawa protein/ peptida yang berpotensi sebagai antibakteri dan/atau antikanker.

#### B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- apakah bakteri epifit terpilih yang diisolasi dari alga cokelat Sargassum sp. dapat teridentifikasi spesiesnya?
- 2. apakah peptida yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antikanker dapat diproduksi dari bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. menggunakan enzim pepsin ?
- 3. bagaimana aktivitas antibakteri dan antikanker peptida yang dihasilkan dari bakteri epifit simbion alga cokelat *Sargassum* sp.?
- 4. apakah peptida bioaktif yang dihasilkan berpotensi sebagai antibakteri dan antikanker melalui pendekatan *in silico* ?

## C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah maka tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- mengidentifikasi bakteri epifit yang diisolasi dari alga cokelat Sargassum sp.
- memproduksi peptida yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antikanker dari bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. menggunakan enzim pepsin.
- menguji aktivitas antibakteri dan antikanker peptida yang dihasilkan dari bakteri epifit alga cokelat Sargassum sp.

4. memprediksi aktivitas antibakteri dan antikanker peptida bioaktif yang dihasilkan dari bakteri epifit simbion alga cokelat *Sargassum* sp. melalui pendekatan *in silico*.

## D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

- memberikan informasi tentang spesies bakteri epifit yang diisolasi dari alga cokelat Sargassum sp.
- memperoleh senyawa peptida yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan/atau antikanker dari bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp.
- memberikan informasi hasil analisis in silico tentang sekuen peptida yang aktif sebagai antibakteri dan antikanker.
- dapat menjadi rujukan dalam pengembangan senyawa protein dan peptida yang berpotensi sebagai antibakteri dan antikanker.

## **BAB II**

## TINJAUAN PUSTAKA

## A. Tinjauan Umum Alga Laut

Organisme laut menunjukkan kandungan kimia yang beragam dan memiliki fitur struktural unik dibandingkan dengan metabolit terestrial. Diantara sumber daya laut, alga laut adalah sumber daya yang kaya akan senyawa kimia yang beragam (Eom *et al.*, 2012). Secara taksonomi, alga berdasarkan kandungan pigmennya dikelompokkan menjadi 3 kelas yaitu *Rhodophyceae* (alga merah), *Phaeophyceae* (alga cokelat) dan *Chlorophyceae* (alga hijau) (Vijayan, *et al.*, 2016).

Alga mengandung senyawa protein, peptida dan asam amino yang menunjukkan komponen bioaktif baru. Bahan baku ini masih merupakan reservoir yang relatif belum dimanfaatkan, memiliki potensi untuk berperan sebagai sumber untuk menghasilkan peptida bioaktif yang berpotensi untuk menjaga kesehatan dan pencegahan penyakit (Harnedy and FitzGerad, 2011).

Kandungan protein alga bervariasi secara signifikan antar spesies, yaitu sekitar 3%-47% (w/w). Alga cokelat mengandung 5%-15% protein dari berat kering. Alga cokelat telah dilaporkan mengandung jenis asam amino yang lebih tinggi daripada alga merah dan hijau 8%-44% (b/b) pada *Fucus* sp., *Sargassum* sp., *Laminaria digitata*, dan *Ascophyllum* 

nodosum. Meskipun kandungan protein pada alga cokelat lebih rendah dibandingkan aga merah dan alga hijau (Harnedy and FitzGerad, 2011).

## B. Asosiasi Alga dengan Bakteri

Permukaan alga kaya akan bakteri simbion. Asosiasi antara alga dan bakteri telah dijelaskan selama lebih dari seratus tahun (Hollants *et al.*, 2012). Penelitian dalam 40 tahun terakhir tentang interaksi bakteri makroalga telah ditemukan 107 penelitian yang terkait dengan kurang lebih 148 makroalga yang bersimbion dengan bakteri (36 *Chlorophyta*, 46 *Phaeophyceae*, 55 *Rhodophyta*, 12 alga yang belum ditentukan spesiesnya (Goecke *et al.*, 2010).

Peningkatan teknik mikrobiologi dalam beberapa dekade terakhir, telah secara signifikan membantu membangun afiliasi filogenetik komunitas bakteri epifit dan endofit yang terkait dengan makroalga. Namun ada bukti yang tidak cukup di mana hubungan fungsional interaksi makroalga-bakteri dapat dibangun dan dipahami dengan benar (de Mesquita et al., 2018). Studi masa depan harus mengintegasikan aspek beragam pada bidang biologis. Banyak eukariota berhubungan erat dengan bakteri yang memungkinkan makroalga untuk memperluas kemampuan fisiologisnya. Meskipun telah ditunjukkan bahwa interaksi yang dimediasi secara kimiawi ini didasarkan pada pertukaran nutrisi, mineral dan metabolit sekunder, keragaman dan spesifisitas hubungan bakteri makroalga belum diselidiki secara menyeluruh (Hollants et al., 2012; Goecke et al., 2010).

Isolat bakteri simbion pada makroalga yang memiliki aktivitas cukup melimpah. Keberadaan bakteri tersebut diduga sebagai akibat dari bentuk simbion mutualisme. Makroalga menyediakan tempat dan nutrisi yang dibutuhkan bakteri, sedangkan bakteri mendorong pertumbuhan dan melindungi permukaan makroalga terhadap patogen (Hollants *et al.*, 2012; Goecke *et al.*, 2010). Bakteri yang hidup berikatan dengan partikel tertentu menghasilkan metabolit bioaktif 5-10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas (Long and Azam, 2001).

