

ISOLASI DAN IMPLEMENTASI PROTEIN BIOAKTIF KEPAH (*Atactodea striata*) SEBAGAI BAHAN OBAT ANTIBAKTERI

Tahirah Hasan, Abd. Rauf Patong, Abd. Wahid Wahab, M. Natsir Djide
Pascasarjana Universitas Hasanuddin
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin
Email: hasantahirah@gmail.com

Abstract: *This study aimed to 1) determine the degree of saturation of ammonium sulfate right to extract and purify the bioactive protein from shells (*Atactodea striata*), 2) determine the fraction of active protein from shells (*Atactodea striata*) as a potential antibacterial. In this study used the Lowry method for determine protein concentration and agar diffusion method for antibacterial activity. Extraction of shells *Atactodea striata* was conducted by making use of buffer solution (0,1 M Tris-HCl of pH 8.3, 2 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 1 % β-mercaptoethanol, and 0.5 % Triton X-100). Purification of proteins by precipitation using ammonium sulfate at saturation level 30 %, 50 %, 70 %, and 90 %. The results showed that the protein concentration of the crude extract is 41.6354 mg/ mL. At fractionation rate of 0-90% saturation showed the highest concentration of protein found in fractions with 70% saturation level is 56.4184 mg/mL. The testing of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* showed that crude extracts and protein fractions *Atactodea striata* is considered effective as an antibacterial. The highest bioactivity during 24-hour incubation in protein fractions obtained by ammonium sulfate saturation level of 50% is 25.17 mm. Whereas the lowest activity was obtained at 90% saturation level is 14.05 mm. Bioactivity against *Escherichia coli* after incubation for 24 hours has the highest activity in the protein fraction with 30% ammonium sulfate saturation is 15.12 mm. Whereas the lowest activity was showed at 70% saturation level is 10.30 mm. After the observation was continued for 48 hours on both test bacteria, which formed a clear area becomes cloudy. It shows that the crude extract and fractions of protein tend to be bacteriostatic against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.*

Keywords: *Atactodea striata, antibacterial, bioactivity, bioactive proteins*

1. PENDAHULUAN

Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim yang sangat potensial untuk mengembangkan kimia organik bahan alam laut karena memiliki keanekaragaman hayati. Berbagai penelitian telah terbukti bahwa senyawa organik dengan keragaman struktur kimia dan potensi bioaktif yang menarik, sehingga organisme laut semakin mendapat perhatian yang besar dari peneliti bahan alam di dunia. Sumber senyawa organik ini merupakan pustaka senyawa kimia yang sangat potensial untuk diteliti sebagai sumber senyawa baru untuk

keperluan pengobatan, pertanian, dan industri (Ahmad, *et. al.*, 2007). Moluska merupakan komoditi laut yang potensial sebagai kandidat sumber senyawa bioaktif untuk berbagai keperluan. Bivalvia dan gastropoda merupakan kelompok moluska yang keberadaannya cukup melimpah di wilayah perairan tropis sebagai sumber protein hewani yang baik dengan harga relatif murah. Senyawa bioaktif yang ditemukan dalam moluska diidentifikasi sebagai peptida, depsipectida, sesquiterpen, squalen, terpen, alkaloid, polipropionat, senyawa nitrogen, turunan asam lemak, makrolide dan senyawa lain yang memiliki aktifitas tertentu (Balcazar *et al.*, 2006; Blunt *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian senyawa bioaktif telah dilakukan pada moluska khususnya bivalvia dan gastropoda yang berpotensi sebagai nutraceutical maupun pharmaceutical. Beberapa diantaranya adalah lintah laut (*Discodoris* sp.) (Nurjanah *et al.*, 2009), keong ipong-ipong (*Fascilaria salmo*) (Nurjanah *et al.*, 2011), kijang Taiwan (*Anadonta woodiana* Lea.) (Salamah *et al.*, 2008), Kerang Mas (*Atactodea striata*) (Mutaqin, 2009), *Cyclina sinensis* (Jiang *et al.*, 2011), dan abalon (*Haliotis discus hannai* Ino) (Zhou *et al.*, 2011).

