

**RISET UNGGULAN TERPADU (RUT)  
TAHUN ANGGARAN 2007**

KKA  
KK  
LP-144/10  
Ber  
r

**LAPORAN KEMAJUAN TAHAP III (AKHIR TAHUNAN)  
(PERIODE 1 FEBRUARI 2007 s.d. 30 MEI 2007)**

**KARAKTERISASI FAKTOR ANTIBAKTERI  
GLIKOPROTEIN BEKICOT GALUR JAWA SEBAGAI  
OBAT TOPIKAL PADA KARIES GIGI**

**Titiek Berniyanti, Dr., drg., Mkes.**

**Suwarno, Dr., drh., MSi.**

**Esti Hendradi, dra., Apt. MSi.PhD.**

**LEMBAGA PENELITIAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
KEMENTRIAN RISET DAN TEKNOLOGI  
DAN  
LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**

**RISET UNGGULAN TERPADU (RUT)**

**TAHUN ANGGARAN 2007**

**LAPORAN KEMAJUAN TAHAP III (AKHIR TAHUNAN)**

**(PERIODE 1 FEBRUARI 2007 s.d. 30 MEI 2007)**

**KARAKTERISASI FAKTOR ANTIBAKTERI  
GLIKOPROTEIN BEKICOT GALUR JAWA SEBAGAI  
OBAT TOPIKAL PADA KARIES GIGI**

**Titiek Berniyanti, Dr. drg., MKes.**

**Suwarno, Dr., drh., MSi.**

**Esti Hendradi, dra., Apt. MSi.PhD.**

**LEMBAGA PENELITIAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
KEMENTERIAN RISET DAN TEKNOLOGI  
DAN  
LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**

**LEMBAR PENGESAHAN**

Judul Riset : Karakterisasi Faktor Antibakteri glikoprotein  
Bekicot Galur Jawa Sebagai Obat Topikal  
Pada Karies Gigi

RUT : XII Tahun ke III

Bidang Penelitian : Kesehatan

Topik Penelitian : Penemuan dan Pengembangan obat

PROGRAM IPTEK : Terapan

Lama Penelitian : 3 tahun

Tahun Mulai Riset : 2005

Tahun Berakhir : 2007

Jumlah Biaya Keseluruhan: Rp. 104.768.000,-

Tahap I (20 %) : Rp. 20.953.600,-

Tahap II (50 %) : Rp. 52.384.000,-

Tahap II (30 %) : Rp. 31.430.400,-

**PENELITI UTAMA**

Nama lengkap : Dr. Titiek Berniyanti, drg., MKes.

Tempat & Tanggal lahir : Jakarta/20 Oktober 1958

Jenis Kelamin : Perempuan

Unit Kerja : Universitas Airlangga

**SURAT PERJANJIAN TERAKHIR**

Nomor : 08/BA/Dep.III/RUT/PPKI/X/2007

Tanggal : 8 Oktober 2007,

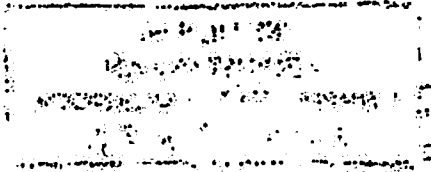
Surabaya, 30 Desember 2007

**Mengetahui**  
**Lembaga Penelitian Unair,**

**Prof. Dr. H. Sarmanu, MS**  
**NIP : 130 675 835**

**Peneliti Utama ,**

**Dr. Titiek Berniyanti, drg., MKes**  
**NIP : 131 381 459**



## BAB I

## PENDAHULUAN

Resistensi bakteri dalam jumlah cukup besar yang muncul akhir-akhir ini cukup memberikan masalah yang serius dalam dunia kedokteran. *Multipel drug-resistance* bakteri patogen terus berlangsung, dan situasi ini merupakan ancaman besar terhadap kemoterapi antibakteri dan kontrol infeksi. Sejalan dengan hal tersebut melalui aktivitas-aktivitas komersial, penggunaan antibiotik yang tidak semestinya untuk tujuan kesuksesan suatu industri terus dilakukan. Untuk mengatasi masalah tersebut, perkembangan antibiotik baru dengan mekanisme kerja yang bagus amat dibutuhkan. dan peptida antimikroba adalah pilihan yang tepat (Mainous & Pomeroy, 2001).

Peptida antimikroba merupakan kandidat agen antibakteri yang baru, terkait dengan spektrum antibakterinya yang luas, toksisitas selektif yang tinggi, dan kesulitan untuk bakteri menjadi resisten terhadap peptida tersebut (Boman, 1998; Hancock, 2000 ; Lehrer *et al.*, 1999). Suatu kondisi yang mengarahkan peneliti untuk mempertimbangkannya sebagai antimikroba alami dan merupakan hal baru dan alternatif yang inovatif terhadap antibiotik kimia dengan masa depan yang menjanjikan sebagai alat bioteknologi.

Menurut Jensen, 2006 berbagai macam organisme mampu menghasilkan peptida antimikroba, dan berperan membunuh organisme patogen yang masuk. Menariknya peptida antimikroba juga dikenal sebagai modulator *innate immune response* pada organisme tingkat tinggi (Bowdish, 2005). Peptida antimikroba tersebut umumnya mempunyai tipe yang relatif pendek (12-100 asam amino), bermuatan positif (+2 - +9), amfifilik dan bisa diisolasi dari mikroorganisme bersel satu, serangga, invertebrata, tumbuhan, burung, ikan dan mamalia bahkan manusia. Peptida antimikroba akan terekspresi oleh adanya infeksi atau rangsangan peradangan, seperti proinflammatory cytokine, bakteri atau molekul bakteri yang merangsang *innate immunity*.

Peptida sebagian besar merupakan antimikroba yang poten, dan merupakan molekul efektor penting dari *innate immune system*. Mampu memperbaiki fagositosis, merangsang lepasnya prostaglandin, menetralkan efek septik dari LPS.

meningkatkan pengerahan dan pengumpulan bermacam-macam sel-sel imun pada sisi keradangan, meningkatkan angiogenesis dan merangsang perbaikan luka. Peptida tersebut selain mempunyai efek langsung pada mikroba seperti merusak atau menginstabilisasi bakteri, virus, atau beraksi pada membran fungi atau target lain, juga terlibat secara luas pada *innate immune* dan respon keradangan.