Bakteri laut epifit terkait erat dengan alga cokelat (*Phaeophyceae*). Pada periode tahun 2010 sampai dari tahun 2018, terdapat 35 artikel yang melaporkan keberadaan bakteri pada 46 spesies alga cokelat (de Mesquita et al., 2018). Beberapa bakteri yang berasosiasi dengan alga cokelat dan menghasilkan senyawa bioaktif disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Bakteri simbion alga cokelat (*Phaeophyceae*)

Alga Cokelat	Bakteri Simbion	Aktivitas Biologis	Referensi
Sargassum thunbergi	Bacillus sp.	Antimikroba	Zheng <i>et al.,</i> 2005
Sargassum muticum	Bacillus sp.	Antikanker	Villarreal-Gómez et al., 2010
Sargassum sp.	Pseudomonas koreensis	Antioksidan	Pawar et al., 2015
Padina pavonica	Pseudomonas sp.	Antimikroba	Ismail <i>et al</i> ., 2016
Padina pavonica	Bacillus pumilus	Antimikroba	Ismail <i>et al.,</i> 2016
Turbinaria ornata	E. profundum	Antimikroba	Karthick and Mohanraju, 2018

#### C. Hidrolisis Protein

Hidrolisis protein adalah proses pemecahan atau pemutusan ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana (Nielsen, 1997). Ada tiga cara yang dapat ditempuh untuk menghidrolisis protein, yaitu hidrolisis menggunakan asam, basa dan enzim.

Hidrolisis dengan larutan asam yaitu dengan mempergunakan asam kuat anorganik, seperti HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan dipanaskan hingga mendidih, dengan tekanan > 1 atm. Efek samping yang terjadi dengan hidrolisis asam ialah rusaknya beberapa asam amino (triptofan, sebagian serin dan treonin). Hidrolisis protein menggunakan basa merupakan proses pemecahan polipeptida dengan menggunakan basa kuat, seperti NaOH dan KOH pada suhu tinggi, selama beberapa jam, dengan tekanan > 1 atm. Hidrolisis dengan enzim dilakukan dengan mempergunakan enzim protease, dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda (Sediaoetama, 2008).

Pemilihan metode enzimatis menggunakan protease lebih disukai karena prosesnya lebih mudah dikontrol dibanding secara kimiawi, serta enzim protease dapat memutus ikatan peptida secara spesifik pada residu asam amino tertentu, tidak mengakibatkan kerusakan asam amino, tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah, peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, (Winarno, 2010). Beberapa enzim protease yang dapat digunakan pada

produksi hidrolisat protein antara lain tripsin, pepsin dan kimotripsin (Wang and Zhang, 2013).

Tabel 2. Spesifisitas enzim proteolitik

Enzim	Reaksi Hidrolisis
Pepsin	Rantai samping hidrofobik, residu aromatik lebih
	disukai.
Tripsin	N-terminal Arg dan Lys pada posisi P1.
Kimotripsin	N-terminal Tyr, Trp, Phe, Leu pada posisi P1
Papain	asam amino yang mengandung rantai samping
	hidrofobik besar pada posisi P2.
Termolisin	C-Terminal Leu dan Phe pada posisi P1.

Ikatan antara enzim dengan peptida memiliki spesifitas yang tinggi, yang bekerja seperti gembok dan kunci. Situs aktif enzim memiliki pengaturan karakteristik residu asam amino yang menentukan interaksi enzim-substrat. Spesifisitas enzim proteolitik menentukan posisi di mana enzim akan mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida. Spesifisitas enzim proteolitik disajikan pada Tabel 2. Perbedaan dalam spesifisitas antara protease ini sangat penting untuk dipertimbangkan sebagai panduan untuk pemilihan protease sesuai dengan sumber protein yang akan dihidrolisis atau diprediksi produknya. Rantai protein yang sama dapat menghasilkan hidrolisat yang sangat berbeda menggunakan protease berbeda (Tavano, 2013).

Spesifisitas pada substrat kadang-kadang sangat kompleks dan tidak dapat didefinisikan dengan jelas. Namun berdasarkan interaksinya dengan substrat, protease dapat bertindak sebagai eksopeptidase atau

endopeptidase, yang merupakan dua subkelas utama dari enzim protease. Endopeptidase bekerja pada substrat sepanjang situs pusat aktif dari kerangka endopeptidase dan dibelah pada bagian tengah molekul. Di sisi lain, eksopeptidase bertindak di dekat ujung rantai polipeptida. Lebih lanjut, eksopeptidase disebut aminopeptidase jika bekerja pada rantai N-terminal dan karboksipeptidase bekerja pada ikatan peptida dari rantai C-terminal.

Tabel 3. Kondisi optimum enzim protease

Enzim	Rasio E:S	Suhu (°C)	рН	Waktu Reaksi (Jam)	Referensi
Pepsin	6:100	37	2	2	Wang and Zhang, 2016
Tripsin	3:100	37	8	3	Wang and Zhang, 2016
Kimotripsin	5:100	37	8	3	Wang and Zhang, 2016
Papain	4:100	55	6,5	8	Wang and Zhang, 2015
Alkalase	5:100	50	8,5	8	Zhang and Zhang, 2013
Termolisin	1:100	70	7,0	3	Furuta <i>et al.,</i> 2016

Manfaat yang efektif dari protein pada manusia dan hewan baru dapat dirasakan setelah protein mengalami hidrolisis, sehingga daya bioavailabilitasnya dapat ditingkatkan (Zhang and Zhang, 2013). Enzim memecah molekul ketika terjadi tabrakan antara molekul dengan enzim. Adanya peningkatan suhu pada reaksi enzimatik akan mendapatkan lebih banyak energi yang meningkatkan kecepatan gerakan partikel dan menghasilkan tumbukan molekul per detik. Tumbukan ini menyebabkan dekomposisi zat lebih cepat. Akan tetapi, suhu yang sangat rendah atau sangat tinggi akan menonaktifkan enzim dan dapat menurunkan atau menghentikan reaksi enzimatik (Zhang and Zhang, 2013).