Produk alami yang diisolasi dari bivalvia maupun gastropoda telah dimanfaatkan antara lain sebagai antioksidan, antitumor, antivirus, antibakteri, antijamur, antikanker, sitotoksik dan penghambat enzim (Zhou *et. al.*, 2011). Namun sejauh ini belum ada laporan mengenai aktivitas antimikroba dari metabolit protein yang diisolasi dari bivalvia.

Obat-obatan alami merupakan hasil metabolit sekunder dari organisme hidup yang merupakan proses sintesis substansi kimia dan degradasi oleh organisme dengan sistem enzimatik. Jalur-jalur biosintetik digunakan oleh semua makhluk hidup dalam memproduksi metabolit yang esensial untuk kelangsungan hidup dan pertahanan dirinya. Metabolit primer digunakan untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidup seperti protein, lemak, asam nukleat dan karbohidrat. Sedangkan metabolit sekunder diproduksi oleh organism sebagai respon terhadap lingkungannya dan memiliki aktifitas farmakologik yang memiliki prospek untuk diisolasi dan dimanfaatkan dalam bidang pengobatan (Murniasih, 2005, Sarjoko 1996, Moran *et. al.*, 2008).

Salah satu biota laut yang menarik perhatian peneliti bahan alam laut adalah kerang karena memiliki potensi yang cukup tinggi. Kerang merupakan bahan pangan yang digemari masyarakat sejak dahulu, bahkan kerang dijadikan obat tradisional untuk berbagai penyakit kronis. Oleh karena itu, maka kerang diduga memiliki senyawa bioaktif (metabolit primer dan sekunder) karena secara tradisional telah terbukti kemanjurannya, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai substansi aktif dalam bidang obat-obatan. Berdasarkan pengalaman di masyarakat dan beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa kerang

mengandung senyawa yang dapat menghambat beberapa jenis bakteri. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa beberapa spesies moluska memiliki kandungan protein sehingga tetap tumbuh dan berkembang dengan baik dilaut bebas yang banyak mengandung bakteri pengganggu dan predator lainnya disekitar habitatnya.

Namun hingga saat ini masih kurang data penelitian yang mengeksplorasi senyawa protein sebagai bahan baku obat-obatan. Sementara, protein memiliki beberapa keunggulan yang sangat menjanjikan sebagai bahan obat antibakteri karena dapat diterima tubuh dengan baik tanpa efek samping sehingga peneliti mulai mengembangkan pengobatan atau terapi penyakit dengan menggunakan senyawa protein (Huang, 1999).

Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi dan mengkarakterisasi beberapa fraksi protein bioaktif dari kerang *A. striata* di perairan Pulau Laiya Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Senyawa aktif yang diperoleh akan diuji aktivitasnya sebagai antibakteri. Dari hasil penelitian ini diharapkan munculnya pengetahuan yang lebih baik dari komponen-komponen bioaktif kerang laut tentang daya hambat yang memiliki efektivitas yang optimal terhadap pertumbuhan bakteri untuk digunakan sebagai bahan dasar obat antibakteri. Hasil penelitian ini akan dikembangkan dan diaplikasikan dalam industri bioteknologi untuk selanjutnya dimanfaatkan pada sistem pelayanan kesehatan formal. Penelitian ini juga menjadi dasar utama dalam penelusuran senyawa aktif sebagai antibakteri pada sumber daya laut lainnya. Hasil yang diharapkan dalam penelitian ini adalah diperolehnya suatu senyawa protein aktif baru yang berpotensi sebagai obat terstandarisasi dalam pengobatan penyakit infeksi. Diperolehnya teori baru yang memperkaya khasanah ilmu pengetahuan.

Berdasarkan hal tersebut di atas maka dilakukan penelitian untuk mengkaji senyawa protein aktif dari kerang asal perairan Pulau Laiya Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan yang memiliki aktifitas sebagai antibakteri. Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah mengungkapkan potensi kerang laut sebagai penghasil senyawa yang memiliki aktifitas sebagai antibakteri.