Bekicot, suatu invertebrata dari spesies *Achatina Fullica Ferussac* mulanya hanya dikenal sebagai hama tanaman, karena memakan tanaman yang di tanam manusia sehingga menjadi rusak. Perkembangan dalam pengetahuan telah banyak mempengaruhi pola pikir masyarakat sehingga hewan lunak ini sekarang sudah mulai dibudidayakan orang untuk dikonsumsi di dalam maupun di luar negeri. Tubuhnya ditandai dengan lendir yang banyak menutup seluruh permukaannya. Lendir selain dikeluarkan oleh kelenjar yang berada di bawah kaki, pada alat pencernaan makanan, juga dihasilkan oleh kulit, sehingga memudahkan bekicot untuk memanjat, menggantung pada tanaman atau tembok (Gamadi dalam Purwoko, 1987). Lendir tersebut dimaksudkan untuk mencegah terjadinya penguapan, membantu pergerakan secara halus, dan melindungi tubuh dari luka-luka mekanis (Simkiss & Wilbur, 1977;). Secara empiris, lendir ini sejak beberapa tahun yang lalu telah dimanfaatkan oleh masyarakat pedesaan, terutama masyarakat di Jawa, untuk pengobatan sakit gigi, yaitu dengan cara meneteskannya pada lubang gigi yang sakit (karies gigi).

Penelitian yang dilakukan oleh Berniyanti Dkk, 2005, pada bekicot *Achatina fullica* Ferussac galur Jawa, juga menyebutkan bahwa Ahasin dari lendir bekicot *Achatina fullica* Ferussac galur Jawa adalah suatu antimikroba dari jenis peptida dengan Berat molekul 71,3 kDa, tersusun atas 17 asam amino dan merupakan kandidat agen antibakteri yang baru, terkait dengan spektrum antibakterinya yang luas dan mampu membunuh bakteri gram positif, *Streptococcus mutans* serta bakteri gram negatif *Escherichia coli*. Elektron micrograf dari *S. mutans* potongan amat tipis akibat pemberian ahasin 1mg/ml dengan observasi selama 1 jam. menunjukkan adanya penurunan densitas pada sitoplasma sel, adanya kondensasi materi genetik, serta adanya membran sel yang irregular. Gambaran ultrastruktur *S. mutans* akibat pemberian ahasin 1mg/ml dengan observasi selama 2 jam. Terlihat adanya



kebocoran pada membran sitoplasma, dan protoplas pada beberapa sel. Gambaran ultrastruktur *S. mutans* akibat pemberian achasin 1mg/ml dg observasi selama 4 jam terjadi kondensasi materi genetik serta sitoplasma mengalami *clearing*. Gambaran ultrastruktur *S. mutans* akibat pemberian achasin 1mg/ml dengan observasi selama 5 jam terlihat adanya *clearing*, vakuolisasi pada sitoplasma, membran sel menjadi rusak, dan septasi tidak sempurna. Hasil yang didapat pada penelitian tersebut menyiratkan adanya kerusakan bakteri akibat pemberian achasin. Tincu *et al.* (2004), menyatakan bahwa filum moluska dari jenis *marine invertebrate* memang memiliki peptida antimikroba yang merupakan komponen utama pada mekanisme *innate immune defense system* yang dimilikinya. Peptida antimikroba dikatakan tersebar terutama pada jaringan lunak seperti usus dan pernafasan, di mana paparan terhadap organisme patogen biasa terjadi, dan umumnya bereaksi dengan membentuk pori pada membran mikroorganisme atau mengganggu integritas membran (Tom *et al.*, 2000) yang difasilitasi oleh struktur amfifilik.

Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tersebut di atas dan makin banyaknya bakteri yang resisten terhadap antibiotik, peneliti tertarik untuk mengkaji lebih lanjut achasin lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa. Purifikasi dan karakterisasi serta serangkaian uji toksisitas achasin perlu dilakukan. Uji ini selain untuk dapat mengungkap secara jelas karakteristik dan efek penghambatan pertumbuhan terhadap bakteri, serta pengembangan achasin kearah pembuatan suatu obat perawatan saluran akar akan lebih terarah, juga diharapkan akan aman jika diaplikasikan pada manusia. Dalam mencapai target yang diharapkan penelitian ini dilakukan dalam tahap-tahap sebagai berikut:

Tahap I, Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Biokimiawi Achasin,: 1) Pembuatan ekstrak dilakukan sebagaimana metode umum sehingga diperoleh presipitasi dalam ethanol; 2. Purifikasi dan Karakterisasi Glikoprotein dengan pengecatan menggunakan "*GelCode Glycoprotein Staining Kit*" dari Pierce (No. Cat. 24562); 3) karakterisasi Kadar menggunakan "*Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit*" dari Pierce (No. Cat. 23260) dan metode Biuret secara spektrofotometri. 4) Deglikosilasi Enzimatis

Tahap II Uji Electrofocusing



**Tahap III Efek pengrusakan Ahasin sebagai antibakteri terhadap bakteri uji *Phorphyromaonas endodontalis* 1)Uji Difusi dan Dilusi serta 2) Analisis ultrastruktur dimaksudkan untuk mengetahui aspek morfologi dari bakteri akibat faktor antibakteri Ahasin, (untuk mendapatkan gambaran Elektron mikroskopi) dengan TEM.. Tahap IV Formulasi Glikoprotein sebagai sebagai Antibakteri**

## BAB II

### HASIL-HASIL YANG DICAPAI SELAMA TAHUN ANGGARAN 2007

Target akhir yang ingin dicapai yaitu didapatkan glikoprotein (achasin) yang telah dipurifikasi dan dikarakterisasi dengan kadar/konsentrasi efektif yang mampu berperan sebagai bakterisid terhadap bakteri *Esherichia coli* (Gram negatif) dan *Streptococcus mutans* (Gram positif), maupun *Phorphyromonas endodontalis*. Pencapaian ini akan memberikan kontribusi dalam memecahkan masalah karies gigi di Indonesia, melalui pendekatan preventif maupun kuratif dengan menemukan model obat *topical*. Formulasi komposisinya mengacu pada protein achasin dari lendir bekicot isolat lokal yang dipadu dengan bahan pembawa. Dengan menemukan formulasi dengan komposisi yang tepat, akan dapat dibakukan sebagai komponen untuk pengembangan preventif maupun terapi karies gigi di Indonesia. Untuk mencapai target yang diharapkan, pada tahun II dirancang tahapan penelitian sebagai berikut:

- I. Purifikasi Lendir Bekicot *Achatina Fullica Ferrusac* galur Jawa untuk medeteksi Achasin ,
- II. Mekanisme kerusakan achasin sebagai antibakteri terhadap bakteri uji saluran akar gigi *Phorphyromonas endodontalis*

Hasil yang telah dicapai dalam penelitian Tahap I–V, adalah sebagai berikut:

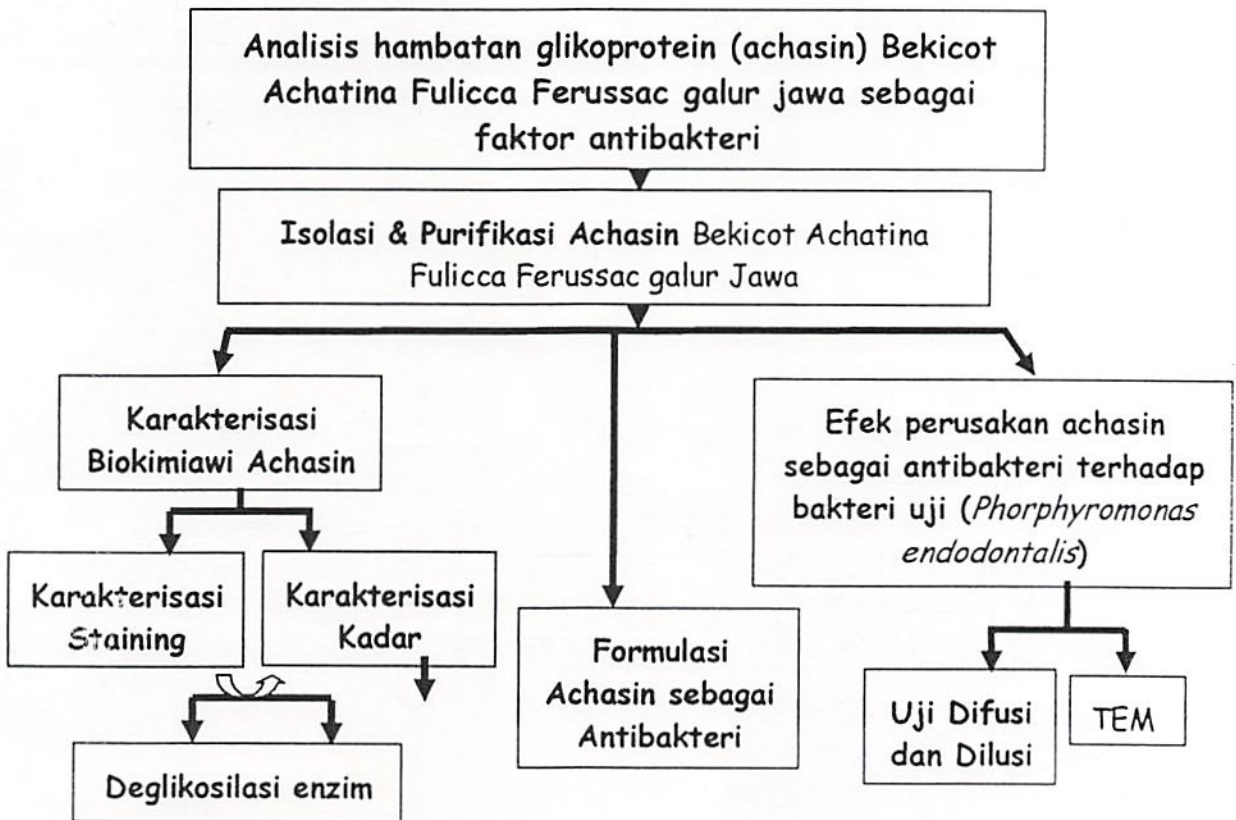
- 1) Kesimpulan terhadap keberadaan glikoprotein lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa hasil isolasi (fraksi lendir, fraksi larut air dan fraksi presipitasi etanol)
- 2) Kesimpulan terhadap komposisi kadar karbohidrat dan protein yang terkandung dalam glikoprotein lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa hasil isolasi (fraksi lendir, fraksi larut air dan fraksi presipitasi etanol)
- 3) Kesimpulan terhadap komposisi kadar karbohidrat dan protein yang terkandung dalam glikoprotein lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa dilakukan deglikosilasi enzim

- 4) Efek Kerusakan bakteri uji (*Phorphyromonas endodontalis*) belum dapat diungkap melalui pemeriksaan TEM.
- 5) Kesimpulan terhadap Uji Elektrofokusing
- 6) Kesimpulan terhadap Formulasi glikoprotein sebagai antibakteri

## BAB III

## PELAKSANAAN PENELITIAN

Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan dari penelitian ini meliputi tiga kajian atau tahap besar yaitu: 1) Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Biokimiawi Ahasin, 2) Uji Toksisitas Ahasin, dan 3) efek pengrusakan Ahasin sebagai antibakteri terhadap bakteri uji yang dilakukan dalam beberapa tahap penelitian, sebagaimana tersaji pada diagram alir Gambar 3



Gambar 3 Diagram alir tahapan penelitian.

Tahap I, Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Biokimiawi Ahasin,: 1) melakukan isolasi lendir bekicot *Achatina fullica* Ferrusac galur Jawa; 2) pembuatan ekstrak protein dari tiga macam pelarut, pembuatan ekstrak dalam aquades dengan metode maserasi dengan air, ekstrak dalam ethanol untuk mendapatkan presipitasinya dan

ekstrak dalam bufer Tris-HCl (pH 8.0 serta resuspensi pelet dengan Tris-Cl menjadi Etp); 3) melakukan *freeze dry* terhadap ekstrak aktif. 4) Ekstrak dalam jumlah yang cukup selanjutnya dikeringbekukan dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi protein yang cukup untuk dilakukan purifikasi; 5) purifikasi Etp dengan kromatografi penukar ion, untuk memisahkan/memurnikan protein berdasarkan muatan ionnya; 6) purifikasi isolat aktif murni dengan elektroforesis (SDS-PAGE). Purifikasi disini dimaksudkan untuk menentukan pita dominan (71,3kDa) dan tidak terkontaminasi dengan pita lain; 7) Simpan dalam Freezer

8) Karakterisasi Glikoprotein dengan pengecatan menggunakan "*GelCode Glycoprotein Staining Kit*" dari Pierce (No. Cat. 24562); 9) karakterisasi Kadar menggunakan "*Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit*" dari Pierce (No. Cat. 23260) dan metode Biuret secara spektrofotometri.

Tahap II Uji Toksisitas Ahasin 1) Uji Toksisitas terhadap Kultur sel Fibroblast embrio mencit 2) Uji Toksisitas terhadap mencit dengan indikator Uji SGOT, SGPT, BUN, Creatinin, dan IgE

Tahap III Efek pengrusakan Ahasin sebagai antibakteri terhadap bakteri uji *Phorphyromaonas endodontalis* 1) Uji Difusi dan Dilusi serta 2) Analisis ultrastruktur bakteri untuk mendapatkan gambaran Elektron mikroskopi dengan TEM

### 3.1 Metode Penelitian

#### 3.1.1 Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein Lendir Bekicot *Achatina Fulica Ferussac* galur Jawa

##### 3.1.1.1 Isolasi dan Purifikasi

Rancangan analisis yang digunakan adalah observasional eksploratif dan analitik. Observasional eksploratif karena penelitian ini melakukan pengamatan untuk memperoleh suatu data berupa isolat aktif yang murni dan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Phorphyromaonas endodontalis*. Perhitungan statistik yang digunakan adalah Anava dan Anava Faktorial untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan Ahasin dan jenis kelamin terhadap mencit secara *in vitro* maupun *in vivo*.