Kondisi optimum beberapa enzim (suhu, pH, dan rasio perbandingan substrat dengan enzim) yang perlu diperhatikan dalam melakukan reaksi hidrolisis enzimatik. Kondisi optimum beberapa enzim proteolitik dapat dilihat pada Tabel 3.

Derajat hidrolisis (DH) merupakan perkiraan jumlah total ikatan peptida yang rusak, dapat dihitung setelah reaksi enzimatis dengan menggunakan beberapa metode kolorimetri dan memanfaatkan pengikatan senyawa tertentu ke gugus amino bebas. Derajat hidrolisis (DH) digunakan untuk memonitoring kemampuan pepsin dalam memecah ikatan peptida pada protein. Selama proses hidrolisis, terjadi penguraian ikatan peptida oleh enzim. Persentase ikatan peptida yang telah terurai akibat proses hidrolisis dinyatakan dengan derajat hidrolisis. DH dihitung sebagai rasio persen dari nilai hidrolisat terhadap keseluruhan protein. Untuk memperoleh gugus amino bebas total, seluruh protein dicerna menjadi asam amino dan digunakan untuk uji kolorimetri. Metode kolorimetri paling umum melibatkan penggunaan vang asam trinitrobenzenesulfonic (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) dan orthophthaldialdehyde (OPA) (Nielsen et al., 1997). Metode ketiga memanfaatkan kelarutan peptida dalam asam trikloroasetat (TCA). Dalam variasi yang paling umum, volume larutan hidrolisat protein berair dilarutkan dalam volume yang sama yaitu 20% TCA diikuti oleh sentrifugasi (Kim et al., 1990). Jumlah peptida dalam supernatan TCA kemudian ditentukan dan dinyatakan sebagai rasio persen dari total berat protein dalam hidrolisat (Aluko, 2018).

# D. Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif adalah zat organik yang dibentuk oleh asam amino yang bergabung melalui ikatan kovalen yang dikenal sebagai ikatan amida atau ikatan peptida (Sánchez and Vázquez, 2017). Peptida biasanya terdiri dari 2-20 residu asam amino (Fan *et al.*, 2014; Wang and Zhang, 2015; Montalvão, 2016).

Gambar 1. Struktur umum asam amino (a) dan Asam amino lisin beserta penomoran atom karbonnya (b).

Asam amino dicirikan oleh gugus karboksil (-COO-) dan amin (-NH3+) yang terikat pada suatu atom pusat (Gambar 1a). Penamaan atom karbon pada rantai samping mengikuti posisi karbon alfa  $(\alpha)$ , yaitu beta  $(\beta)$ , gamma  $(\gamma)$ , delta  $(\delta)$ , dan epsilon  $(\epsilon)$ . Penamaan rantai samping di contohkan pada asam amino lisis (Gambar 1b).

Adanya dua gugus fungsi yang dapat terionisasi membuat asam amino dapat bermuatan positif dan negatif (ion zwitter) tergantung pada tingkat keasaman (pH) di lingkungan. Sementara itu, gugus fungsi dari rantai samping (R) yang terikat menentukan asam amino bersifat polar atau nonpolar. Golongan asam amino nonpolar atau hidrofobik (hidro = air, fobik = takut) bersifat sulit larut dalam air. Sedangkan, golongan

asam amino polar atau hidrofilik (hidro = air, filik = suka) bersifat mudah larut dalam air (Thenawidjaja dkk., 2017).

Berdasarkan kelarutannya dalam air, asam amino dibagi menjadi empat golongan antara lain asam amino nonpolar (hidrofobik); polar netral (tidak bermuatan); polar asam (bermuatan negatif); dan polar basa (bermuatan positif). Struktur kimia, singkatan dan berat molekul masing-masing asam amino dapat dilihat pada Tabel 4 (Lehninger, 1995).

Peptida bioaktif dapat berasal dari produk alami maupun sintesis. Peptida bioaktif alami terdapat pada banyak spesies laut. Peptida ini memiliki potensi yang tinggi untuk dijadikan sebagai bahan baku obat karena spektrum bioaktifitasnya yang luas seperti: antimikroba, antivirus, antitumor, antioksidan, kardioprotektif (antihipertensi, antiaterosklerotik dan antikoagulan), imunomodulator, analgesik, antidiabetes, menekan nafsu makan dan aktivitas neuroprotektif (Cheung et al., 2015; Fan et al., 2014).

Komposisi dan urutan asam amino menentukan aktivitas peptida begitu dilepaskan dari protein prekursor. Proses alami dalam tubuh dimodulasi oleh interaksi urutan asam amino spesifik yang membentuk bagian dari protein (Fields *et al.*, 2009). Peptida bioaktif yang dihasilkan menunjukkan aktivitas biologis yang beragam (Montalvão, 2016). Beberapa penelitian yang telah dipublikasikan terkait aktivitas antibakteri dan antikanker suatu peptida dari organisme laut dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 4.Residu-residu asam amino penyusun peptida

Nama asam amino	Struktrur Kimia	Kode tiga huruf	Kode satu huruf	BM <sup>*</sup> (Da)		
Go	Golongan asam amino polar netral (tidak bermuatan)					
Glisin	O NH <sub>2</sub>	Gly	G	75		
Serin	O OH NH <sub>2</sub>	Ser	S	105		
Treonin	$O \longrightarrow OH$ $OH$ $OH$	Thr	Т	119		
Sistein	O SH NH <sub>2</sub>	Cys	С	121		
Tirosin	ONH <sub>2</sub> OH	Tyr	Υ	181		
Asparagin	O NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Asn	N	132		
Glutamin	$O \longrightarrow NH_2$ $O \longrightarrow NH_2$	Gln	Q	146		

Tabel 4. Lanjutan...