Rumusan Masalah

1. Berapa konsentrasi ammonium sulfat yang tepat untuk mengekstraksi dan memurnikan protein bioaktif dari Kepah (*Atactodea striata*).
2. Apakah fraksi protein ioaktif dari Kepah (*Atactodea striata*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Tujuan Penelitian

1. Menentukan tingkat kejenuhan ammonium sulfat yang tepat untuk mengekstraksi dan memurnikan protein bioaktif dari kerang Kepah (*Atactodea striata*).
2. Mengetahui efek daya hambat fraksi protein dari Kepah *Atactodea striata* yang paling efektif sebagai antibakteri.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitik (Ohaus), inkubator (Memmert), pH meter, pengaduk magnet, lemari pendingin, inkubator, autoklaf, blender, ultrasentrifugasi dingin, kantong selofan (Sigma), penangas air, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini *Atactodea striata*, biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, medium NA (Nutrien Agar), Medium MHA (Muller Hinton Agar), buffer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 2 M, CaCl₂ 0,01 M, β-merkaptotanol 1%, Triton X-100 0,5%), buffer B (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 0,01 M), buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 0,01 M), (NH₄)₂SO₄; Lowry A, Lowry B, Kloramfenikol standar, kapas, aluminium foil.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tiga tahapan, yaitu: 1) preparasi sampel, ekstraksi dan isolasi protein Kepah (*Atactodea striata*), dan uji aktivitas antibakteri; 2) pemurnian protein Kepah (*Atactodea striata*); dan 3) Aplikasi protein aktif, *Atactodea striata*, sebagai antibakteri.

Prosedur Kerja

Preparasi sampel

Sampel diambil diperairan pantai Pulau Laiya Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Sampel dibersihkan dari kotoran kemudian dilepaskan dari cangkangnya ditimbang sebanyak 500 g lalu digiling menggunakan blender dengan menambahkan buffer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 2 M, CaCl₂ 0,01 M, β-merkaptotanol 1%, Triton X-100 0,5%) kemudian disimpan dalam lemari pendingin 4°C selama semalam, selanjutnya disaring dengan corong buchner. Filtrat yang diperoleh dibekuairkan 2-3 kali lalu disentrifugasi pada

6000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit, selanjutnya supernatannya disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilanjutkan uji antibakteri dan proses pemurnian.

Fraksinasi dengan amonium sulfat

Protein ekstrak kasar hasil isolasi selanjutnya difraksinasi dengan amonium sulfat. pada tingkat kejenuhan (0-90%) berdasarkan metode Bollag dan Edelstein (1991). Endapan protein yang dihasilkan dilarutkan dalam larutan buffer Tris-HCl pH 8,3 dan dilanjutkan dengan dialisis menggunakan kantong selofan (sigma)

Dialisis

Dialisis dilakukan menggunakan membran selofan (*Sigma D 0655*). Menurut Plummer (1979), Endapan hasil fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat didialisis dalam sejumlah buffer B (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 0,01 M), selanjutnya didialisis dengan buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl₂ 0,01 M. Dialisis terus dilakukan sampai larutan buffer tidak berwarna. Dialisat yang diperoleh diuji aktivitas dan kadar proteinnya.