### 3.1.1 Isolasi lendir bekicot

Pengambilan sampel dari lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac lokal, sebanyak 10-20 bekicot, dengan cara merangsang permukaan bekicot dengan menggunakan *electric shock* pada tegangan listrik 5-10 Volt, selama 30-60 detik. Lendir ditampung atau dikumpulkan disuatu tempat dan disimpan di dalam *freezer* dalam kondisi tertutup rapat. Ketika akan dipakai lendir dicairkan terlebih dahulu dan diukur berapa jumlahnya.

Fraksi achasin yang larut dalam air (*water soluble fraction*) didapat dari prosedur mencampur dua volume air yang ditambahkan pada lendir. Campuran yang didapat didiamkan selama semalam di atas stirrer dan diberi magnet stirrer di dalam lemari pendingin. Fraksi larut air tersebut kemudian disentrifuse pada 8000 g (8500 rpm, Beckman Model J-21) selama 30 menit.

Supernatan yang didapat dikatakan sebagai *WSF*. *WSF* kemudian diukur jumlahnya dan ditambah etanol. Tujuan penambahan etanol untuk mendapatkan fraksi presipitasi etanol (*Etp*). Tiga volume ethanol ditambahkan pada *WSF* secara sedikit demi sedikit, kemudian didiamkan selama 1 jam dan selanjutnya campuran tersebut disentrifuse pada 2900 g (4000 rpm, Yuan Kr 422) selama 30 menit.

Presipitasi yang didapat diencerkan kembali dengan tris-HCL pH 8.0 dan didapatkan fraksi presipitasi etanol hasil resuspensi. Hasil resuspensi yang didapat dikumpulkan dan kemudian disimpan di dalam  $-80^{\circ}\text{C}$  untuk kemudian dilakukan *freeze dry* untuk mendapatkan ekstrak yang pekat dan kering mudah disimpan.

### 3.1.2. Karakterisasi Biokimiawi Achasin

#### 3.1.2.1 Karakterisasi dengan pengecatan

Isolasi native glikoprotein achasin dilakukan dengan metode elektroelusi pada pita yang muncul dalam running SDS-PAGE terhadap total achasin yang telah dikonfirmasi dengan pewarnaan "*GelCode Glycoprotein Staining Kit*" dari Pierce (No. Cat. 24562). Untuk memperoleh pita achasin dilakukan elektroelusi dalam *electroelution chamber* terhadap hasil running SDS-PAGE sampel achasin. Caranya adalah melakukan SDS-PAGE dengan satu sumuran gel hasil SDS-PAGE berisi

marker dengan pewarnaan Commasie Brillian Blue R-250, dan satu sumuran yang berisi sampel diwarnai "GelCode Glycoprotein Staining Kit" dari Pierce (No. Cat. 24562). Glikol yang ada dalam glikoprotein akan teroksidasi dengan aldehida ketika diberi perlakuan dengan reagen oksidasi (asam periodik). Setelah prosedur selesai, glikol dicat, memunculkan band magenta dengan latarbelakang merah muda terang atau tanpa warna. (Sumitro dan Aulani'am, 2000). Bagian gel lain dipotong pada posisi pita achasin, potongan ini dimasukkan dalam kantong selofan (kantong dialisis) dan dielektroelusi dalam 2.5 mM buffer Tris-glisin (pH 8.3) pada kondisi konstran current 20 mA, 250 volt pada suhu 4<sup>0</sup>C (cool room) selama 12 jam. Hasil elektroelusi kemudian dikarakterisasi berdasarkan kandungan protein, karbohidrat dan glikoprtein serta Berat Molekul (BM).

#### Prosedur pengecatan glikoprotein dengan *SDS-Polyacrylamide Gels*

Bahan :

#### Prosedur Pewarnaan Glikoprotein

#### ❖ Running SDS PAGE

##### Separating Gel 12 %

Bahan	1 plate	2 plate
LGB	1300 µl	2600 µl
T-acryl 30%	2000 µl	4000 µl
H2O	1700 µl	3400 µl
APS	70 µl	140 µl
TEMED	7 µl	14 µl

##### Stacking Gel 3%

No	Stacking Gel 3%	1 Plate	2 Plate
1	UGB	415 µl	830 µl
2	T-Acryl 30%	267 µl	534 µl
3	ddH2O	975 µl	1950 µl
4	APS	20 µl	40 µl
5	Temed	2 µl	4 µl

**Persiapan Bahan untuk pengecatan**

*"GelCode Glycoprotein Stain"*

Reagen oksidasi

Reagen reduksi

Kontrol Positif (Horsedish Peroksidase)

Kontrol Negatif (Soybean Trypsin Inhibitor)

Metanol, Spektroskopi Grade

Acetic Acid Glacial

**3 % Asam asetat:** 30 ml Acetic Acid Glacial campur dengan 970 ml ultrapure water.

Simpan dalam temperatur ruang

**50 % Metanol:** Campur 250 ml metanol dengan 250 ml ultrapure water. Simpan dalam temperatur ruang

**Oxidizing solution:** Tambahkan 250 ml 3% asam asetat kedalam botol yang berlabel oxidizing reagen dan campur sampai larut. Simpan dalam temperatur ruang.

**Reducing solution:** Tambahkan 250 ml ultrapure water kedalam botol berlabel reagen reduksi dan campur sampai bahan terlarut sempurna. Simpan dalam temperatur ruang.

**Kontrol positif Horseradish Peroksidase:** Tambahkan isi horsedish Peroksidase dengan 0,5 ml ultrapure water untuk menghasilkan 2 mg/ml larutan. Larutkan kedalam 1 mg/ml dengan sampel buffer untuk analisis SDS-PAGE. Untuk 8x8 cm gel, aplikasikan 5  $\mu$ l atau 10  $\mu$ l campuran kontrol positif per garis. Sesudah disusun campuran kontrol positif horsedish peroksidase, alikuot dan simpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Kontrol Negatif Soybean Trypsin Inhibitor:** Tambahkan isi Inhibitor Soybean Trypsin dengan 0,5 ml ultrapure water untuk menghasilkan 2 mg/ml larutan. Larutkan kedalam 1 mg/ml dengan sampel buffer untuk analisis SDS-PAGE. Untuk 8x8 cm gel, aplikasikan 5  $\mu$ l atau 10  $\mu$ l campuran kontrol negatif per garis. Sesudah disusun campuran kontrol negatif Inhibitor Soybean Trypsin, alikuot dan simpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Pelarut Sampel:** Larutkan sampel yang akan dianalisa kedalam larutan 1 mg/ml dengan sampel buffer untuk analisis SDS-PAGE

❖ **Setelah running:** 1. inkubasi methanol 50% ; 30'