Nama asam amino	Struktrur Kimia	Kode 3 huruf	Kode 1 huruf	BM <sup>*</sup> (Da)
	Golongan asam amino nonpola	r (hidrofobik	()	
Alanin	$ \begin{array}{c c} CH_3 \\ NH_2 \\ CH_3 \end{array} $	Ala	Α	89
Valin	O CH <sub>3</sub>	Val	V	117
Leusin	O CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Leu	L	131
Isoleusin	CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	lle	I	131
Prolin	O H	Pro	Р	115
Fenilalanin	ONH <sub>2</sub>	Phe	F	131
Triptofan	ONH <sub>2</sub>	Trp	W	204
Metionin	$O \nearrow S \longrightarrow CH_3$	Met	М	149

Tabel 4. Lanjutan

Nama asam Struktrur Kimia		Kode 3 huruf	Kode 1 huruf	BM* (Da)		
G	Golongan asam amino polar basa (bermuatan positif)					
Lisin	NH <sub>2</sub>	Lys	К	146		
Arginin	NH <sub>2</sub>	Arg	R	174		
Histidin	O NH <sub>2</sub> N	His	Н	155		
Go	longan asam amino polar asam (Ł	permuatan n	egatif)			
Asam Aspartat	ONH <sub>2</sub> O	Asp	D	133		
Asam Glutamat	OH ONH <sub>2</sub>	Glu	E	147		

Tabel 5. Peptida dari organisme laut

Sekuen peptida	Berat Molekul (BM) (Da)	Aktivitas	Sumber
QPK	343,4	Antiapoptosis	Huang <i>et al</i> ., 2011
RQSHFANAQP	1155	Antiproliferasi sel MCF-7 dan MDA- MB-231	Xue, <i>et al</i> ., 2015
FIMGPY	726,9	Antikanker	Pan <i>et al.,</i> 2016
FWGHIWNAVKRVGA NALHGAVTGALS	2733	Antimikroba	Galinier <i>et al</i> ., 2009

Peptida bioaktif dapat diproduksi melalui reaksi enzimatik dengan cara protein diekstraksi dari alga laut atau dari bakteri simbionnya pada suhu rendah dan tekanan yang tinggi. Ekstrak protein yang diperoleh dihidrolisis dengan enzim proteolitik dalam kondisi optimum (Wang and Zhang, 2016). Fraksinasi peptida hasil hidrolisis paling banyak dilakukan dengan menggunakan metode meliputi: ultrafiltrasi dengan ukuran pori yang berbeda (3, 5, 10 dan 30 kDa), kromatogafi sekuensial (yaitu kromatogafi filtrasi gel dan kromatogafi pertukaran ion) dan kromatogafi cair fase balik. Struktur molekul peptida bioaktif dapat dicirikan dan dikarakterisasi dengan spektrometri massa seperti LC-MS dan MS-MS (Fan et al., 2014).

Tabel 6. Peptida yang beredar di pasaran

Peptida	Aplikasi	Status
Ziconotide <sup>®</sup>	Analgesik	Disetujui FDA
Brentuximab vedotin	Obat terapi kanker	Disetujui FDA
Glembatumobab vedotin	Obat terapi kanker	Studi klinis
Katsuobushi oligopeptide	Antihipertensi	Nutraseutikal
Dermochlorella®	Skin toner dan firmer	Produk kecantikan
Plitidepsin	Obat terapi kanker	Studi klinis
HTI-286	Obat terapi kanker	Studi praklinis
Khalalide F	Obat terapi kanker	Studi klinis
Elisidepsin	Obat terapi kanker	Studi klinis
Fish gelatin	Suplemen kesehatan tulang	Nutraseutikal
Gabolysat PC60®	Anxiolitik	Nutraseutikal
Seacure <sup>®</sup>	Suplemen kesehatan pencernaan	Nutraseutikal
Nutripeptin®	Pengontrol glukosa darah	Sebagai nutraseutikal Nutraseutikal

Sumber: Cheung et al., 2015

Selama bertahun-tahun peptida telah berevolusi sebagai agen terapi yang menjanjikan dalam pengobatan kanker, diabetes dan penyakit kardiovaskular dan aplikasi peptida dalam berbagai bidang terapi lainnya berkembang pesat. Saat ini ada sekitar 60 obat peptida yang disetujui beredar di pasaran dan menghasilkan penjualan tahunan lebih dari \$13 miliar (Thundimadathil, 2012). Beberapa peptida dari biota laut atau turunannya memiliki nilai komersial tinggi dan telah mencapai pasar farmasi dan nutraseutikal. Sejumlah besar dari peptida tersebut berada dalam fase klinis dan praklinis dapat dilihat pada Tabel 6.