Penentuan kadar protein

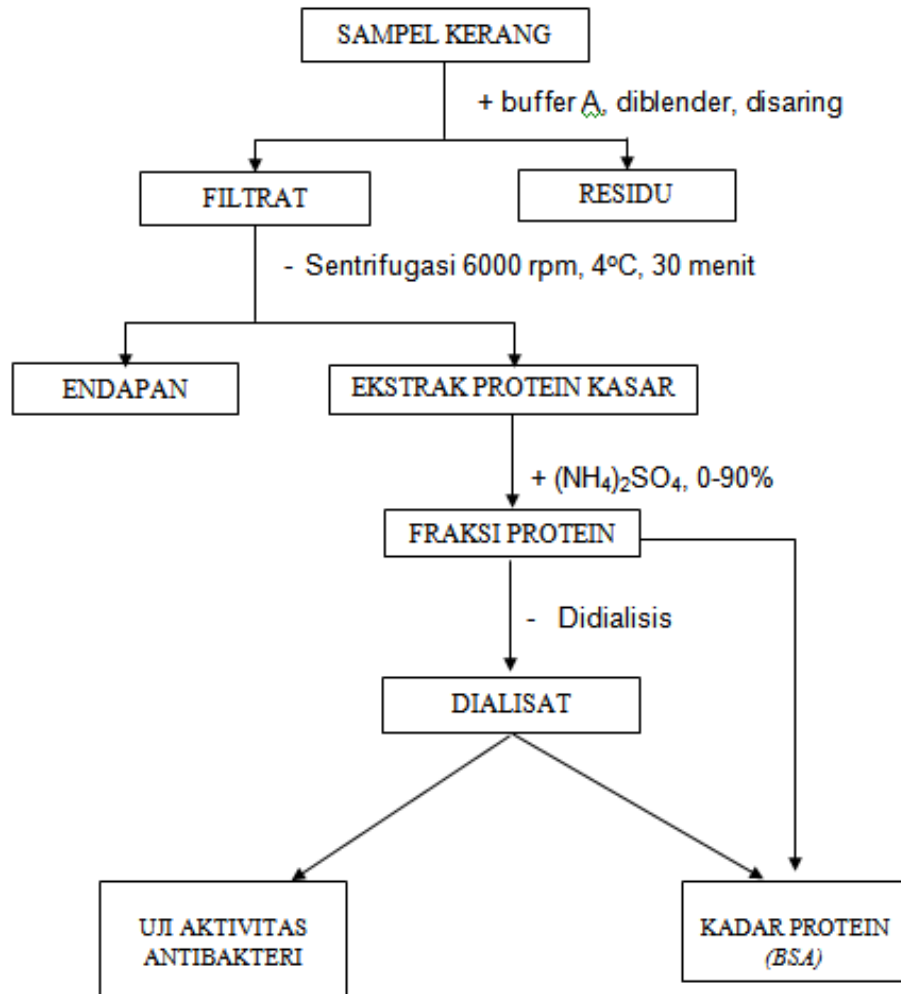
Penentuan kadar protein dilakukan dengan metode Lowry. Standar protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Uji aktivitas antibakteri

Biakan bakteri *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *E. Coli*(ATTC 25922 NCTC 12241) yang digunakan sebagai bioindikator diremajakan pada medium NA dalam tabung miring selama 1x24 jam pada suhu 25°C. Koloni yang tumbuh dalam agar miring diambil satu ose, dihomogenkan dengan NaCl 0,9% diukur kekeruhannya setara dengan standar Mac Parland. Suspensi bakteri uji dituang ke dalam medium yang telah disiapkan dan dibiarkan memadat. Masing-masing *paper disc* ditetesi sampel sebanyak 200 µL ekstrak kasar, fraksi protein dengan tingkat kejenuhan 30%, 50%, 70% dan 90%, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan menggunakan mistar geser yang dinyatakan dalam satuan mm.

SKEMA KERJA PENELITIAN

Kegiatan penelitian seperti yang diuraikan di depan, secara skematik dapat juga dilihat berikut ini:



3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Protein dari Kepah (*Atactodea striata*)

Sampel Kepah (*Atactodea striata*) diperoleh dari perairan pantai Pulau Laiya Kabupaten Pangkep, Sulawesi Selatan. Sampel dibersihkan dari kotoran kemudian dilepaskan dari cangkangnya ditimbang sebanyak 500 g lalu digiling menggunakan blender dengan menambahkan buffer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 2 M, CaCl₂ 0,01 M, β-merkaptotanol 1%, Triton X-100 0,5%) kemudian disimpan dalam lemari pendingin 4°C selama semalam, selanjutnya disaring dengan corong Buchner. Filtrat yang diperoleh dibekukan 2-3 kali lalu disentrifugasi pada 6000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit, kemudian dilanjutkan penentuan kadar protein dan uji aktifitas antibakteri.

Hasil Pengukuran kadar protein Kepah (*Atactodea striata*) menggunakan *Bovine serum albumine* (BSA) sebagai standar dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi protein dari fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat ekstrak Kepah (*Atactodea striata*)

Fraksi	Absorban (y)	Fp	Konsentrasi protein (x)	Kadar protein (x X fp mg/L)
Ekstrak Kasar	0.494	500	0.083270958	41.63547904
0-30 %	0.361	500	0.058383234	29.19161677
30-50 %	0.458	500	0.076534431	38.26721557
50-70 %	0.652	500	0.112836826	56.41841317
70-90 %	0.207	500	0.029565868	14.78293413