2. *washing* as. Asetat 3% ; 2 x 10'
3. *washing* dengan *oxidation solution* ; 15'
4. inkubasi dengan asam asetat 3% ; 3 x 15'
5. inkubasi *glicoprotein staining* ; 15'
6. inkubasi *reduction solution* ; 5'
7. *washing* asam asetat 3% ; 5'
8. *washing* ddH<sub>2</sub>O ; sampai bening
9. *Store* dalam asam asetat 3%

### **Prosedur**

1. Sesudah elektroforesis, rendam gel seluruhnya dalam 100 ml 50 % metanol selama 30 menit.
2. Cuci gel dengan gerakan halus dengan 100 ml 3 % asam asetat selama 10 menit, dan ulangi langkah ini satu kali (2x10 menit). Proses ini akan menghentikan proses pertama. Gel dapat dibiarkan dalam air semalam pada 4 °C
3. Inkubasi gel kedalam 25 ml larutan oksidasi dan gerakkan secara halus selama 15 menit
4. Cuci gel dengan gerakan halus dengan 100 ml 3 % asam asetat selama 5 menit, dan ulangi langkah ini dua kali (3x 5 menit).
5. Inkubasi gel ke 25 ml GelCode Glikoprotein staining reagen dan gerakkan halus selama 15 menit. Jika kristal terbentuk dalam GelCode glikoprotein stain, sentrifus larutan dan ambil supernatan untuk digunakan. Jangan dipanasi untuk melarutkan kristal. Stain hanya digunakan setelah kristal dibuang.
6. Inkubasi gel kedalam larutan reduksi dan gerakkan secara halus selama 5 menit.
7. Cuci gel dengan gerakan halus dengan 100 ml 3 % asam asetat dan selanjutnya dengan ultrapure air. Glikoprotein muncul dengan pita yang berwarna magenta.
8. Simpan gel dalam 3 % asam asetat selama 5 menit, dan ulangi langkah ini dua kali

### 3.1.2.2 Karakterisasi kadar

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat biokimiawi glikoprotein lendir hasil isolasi yaitu: kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein (Walker, 1994 ; Sumitro , dkk.,1998). Karakterisasi parameter diatas dilakukan dengan menggunakan “*Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit* “ dari Pierce (No. Cat. 23260) dan metode Biuret secara spektrofotometri. Penentuan kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel dilakukan sebagai berikut :

Disiapkan 3 *eppendorf*, 2 *eppendorf* diisi 0,4 ml glikoprotein *assay buffer* sebagai blanko dan 1 *eppendorf* diisi 16,7  $\mu$ l sampel lendir dan diencerkan sampai volume 0,4 ml dengan pelarut glikoprotein *assay buffer*. Kemudian masing - masing *eppendorf* ditambahkan 0,2 ml Kalium Periodat 10 mM, dihomogenkan dengan vortex, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya masing - masing *eppendorf* di tambahkan 0,6 ml glikoprotein detection reagent 0,5%, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV- Vis pada  $\lambda$  maks. 550 nm dan diulangi 3 kali.

Kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel diperoleh dengan membandingkan dengan larutan standar proteinnya, menggunakan rumus :

$$\text{Glikoprotein(mg/ml)} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times C_{\text{protein(mg/ml)}} \times \text{pengenceran}$$

$$\text{Karbohidrat (mg/ml)} = \text{Kandungan glikoprotein} \times \% \text{ total karbohidrat standar}$$

Penentuan Protein menggunakan metode Biuret diawali dengan pembuatan kurva standar BSA (Lampiran 3.4). Preparasi pengukuran protein dari sampel dilakukan sebagai berikut :

Kandungan protein lendir ditentukan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 mL sampel lendir ditambah 1 mL larutan standar BSA 5000 ppm dan 4 mL reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV - VIS pada  $\lambda$  maksimum yaitu 550 nm. Sebagai blanko dipipei 1,5 mL air dan ditambah 4 mL reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali. Kandungan

protein diperoleh dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA, menurut Hamilton, (1992) menggunakan rumus :

$$Y = aX \quad , \quad X = \frac{Y}{a} \quad \text{di mana } X = \text{konsentrasi total protein}$$

### **3.1.2.3. Karakterisasi Ahasin Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Dengan Enzim *N-glycanase***

Proses deglikosilasi terhadap molekul Ahasin dilakukan menurut metode Tufsiani (200). Enzim N-glicanase yang dipakai adalah PNGaseF (No.cat. E-5006, produk Genzyme corporation).

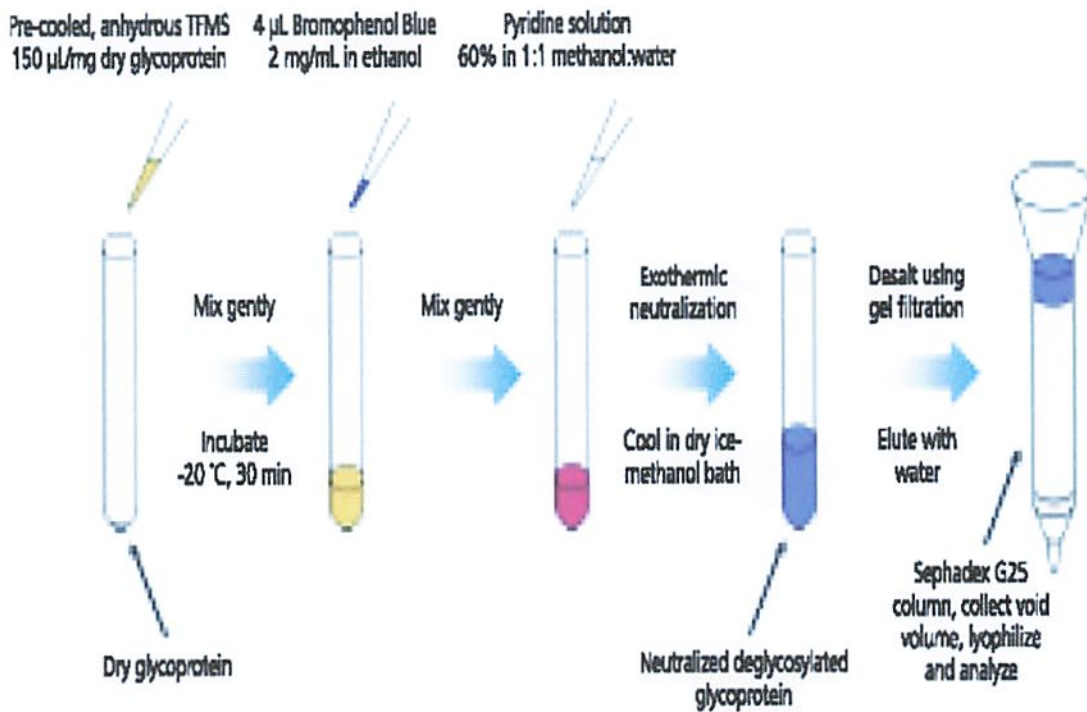
#### **Prosedur Deglikosilasi Enzimatis**