## E. Identifikasi Senyawa Peptida

Sekuensing protein atau sekuensing peptida adalah penentuan urutan asam amino pada suatu protein atau peptida (oligopeptida maupun polipeptida). Sekuensing protein pertama kali diperkenalkan oleh Edman tahun 1950 (Seidler *et al.*, 2010) yang dikenal dengan degradasi Edman. Pada metode degradasi Edman, residu ujung-N (ujung amino) protein dipotong satu per satu dengan reaksi kimia. Setiap residu asam amino yang telah dipotong tersebut dapat diidentifikasi menggunakan kromatografi. Metode tersebut diulangi untuk setiap residu asam amino. Kelemahan metode ini adalah bahwa polipeptida yang disekuensing tidak lebih panjang dari 50–60 residu (dapat disiasati dengan memotong polipeptida mempunyai ukuran besar menjadi peptida-peptida mempunyai ukuran lebih kecil sebelum diterapkan reaksi) (Berg *et al.*, 2002).

Metode sekuensing protein yang lain menggunakan *Mass* Specrometry (MS) yang mampu mengukur massa peptida dengan tepat. Protein yang akan disekuensing dipotong-potong secara enzimatik maupun kimiawi menjadi peptida-peptida, kemudian dianalisis menggunakan MS (Albert et al., 2002). Penyempurnaan metode sekuensing dengan MS terus berkembang hingga dikemukakannya teknik MS/MS (spektrometri massa TANDEM) yang menjadi dasar dalam sekuensing peptida (Lau, 2013; Medzihradszky and Chalkley, 2013). Saat ini peptida baik hasil sintesis, hasil isolasi dari makanan dan minuman maupun yang berasal dari sampel biologi telah banyak diidentifikasi dengan menggunakan alat Liquid Chromatography MS/MS (LC-MS/MS). LC melakukan pemisahan terlebih dahulu sehingga memungkinkan pendeteksian peptida dengan massa serupa dengan resolusi yang berbeda (Lau, 2013). MS merupakan teknik analisis untuk mengukur nilai perbandingan massa dengan partikel bermuatan (m/z). Instrumen MS terdiri dari tiga bagian utama yaitu: sumber ion, penganalisis massa dan detektor (Lau, 2013).

Spektrometri massa protein mensyaratkan protein dalam larutan atau bentuk padat diubah menjadi bentuk terionisasi dalam fase gas sebelum disuntikkan dan dipercepat dalam medan listrik atau medan magnet untuk analisis. Dua metode utama untuk ionisasi protein adalah Electrospray Ionization (ESI) and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI). Dalam ESI, ion-ion dibuat dari protein dalam larutan, dan memungkinkan molekul untuk diionisasi secara utuh

untuk menjaga interaksi non-kovalen. Dalam MALDI, protein tertanam dalam matriks normal dalam bentuk padat dan ion dibuat oleh pulsa sinar laser. ESI menghasilkan lebih banyak ion bermuatan daripada MALDI, memungkinkan pengukuran protein massa tinggi dan fragmentasi yang lebih baik untuk identifikasi, sementara MALDI cepat dan kecil kemungkinannya dipengaruhi oleh kontaminan, buffer dan aditif (Chait, 2011).

Analisis massa yang dihasilkan oleh sumber ion berdasarkan massa per muatan. MALDI biasanya menggunakan penganalisis *Time of Flight* (TOF). Jenis instrumen ini lebih disukai karena jangkauan massanya yang luas. Dalam metode ini, peptida dicampur dengan asam organik dan kemudian dikeringkan pada slide logam atau keramik. Sampel kemudian diledakkan dengan laser, menyebabkan peptida dikeluarkan dari slide dalam bentuk gas terionisasi di mana setiap molekul membawa satu atau lebih muatan positif. Peptida terionisasi kemudian dipercepat dalam medan listrik menuju detektor. Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai detektor adalah ditentukan oleh massa dan muatannya. Peptida dengan massa lebih tinggi bergerak lebih lambat dan peptida dengan massa lebih rendah bergerak lebih cepat. Massa tepat ditentukan dengan analisis peptida dengan muatan tunggal. MALDI-TOF bahkan dapat digunakan untuk mengukur massa protein utuh sebesar 200.000 dalton, yang sesuai dengan polipeptida sekitar 2000 asam amino (Albert *et al.*, 2002).

Detektor mencatat muatan atau arus yang dihasilkan saat ion menyentuh permukaan sinyal dari muatan atau arus ini akan dikonversi

menjadi spektrum-spektrum massa. Massa fragmen-fragmen peptida tersebut dianalisis secara bioinformatika dengan mencocokkan dengan database protein atau peptida yang ada pada software (Wiśniewski, 2008) Selain itu dapat juga dilakukan pencarian spektrum massa melalui mesin pencarian (search engines). Data base protein atau peptida ini disebut *Protein/Peptides Mass Fingerprint* (PMF). Beberapa contoh mesin pencarian PMF antara lain MasCot, Sequest, X Tandem dan Prospector (Seidler et al., 2010), contoh Software database PMF seperti GenBank, Swiss-Prot, dbEST, bioinfor dan lain-lain.

#### F. Analisis In Silico

Pemodelan *in silico* adalah bentuk pemodelan berbasis komputer yang teknologinya diterapkan dalam proses identifikasi target obat atau penemuan obat baru. Studi *in silico* memberikan pengetahuan yang dapat mengarah pada pengembangan peptida antikanker dan antikanker baru. Saat ini, kita dapat mengatakan bahwa kita berada di era desain *in silico* karena alat bioinformatika dan dinamika molekuler (simulasi) yang memungkinkan kita memperoleh informasi tentang genom, transkriptom, dan proteomik organisme, sehingga menemukan pola dan menganalisis, pemodelan, dan simulasi molekul dalam sistem yang mirip dengan yang disajikan oleh alam (Craik *et al.*, 2013).