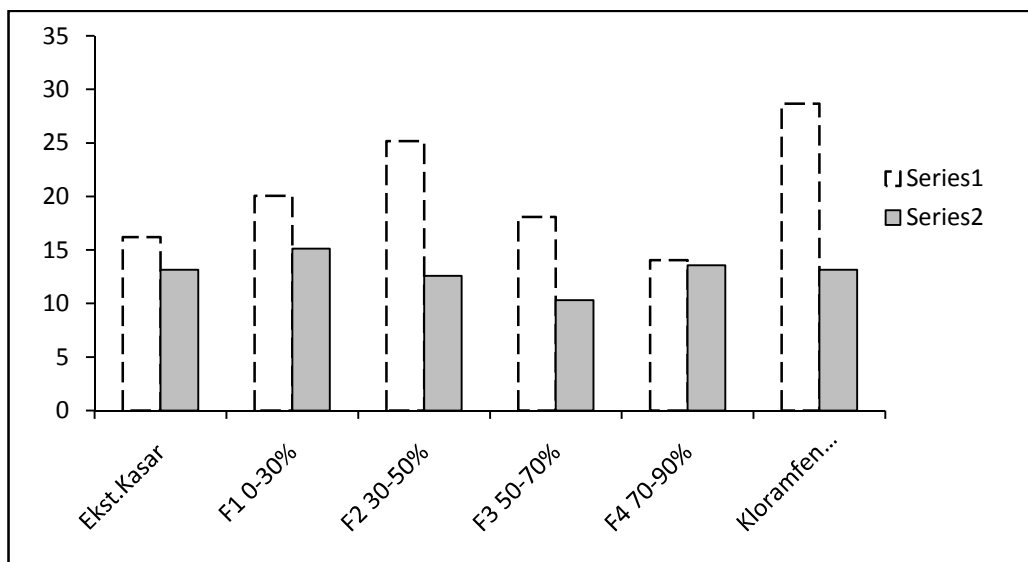
Hasil analisis kadar protein Kepah (*Atactodea striata*) pada Tabel 1 menunjukkan bahwa konsentrasi protein dari ekstrak kasar yaitu 41,6354 mg/mL. Distribusi protein pada setiap fraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-90% menunjukkan konsentrasi protein tertinggi ditemukan pada fraksi dengan tingkat kejenuhan 70% yaitu 56,4184 mg/mL. Sedangkan konsentrasi protein terendah ditemukan pada fraksi dengan tingkat kejenuhan 90% yaitu 14,7829 mg/mL. Hasil pengukuran kadar protein menunjukkan bahwa total protein tiap fraksi berbeda-beda dari tiap fraksi. Hal ini menunjukkan bahwa protein yang mengendap dari tiap fraksi adalah protein yang berbeda. Protein tersebut mengendap berdasarkan perbedaan kelarutan dalam air.

Uji Aktivitas Antibakteri

Dialisat yang diperoleh dari hasil dialisis diuji aktivitasnya sebagai antibakteri menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sebagai bioindikator yang keduanya merupakan bakteri patogen bagi manusia. Pengujian aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri menggunakan metode difusi agar dengan meletakkan *paper disk* pada medium Muller Hinton Agar (MHA) yang telah ditetesi larutan ekstrak kasar dan beberapa fraksi protein Kepah (*Atactodea striata*).

Tabel 2. Bioaktivitas antibakteri fraksi protein Kepah (*Atactodea striata*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *E. coli*

Fraksi	Rata-rata diameter zona hambatan (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ekstrak Kasar	16,21	13,15
0-30 %	20,05	15,12
30-50 %	25,17	12,58
50-70 %	18,08	10,30
70-90 %	14,05	13,56
Kontrol (+)	28,65	13,15
Kloramfenikol		



Gambar 1. Diagram zona hambatan Antibakteri fraksi-fraksi protein terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Berdasarkan tabel hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi protein *Atactodea striata* dinilai efektif sebagai antibakteri. Bioaktivitas tertinggi pada masa inkubasi 24 jam diperoleh pada fraksi protein dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 50% yaitu 25,17 mm. Sedangkan aktivitas terendah diperoleh pada fraksi protein dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 90% yaitu 14,05 mm. Bioaktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* setelah diinkubasi selama 24 jam memiliki aktivitas tertinggi pada fraksi protein dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 30% yaitu 15,12 mm. Sedangkan aktivitas terendah ditunjukkan pada fraksi protein dengan tingkat kejenuhan 70% yaitu 10,30 mm.