##### **Alat dan Bahan :**

1. 250 mM buffer fosfat pH 7,5
2. 2,5 uL SDS 2%
3. 1 M 2-merkaptotanol
4. 2.5 uL Triton -X 100 15 % (v/v)
5. larutan PNGase F

##### ***PROSEDUR***

1. Masukkan 200 ug glikoprotein sampel ke dalam tabung eppendorf. buat volume akhir menjadi 35 uL dengan air (akuades steril)
2. Tambahkan 10 uL dari 250 mM buffer fosfat pH 7,5 dan 2,5 ul. SDS 2% dengan 1 M 2-merkaptotanol
3. Panaskan pada 100 °C selama lima menit, bila perlu tambah waktu inkubasi sekurang – kurangnya 24 jam
4. Dinginkan. tambah 2.5 uL Triton -X 100 15 % (v/v) dan campur hingga merata
5. Tambahkan 2.0 uL larutan PNGase F ke dalam reaksi, inkubasi selama tiga jam pada 37°C
6. Running SDS PAGE untuk melihat hasilnya



### 3.1.5 Uji aktivitas achasin sebagai antibakteri terhadap viabilitas Bakteri *Porphyromonas endodontalis*

#### 3.1.5.1 Pemiakan Bakteri

##### Bahan yang dibutuhkan:

Media untuk pertumbuhan

Ground beef 500,0 gram

Air distilasi 1 l

1N NaOH 25.0 ml

Trypticase (BD211921),30.0g

Yeast extract,5.0 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  5.0 g

0,025 % Resazurin 4.0 ml

Agar (dibutuhkan untuk media padat) 20.0 g

Cystein HCL  $\text{H}_2\text{O}$  0,5 g

Larutan Hemin, 10.0 ml

Larutan Vit K<sub>1</sub>, 0,2 ml

Etanol 90 % 30.0

1N NaOH, 1.0ml

Air distilasi 100.0 ml

Persiapan bahan

1. Campur daging cacah (*ground beef*), air dan NaOH, kemudian panaskan hingga mendidih sambil diaduk. Dinginkan pada temperatur ruang, buang lemak pada permukaan dan saring, serta sisakan partikel daging serta hasil filtrasi. Untuk menyaringnya tambahkan air distilasi secukupnya sampai mencapai 1l.
2. Pada hasil filtrasi tambahkan :  
30g Trypticase (BD211921) + 5 g Yeast extract, + 5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.025 % Resazurin 4 ml dan Agar (opsional) 20.0 g yang telah dididihkan dan didinginkan didalam medium N<sub>2</sub> 80%,H<sub>2</sub> 10 %,CO<sub>2</sub> 10% dan tambahkan Cystein HCL H<sub>2</sub>O 0,5 g + Larutan Hemin, 10 ml serta tambahkan Larutan Vit K<sub>1</sub> 0,2 ml.
3. Larutan Vit K<sub>1</sub> 0,2 ml. Larutan Vit K<sub>1</sub>, dibuat sebagai berikut Vit K<sub>1</sub> 0,15 ml + Etanol 95 % 30 (simpan larutan dalam botol berwarna coklat dalam lemari es dan buang sesudah sebulan)
4. Atur Media sehingga pH akhir mencapai 7. Secara anaerobik masukkan 7 ml medium kedalam tube yang berisi partikel daging (1 bagian daging kedalam 5 bagian cairan) dibawah fase gas (fase anaerob).
5. Larutan Hemin:  
Hemin 50 mg + 1 N NaOH 1 ml add to 100 ml kemudian autoklaf pada 121 °C selama 15 menit.

Kondisi :

Temperatur 37 °C

Atmosfer : campuran gas anaerobik N<sub>2</sub> 80%,H<sub>2</sub> 10 %,CO<sub>2</sub> 10%

Prosedur Pemiakan Bakteri:

1. Kondisikan jar untuk menumbuhkan bakteri dalam suasana anaerob dengan menggunakan Anaerocult dan anaerotest:

- ↓ Basahi zona reaksi pada Anaerotest (Cat. No. 113829) dengan setetes air distilasi dan talikan ketab dari plate basket (Cat. No. 107040). Zona reaksi dari strip Anaerotest harus tergantung bebas di ruang udara (gb1). Tempatkan plate basket pada jar anaerob.
  - ↓ Secara perlahan-lahan tuangkan 35 ml air diatas kertas khusus pada Anaerocult.A selama 15-20 detik, pegang sehorizontal mungkin dan tuangkan dengan silinder pengukur menyentuh kertas khusus (gb2)
  - ↓ Tempatkan Anaerocult A yang basah dalam anaerobik jar segera dengan sisi cetakan menghadap plate (gb3)
  - ↓ Segera tutup secara rapat (gb 4)
2. Buka vial
  3. Dibawah kondisi anaerob, ambil 0,5 ml kaldu yang direkomendasikan dari single test tube (5-6 ml) dan rehidrasi seluruh isi vial.
  4. Transfer aliquot secara aseptikal kedalam tube kaldu. A slant dan a pre-reduced *blood plate* juga diinokulasi dengan 0,1 ml suspensi sel. *blood plate* anaerobik juga di streaked untuk mengontrol kemurniannya.
  5. Inkubasi tube dan plate dibawah kondisi anaerob pada 37 °C. Inkubasi blood plate secara anaerob pada 37 °C.
  6. Dalam 3-4 hari, pertumbuhan seharusnya tampak dengan kekeruhan pada kaldu. Pada permukaan kadar, koloni muncul setelah 72 jam dengan munculnya pigmen hitam dengan pertambahan masa inkubasi. Tidak ada pertumbuhan terjadi pada blood agar plate yang diinkubasi secara aerobik.

### 3.1.5.2 Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar nutrien

Pengujian aktivitas dimaksudkan untuk mendapatkan isolat murni yang dengan aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri diuji pada setiap tahapan mulai dari lendir hasil isolasi, hasil presipitasi etanol, achasin hasil pemurnian kolom kromatografi, serta achasin dengan kadar bervariasi. Metode yang dipakai adalah metode sumuran. Semua uji dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

Spesies bakteri gram positif *anaerob Porphyromonas endodontalis* dibenihkan dalam medium *modified chopped meat*, diperiksa dengan menggunakan metode

sumuran/*papper dish* steril sebagai berikut: bakteri *porphyromonas* sebanyak 5 ml dibiakkan pada medium *modified chopped meat* (pH 7,0) 37°C selama 3-4 hari. Sebanyak 10 µl bakteri disuspensikan dalam 990 µl *modified chopped meat*, di *sacker* semalam dalam suhu 37°C hingga tercampur rata. Setelah semalam diinkubasi diambil 1 µl dan dimasukkan dalam 999 µl media *modified chopped meat*. Bakteri yang tersuspensi inilah yang digunakan sebagai stok kultur bakteri uji. Sebanyak 100 ml diusapkan pada medium agar padat *modified chopped meat* agar yang dibuat dengan ketebalan 3 cm, dan beberapa lubang dibuat pada medium padat tersebut. Lubang diisi dengan ahasin sebanyak 50 µl yang dihasilkan dari lendir, fraksi larut air, fraksi presipitasi etanol dan hasil pemurnian dengan menggunakan kromatografi penukar ion. Sesudah inkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C, *growth inhibitory circle* ditemukan disekitar sampel yang dilubangi untuk sampel yang positif, sementara tidak ada margin yang jelas pada sampel yang negatif. Aktivitas ditunjukkan dengan mengukur lebar *growth-inhibitory* dengan margin jelas di sekitar lubang.