Analisis bioinformatika dapat meminimalkan jumlah tes yang harus dilakukan untuk menentukan suatu peptida bioaktif dengan menentukan

hubungan struktur dengan aktivitasnya, jika ingin mengetahui aktivitasnya maka diperlukan serangkaian uji yang banyak (Tu et al., 2018). Sebelum bioinformatik berkembang, penemuan protein dan peptida fungsional dilakukan melalui pengujian serta memerlukan waktu, tenaga serta biaya yang mahal; akan tetapi setelah bioinformatika berkembang, pencarian, dan penemuan protein atau peptida fungsional dapat dilakukan lebih cepat (Kusumaningtyas, 2016).

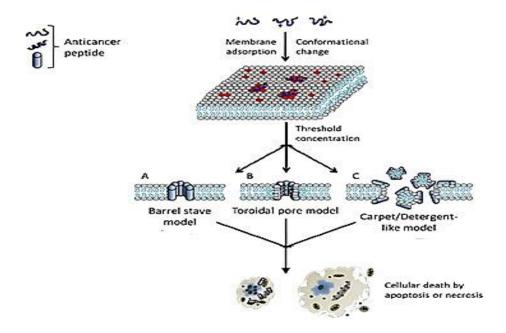
#### G. Mekanisme Kerja Peptida Antibakteri dan Peptida Antikanker

Aktivitas antimicrobial peptides (AMPs) dan anticancer peptides (ACPs) yang sering hadir bersamaan membuat mekanisme kerja dari keduanya tidak dapat dibedakan, karena parameter fisikokimia yang menjadi penentu aktivitas AMPs dan ACPs masih belum jelas (Felicio et al., 2017). Muatan positif merupakan salah satu parameter fisikokimia yang membentuk interaksi elektroistatik dengan dinding sel pelindung bakteri maupun sel kanker yang bermuatan negatif. Hal inilah yang diduga memfasilitasi ikatan awal antara peptida terhadap membran sel (sel bakteri ataupun sel kanker).

Dinding sel kanker maupun sel bakteri (gram negatif dan gram positif) diketahui bermuatan negatif. Muatan negatif bakteri gram negatif diperoleh dari membran luar bakteri ini yang terdiri atas fosfolipid dan lipopolisakarida. Sedangkan, pada bakteri gram positif lapisan peptidoglikan yang sangat tebal dengan polisakarida asam seperti asam

teichoic dan teichuronic yang memberikan muatan negatif bada bakteri ini (Goyal dan Mattoo, 2016). Muatan negatif sel kanker diperoleh dari membran luarnya yang mengandung fosfatidilserin dan heparin sulfat (Aghazadeh *et al.*, 2019 dan Wang *et al.*, 2017).

Mekanisme molekuler kerusakan membran tergantung pada sifat peptida dan membran lipid. Peptida yang telah menempel pada permukaan membran sel kanker maupun bakteri. Selanjutnya, peptida tersebut akan mengganggu stabilitas dan fluiditas membran dengan pembentukan pori (model toroidal dan model barrel-stave) maupun dengan pembentukan non-pori (model karpet), ketiga model mekanisme ini disebut dengan mekanisme membranolitik (E-Kobon *et al.*, 2016; Goyal dan Mattoo, 2016). Ilustrasi skematis mekanisme peptida antibakteri dan antikanker dapat dilihat pada gambar (Gambar 2).



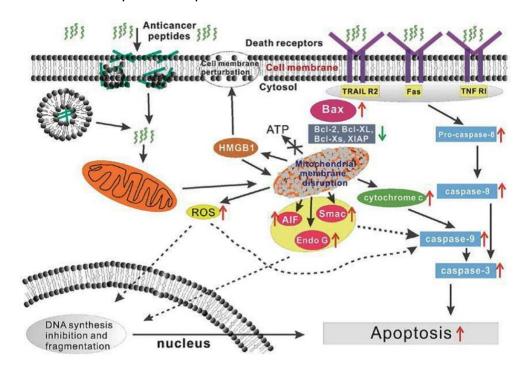
Gambar 2. Ilustrasi skematis mekanisme membranolitik peptida antibakteri dan antikanker. Model Barrel-Stave (A), Model Toroidal (B) dan Model Karpet (C) (Sumber: Camilio, 2014).

Model Barrel-Stave, peptida heliks amfipatik membentuk pori pada membran dengan sisi lipofilik peptida menghadap inti hidrofobik dari lapisan ganda membran dan bagian hidrofilik yang melapisi pori, yang mirip dengan tong yang terdiri dari peptida heliks sebagai tiang pancang (Gambar 2A). Mekanisme kerja ini terutama ditampilkan oleh peptida yang sangat hidrofobik. Model barrel-stave tidak dapat menjelaskan aktivitas sitolitik oleh CAP dengan asam amino yang kurang dari 23 karena peptida tersebut tidak cukup panjang untuk menjangkau membran sel.

Model Toroidal atau disebut mekanisme lubang cacing, mekanisme ini mirip dengan model barrel-stave. Peptida yang berikatan akan masuk ke dalam membran sel, kehadiran peptida ini menginduksi kelengkungan positif dari kepala kutub fosfolipid yang tegak lurus terhadap bidang membran. Keadaan yang demikian, memecah interaksi hidrofobik-hidrofobik dari molekul lipid dan mendukung penyelarasan pembentukan pori-pori toroidal. Model ini telah diusulkan untuk menjelaskan aksi peptida α-heliks dan β-sheet (Goyal dan Mattoo, 2016 dan Wang *et al.*, 2017). (Gambar 2B). Model ini dapat dibentuk oleh variasi peptida yang jauh lebih besar dibandingkan dengan model barrel-stave dan beberapa peptida yang bekerja dengan mekanisme aksi ini dapat melintasi membran dan bekerja pada target intraseluler.