Setelah pengamatan dilanjutkan selama 48 jam pada kedua bakteri uji, daerah bening yang terbentuk menjadi keruh. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi-fraksi protein cenderung bersifat bakteristatik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

4. PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak protein Kepah (*Atactodea striata*) dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat 50% memiliki aktivitas tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* dengan zona hambatan 25,17 mm. Sedangkan aktivitas tertinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan pada tingkat kejenuhan ammonium sulfat 30% dengan zona hambatan sebesar 15,12 mm dan bersifat bakteristatik. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* menunjukkan bahwa ekstrak kasar dan fraksi protein *Atactodea striata* dinilai efektif sebagai antibakteri.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen yang lain dan menentukan kadar hambat minimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, A., Karim, A., dan Arief, A. 2007, *Bioaktivitas Antimikroba dan Antikanker Fraksi Protein yang Diisolasi dari Beberapa Spesies Spons di Pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan*. Prosiding Seminar Nasional Research Grand TPSDP Bateh II, Bali.
- Al-Baarri, A. N., Ogawa, M., and Hayakawa, S. 2011, Application of Lactoperoxidase System Using Bovine Whey And The Effect Of Storage Condition On Lactoperoxidase Activity, *Intenational Journal of Dairy Science*, 6: 72-78.
- Bachok, S., P. L. Mfilinge, and M. Tsuchiya, 2006, As Indicated Suspension-Feeding Bivalvesrces of Coexisting Subjected to Bivalves Abundance on a Tidal Flat, *Journal of Sustainability Science and Manaement*, 1: 92-111.
- Balcazar, J.L., Blas, Ruiz Zarzuela, D. Cuningham, Vendrell and Muzquiz, 2006, The Rute of Probiotic in Aquaculture. *Veterinary Microbial.*,114: 173-186.
- Barnes RD., 1982, *Invertebrate Zoology*, Saunders College, Fourth Editin.
- Blunt, J. W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote and Prinsep, M.R. 2006, Marine Natural Products, *Natural Product Reports*, 23: 26-78.
- Djide, M.N., Sartini, 2008, *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*, Makassar: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Huang. L, 1999, *Protein dalam Air Mata Obat untuk AIDS*, **Online**, <http://www.rad.net.id/warta/wao4701.htm>, (diakses 2 Januari 2013).
- Moka, W., 1982, *Identifikasi dan Inventarisasi Jenis kerang Laut Yang Digunakan Sebagai Obat Tradisonal Di Sulawesi selatan*, Makassar: Universitas Hasanuddin
- Naim, R., 2008, *Protein Antimikroba dalam Susu*, **Online**, <http://www.poultryindonesia.com>, (diakses 3 Januari 2013).
- Nurjanah, L. Hardjito, D. Monintya, Bintang M., & D.R. Agungpriyono, 2009, *Aktivitas Antioksidan Lintah Laut (Discodoris sp) dari Perairan Pulau Lintah Laut dari Perairan Pulau Buton Sulawesi Tenggara*. Prosiding Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Jakarta
- Nurjanah, A. Abdulla, dan A. Apriand, 2011, Aktivitas Antioksidan daan Komponen Bioaktif Pada Keong Ipong-Ipong (*Fasciolaria salmo*), *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, XIV(1): 22-29.
- Plummer, D.T., 1979, *An Introduction to Practical Biochemistry*. Second Edition. Tata Mc. Graw Hill Publishing Company Ltd. New Delhi.

- Salamah, E., E. Ayuningrat, dan S. Purwaningsih, 2008, Penapisan Awal Komponen Bioaktif dari Kijing Taiwan (*Anadonta woodiana* Lea.) sebagai Senyawa Antioksidan. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*, 11(2): 119-132
- Scopes, R.K., 1987, *Protein Purification Principles and Practice*, Second edition, New York: Springer-Verlag.
- Stanbury, P.F., and J.R. Whitaker, 1984, *Principle of Fermentation Technology*, New York: Academic Press.
- Wattimena, J.R. 1991, *Farmakodinamika dan Terapan Antibiotik*, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Zhou, D.Y., B.W. Zhu, L. Qiao, H.T. Wu, D.M. Li, J.F. Yang, and Y. Murata, 2011, In Vitro Antioxidant Activity of Enzymatic Hydrolysates Prepared From Abalone (*Haliotis Discus Hannai* Ino) Viscera. *Food and Bioproducts Processing*, in press.