### 3.1.5.3 Uji dilusi untuk menentukan MIC

Selain dilakukan uji aktivitas dengan uji difusi agar nutrien untuk mengetahui bahwa glikoprotein yang dihasilkan masih stabil, dan mampu mematikan kuman, juga dilakukan uji *dilution* dengan metode dilusi untuk mengetahui *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC).

Protein stok yang dimiliki di cairkan terlebih dahulu dan diambil 200 µg dan diencerkan sampai menjadi 1 ml dengan bufer yang akan dipakai yaitu *Phosphate Buffered Saline* (PBS) merupakan larutan kerja untuk masing-masing obat berisi 200 µg. Disiapkan 10 *clear, cotton plugged* bebas kuman atau tabung tertutup 13 x 100mm dan tandai dari 1 sampai 10. Menggunakan teknik yang aseptik pipet 0,5 ml cairan pengencer kedalam tabung 2 sampai tabung 10 atau sebanyak obat yang akan dites. Ditambahkan 0,5 ml dari larutan kerja 200 µg/ml (karena sudah diencerkan) pada tabung 1 dan 2. campur dari tabung kedua dengan baik dan ambil 0,5 ml masukkan ke tabung 3. campur lagi dengan baik ditabung 3 dan ambil 0,5 ml pidahkan ke tabung 4 terus sampai tabung 9 dan buang 0,5 ml dari tabung 9. tabung

ke 10 tidak ada obat dan berfungsi sebagai kontrol. Digunakan pipet terpisah pada masing2 pemindahan untuk menghindari apapun terbawa. Pada semua tabung tambahkan 0,5 ml dari *inokulum* kira2  $10^5$  sampai  $10^6$  volume akhir menjadi 1 ml. Inkubasi pada  $35^{\circ}\text{C}$ , tabung harus diinkubasi selama kita perlukan untuk mengontrol tabung menunjukkan kekeruhan. Biasanya 12-18 jam adalah optimal. Konsentrasi paling rendah dari obat (achasin) dan tidak menunjukkan pertumbuhan dikatakan sebagai MIC dan diekspresikan sebagai microgram (unit)/mililiter.

#### 3.1.5.4. Uji Tem

##### Prosedur Pengujian dengan TEM

##### Bahan yang digunakan:

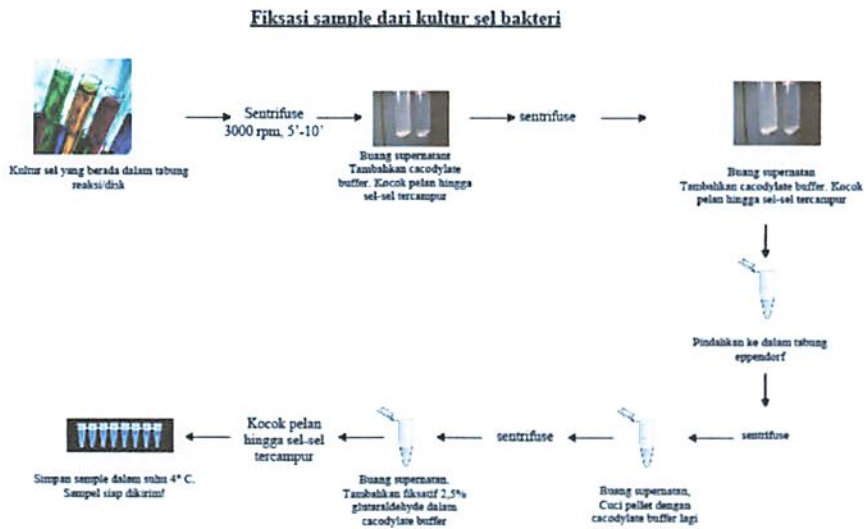
- larutan fiksatif 2,5% glutaraldehyde dalam cacodylate buffer  $\pm$  7 ml beserta 0,1 M cacodylate buffer+3% sucrose  $\pm$  15 ml. **Semua larutan dimasukkan kedalam kulkas** (suhu  $4^{\circ}\text{C}$ ), untuk menjaga agar larutan tsb tidak cepat rusak.
- Cacodylate buffer digunakan untuk mencuci kultur sel sebelum dimasukkan ke dalam larutan fiksatif. Setiap sample gunakan 1,5 ml saja supaya muat di tabung eppendorf.
- Untuk larutan fiksatifnya, gunakan 1 ml saja
- Untuk pengiriman sample. karena sample-sample tsb harus dalam keadaan dingin, gunakan saja dry ice/ice pack.
- Untuk membikin blok dari sample kultur sel kami membutuhkan **minimal 50  $\mu\text{l}$  pellet sel/ sample**.

##### Pengujian dilakukan dengan cara-cara sebagai berikut:

1. Sampel bakteri sebanyak 100 ul bakteri bisa langsung di fiksasi.
2. Sampel-sampel bakteri anaerob yg telah diberi perlakuan disentrifuse untuk diambil peletnya (minimal 100 ul).
3. Pelet tersebut dicuci dengan CACODYLATE buffer tiga kali. kemudian waktu mencuci dengan cacodylate sebaiknya dilakukan dalam waktu yang cepat (waktu sentrifuse 3-5 menit) supaya bakteri2nya tdk banyak yang berubah.
4. Setelah dicuci baru dimasukkan larutan fiksatif glutaraldehyde didalam cacodylate buffer.



## Fiksasi sample dari kultur sel bakteri



## 3.2 Hasil Penelitian

Bagian ini akan memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang relevan dengan tujuan pada penelitian tahap II. Penyajian data penelitian ditampilkan dalam bentuk foto atau gambar, tabel dan grafik yang sesuai dengan rancangan penelitian.

### 3.2.1 Isolasi & Purifikasi & Karakterisasi Glikoprotein (Ahasin) bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa

Karakterisasi Glikoprotein ahasin bertujuan untuk memperoleh data biokimiawi baik secara pengecatan maupun kandungan protein, karbohidrat dan glikoproteinnya. Lendir dari bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa yang digunakan sebagai sumber untuk melakukan koleksi Ahasin sebagaimana tertera pada gambar 3.2.1



Gambar 3.2.1.1 Profil lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa setelah di stimulasi dengan *elektrik shock*.