Model karpet, peptida akan mengikat komponen membran sel anionik dan menjadi sejajar dengan permukaan sel, sehingga menciptakan tampilan seperti karpet (Gambar 2C). Setelah mencapai konsentrasi ambang peptida, membran akan mulai tidak stabil dan runtuh karena tekanan kelengkungan dan tekanan osmotik internal, yang pada akhirnya menyebabkan lisis seluler. Dalam model ini, peptida tidak pernah masuk ke dalam inti hidrofobik dari membran sel.

Mekanisme membranolitik dianggap sebagai atribut penting terhadap aktivitas antibakteri dan antikanker. Namun, beberapa bukti menunjukkan mode lain dari aktivitas peptida selain gangguan fungsi membran (membranolitik). Penelitian in vitro menunjukkan kemampuan peptida untuk berasosiasi dengan target intraseluler seperti asam nukleat, protein atau enzim. Mekanisme dengan target intraseluler ini disebut dengan mekanisme non-membranolitik. Ilustrasi skematik mekanisme non-membranolitik dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Ilustrasi skematis mekanisme non-membranolitik peptida antibakteri dan antikanker (Sumber: Wang *et al.* 2017).

Pada Gambar 3 menunjukkan mekanisme non-membranolitik peptida dengan beberapa jalur kematian sel antara lain: pembukaan pori transisi permeabilitas mitokondria, produksi reactive oxygen species (ROS), peningkatan kadar pro-apoptosis dan penurunan anti-apoptosis, pengaktifan reseptor kematian, dan pelepasan pola molekul terkait kematian (Wang *et al.* 2017).

 a) Pembukaan pori transisi permeabilitas mitokondria (mitochondrial permeability transition pore, mPTP).

Membran mitokondria bagian dalam (inner mitochondrial membrane, IMM) mengganggu sintesis ATP dan mengakibatkan masuknya sejumlah air dan zat terlarut kecil yang menyebabkan pembengkakan osmotik mitokondria dan akhirnya kematian sel nekrotik. Selanjutnya, pembukaan pori mPTP pada membran mitokondria bagian luar (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) menyebabkan pelepasan faktor-faktor proapoptosis, seperti sitokrom c (Cyt c), faktor penginduksi apoptosis (apoptosis-inducing factor, AIF), aktivator caspase yang diturunkan dari mitokondria (second mitochondria-derived activator of caspase, Smac) dan endonuclease-G (Endo-G) yang mengarah pada pengaktifan caspases dan berakhir dengan kematian sel secara apoptosis.

b) Produksi spesies oksigen reaktif.

Peptida menginduksi produksi spesies oksigen reaktif (*reactive* oxygen species, ROS) menyebabkan penghambatan sintesis DNA

serta mengaktifkan caspase-9 yang mengarah pada kematian sel secara apoptosis.

## c) Peningkatan kadar pro-apoptosis dan penurunan anti-apoptosis.

Pembukaan mitokondria meningkatkan kadar protein proapoptosis Bax dan menurunkan kadar protein anti-apoptosis Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-Xs, dan XIAP secara bersamaan. Kondisi ini menyebabkan pelepasan sitokrom c dan mengaktifkan caspase-9 dan caspase-3. Gangguan membran mitokondria juga mengakibatkan pelepasan faktor penginduksi apoptosis endonuclease-G (Endo-G) yang mengganggu sintesis DNA sehingga terjadi kematian sel.

### d) Pengaktifan reseptor kematian

Peptida yang melalui membran sel secara spontan mengaktifkan reseptor kematian TRAIL R2, Fas, dan TNF R1. Pengaktifan terjadi melalui pengikatan peptide dengan reseptor kematian Fas. Hal ini menyebabkan pro-caspase-8 membelah menghasilkan caspase-8 diikuti oleh caspase-3 yang akhirnya menginduksi apoptosis.

### e) Pelepasan pola molekul terkait kematian

Peptida mendepolarisasi membran mitokondria dan secara signifikan mengubah morfologi mitokondria sehingga mengakibatkan pelepasan pola molekul terkait kematian (death-associated molecular patterns, DAMPs) seperti sitokrom c, ATP, dan HMGB1 secara bersamaan sehingga merusak integritas sel. Secara khusus DAMPs mengganggu baik membran sel maupun mitokondria.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempelajari mekanisme kerja AMPs dan ACPs dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Mekanisme kerja antibakteri dan antikanker peptida bioaktif

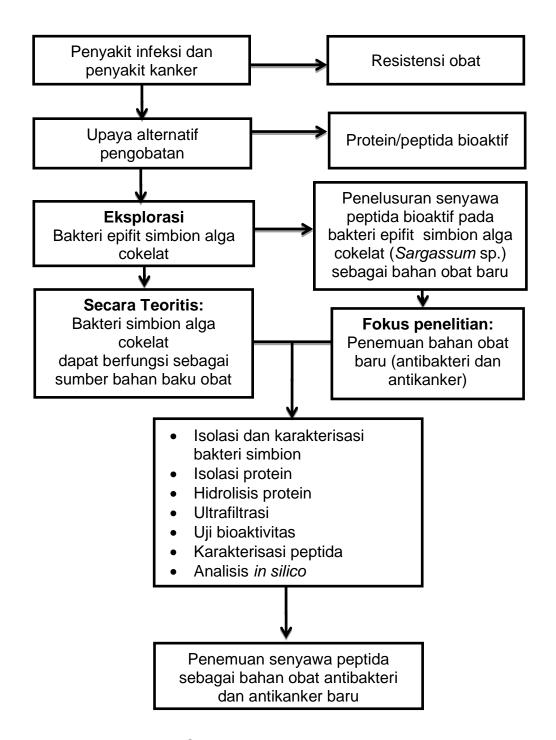
Peptida	Aktivitas	Mekanisme kerja	Referensi
D-peptida A, B, C dan D	Antikanker	Gangguan membran sel	lwasaki <i>et</i> al., 2009
Aurein 1,2	Antimikroba Antikanker	Penargetan membran sel	Rai dan Qian, 2017.
NRC-03, NRC-07	Antikanker	Lisis membran sel dengan kemungkinan pembentukan pori dalam mitokondria dan produksi ROS	Hilchie <i>et al.,</i> 2011
MPI-1	Antikanker	Nekrosis setelah penargetan membran sel	Zhang <i>et al</i> ., 2010
Hepcidin TH2-3	Antikanker	Lisis membran sel	Chen <i>et al.</i> , 2009
Buforin	Antibakteri	mengikat DNA dan RNA setelah menembus membran sel	Bartz <i>et al</i> ., 2011
SVS-1	Antikanker	Gangguan membran sel melalui pembentukan pori	Gaspar <i>et al</i> ., 2012
Epinecidin-1	Antikanker	Lisis membran sel dimediasi oleh aktivitas penghambatan nekrosis	Lin <i>et al.,</i> 2009
TfR-lytic peptide	Antikanker	Induksi apoptosis	Kawamoto <i>et</i> al., 2011
BPC96	Antikanker	Induksi apoptosis	Feliu <i>et al.,</i> 2010
MG2A	Antikanker	Baik nekrosis dan apoptosis	Liu <i>et al</i> ., 2013
ERα17p	Antikanker	Induksi apoptosis dan nekrosis masif	Byrne <i>et al</i> ., 2012
CR1166	Antikanker	Induksi apoptosis	Patra <i>et al.</i> , 2012
PR-39 Peptida	Antibakteri	Penetrasi linear pada membran	Veldhuizen et al., 2014

### H. Kerangka Pikir

Prevalensi kematian akibat penyakit infeksi dan kanker masih sangat tinggi dan terus mengalami peningkatan. Saat ini pengobatan yang diberikan terhadap penyakit infeksi melalui pemberian antibiotik dan terapi pada penderita penyakit kanker melibatkan pembedahan, kemoterapi, radiasi, terapi biologis dan hormonal. Namun, masalah utama dengan perawatan ini adalah timbulnya resistensi dan efek samping yang merugikan (Mahassni and Al-Reemi, 2012; Deslouches and Di, 2017). Oleh karena itu, diperlukan penemuan obat antibakteri dan antikanker baru sebagai alternatif yang dapat memberikan target yang spesifik serta tidak atau kurang memiliki efak samping (E-Kobon *et al.*, 2016)

Peptida bioaktif dapat terlibat dalam berbagai fungsi biologis, termasuk sebagai antibakteri dan antikanker. Peptida bioaktif mempunyai potensi dan lebih disukai menjadi agen terapi karena memiliki spesifisitas dan selektivitas yang tinggi terhadap sel (Tyagi *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2013). Cara yang paling umum untuk menghasilkan peptida bioaktif adalah melalui hidrolisis enzimatik dari seluruh molekul protein menggunakan enzim proteolitik seperti pepsin, tripsin dan termolisin.

Protein merupakan bahan baku utama untuk menghasilkan peptida bioaktif (Harnedy and FitzGerald, 2011). Alga merupakan salah satu sumber daya alam laut yang kaya akan kandungan protein. Kandungan protein antar spesies alga bervariasi, alga cokelat mengandung 5-15% protein berat kering (Fan *et al.*, 2014). Alga cokelat memiliki kandungan protein yang bervariasi dibandingkan dengan alga hijau dan alga merah.



Gambar 4. Kerangka pikir

Alga hidup berasosiasi dengan komunitas bakteri dan dapat mempertahankan hubungan simbiosis. Asosiasi alga dengan bakteri terutama bakteri epifit saling mempengaruhi secara fisiologis dan metabolis. Interaksi spesifik antara simbion dengan inang termasuk transfer prekursor nutrisi, memberi peluang adanya kesamaan metabolit yang dihasilkan diantara keduanya. Oleh sebab itu, eksplorasi senyawa bioaktif dari bakteri epifit simbion alga dapat diperhitungkan untuk dijadikan sebagai sumber bahan baku obat.

Eksplorasi terhadap bakteri epifit simbion alga cokelat *Sargassum* sp. dilakukan melalui penelusuran senyawa protein dan peptida bioaktif pada bakteri tersebut. Fraksi protein yang diperoleh dihidrolisis menggunakan enzim proteolitik. Hidrolisat protein (kandidat peptida bioaktif) yang diproduksi secara enzimatik diharapkan memiliki bioaktivitas yang lebih baik dibanding fraksi protein akibat terlepasnya fragmen bioaktif pada rantai polipeptida selama proses hidrolisis. Kandidat peptida bioaktif yang diperoleh akan diuji aktivitasnya terhadap bakteri dan sel kanker. Adapun kerangka konseptual penelitian secara skematik ditunjukkan pada Gambar 4.

### I. Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa hipotesis penelitian, yaitu:

- bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. dapat didentifikasi spesiesnya.
- Peptida bioaktif dapat diproduksi dari bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. melalui hidrolisis enzimatik.

- Peptida yang dihasilkan dari bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antikanker malalui uji in-vitro
- peptida bioaktif dari hidrolisat fraksi protein bakteri epifit simbion alga cokelat Sargassum sp. dapat diprediksi aktivitasnya melalui pendekat in silico.