Pengambilan sampel dari lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac lokal, dilakukan dengan cara merangsang permukaan bekicot dengan menggunakan *elektrik shock* pada tegangan listrik 5-10 Volt, selama 30-60 detik. Lendir ditampung atau dikumpulkan untuk kemudian dilakukan purifikasi, dengan Etanol absolut, kromatografi penukar ion dan SDS-PAGE.

3.2 Hasil Penelitian

Berikut ini akan disajikan hasil penelitian dan analisis hasil penelitian yang relevan dengan tujuan pada penelitian tahap II. Pengujian data penelitian ditunjukkan dalam bentuk foto atau gambar tabel dan grafik yang sesuai dengan rancangan penelitian.

3.2.1 Isolasi & Purifikasi & Karakterisasi Glikoprotein (Achasin) bekicot *Lachnospira fulva* Ferussac galur Jawa

Karakterisasi Glikoprotein achasin bekicot bertujuan untuk memperoleh data biofarmasi baik secara pengujian maupun kandungan protein. Karakterisasi dan pengujian ini terdiri dari beberapa aspek, yaitu Ferussac galur Jawa yang digunakan sebagai sumber untuk melakukan koloni Achasin sebagaimana tertera pada gambar 3.2.1



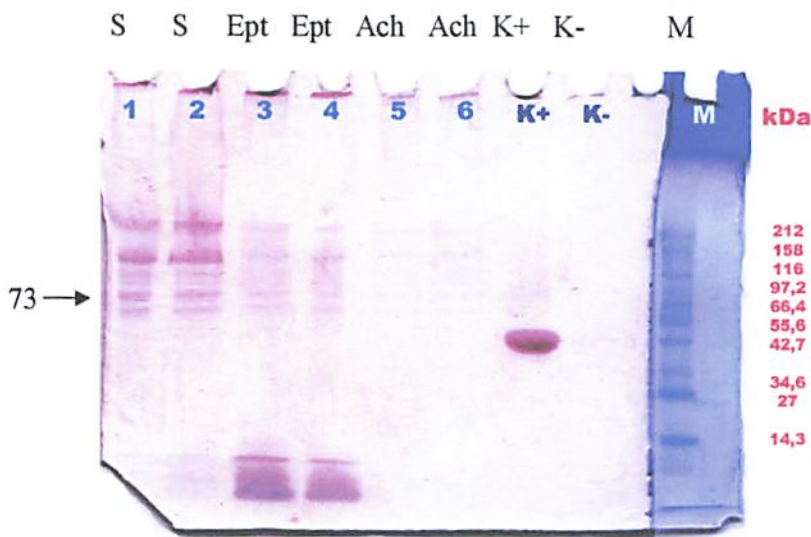
Gambar 3.2.1. Petri dish kultur bekicot *Lachnospira fulva* Ferussac galur Jawa setelah di stimulasi dengan listrik shock.

Pengambilan sampel dari kultur bekicot *Lachnospira fulva* Ferussac lokal dilakukan dengan cara menampung permukaan bekicot dengan menggunakan elatir shock pada tegangan listrik 2-10 Volt selama 30-60 detik. Untuk dimampatkan, disuspensikan untuk kemudian dilakukan purifikasi dengan TBS dan absed. Kromatografi protein ion dan SDS-PAGE

### 3.2.2 Karakterisasi Biokimiawi Glikoprotein

#### 3.2.2.1 Karakterisasi glikoprotein dengan pewarnaan

Penentuan Berat molekul achasin dari pita-pita glikoprotein yang terkandung dalam lendir hasil purifikasi dilakukan dengan metode pengecatan menggunakan "GelCode Glycoprotein Staining Kit" dari Pierce (No. Cat. 24562). Pada gambar (3.2.2) dibawah ini adalah hasil dari pewarnaan glikoprotein sebelum dan setelah dipurifikasi.. Pewarnaan dilakukan baik pada supernatan lendir, pada lendir hasil purifikasi dengan etanol yang menghasilkan etanol presipitasi, maupun lendir setelah dipurifikasi dengan etanol, kromatografi penukar ion dan SDS-PAGE.



Gambar 3.2.2.1 Pita Glikoprotein dari Achasin Hasil SDS-PAGE 12 %

Keterangan: S : supernatan dari sampel lendir  
 Ept : Presipitasi dari etanol  
 Ach: Sampel Achasin hasil pemurnian dengan Kromatografi penukar ion dan SDS-PAGE

Dari pewarnaan yang dilakukan bisa diukur panjang pita (*band*), maupun panjang gelnya untuk dilakukan perhitungan dengan menggunakan regresi linier sehingga didapatkan hasil glikoprotein dengan berat molekul tertentu.

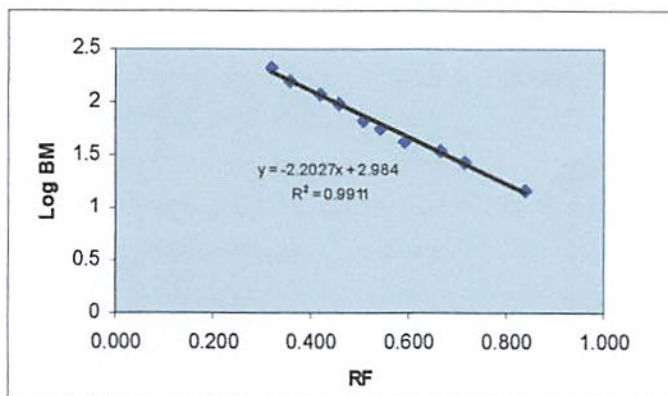
Hasil pengukuran yang diperoleh disajikan pada Tabel 3.2.1.1 di bawah ini.

**Tabel 3.2.1.1 Nilai Pengukuran Gel Hasil SDS-PSGE**

Jarak	Rf	BM (Y KDa)	BM (Y Da)	Log Y (Da)
2.6	0.321	212	212000	2.326
2.9	0.358	158	158000	2.198
3.4	0.420	116	116000	2.064
3.7	0.457	97.6	97600	1.989
4.1	0.506	66.4	66400	1.822
4.4	0.543	55.6	55600	1.745
4.8	0.593	42.7	42700	1.63
5.4	0.667	34.6	34600	1.539
5.8	0.716	27.2	27200	1.434
6.8	0.840	14.3	14300	1.155
		<b>log Y Da (y=-2,2027x + 2,984)</b>	<b>Antilog y BM Da</b>	<b>BM kDa</b>
4.1	0.506	1.8691	73970	73.970

Panjang Gel = 81 mm

Hasil pengukuran yang dilakukan didapatkan beberapa band. Berdasarkan hasil pengukuran gambar dari gel ini maka dapat ditentukan berat molekulnya dengan menggunakan persamaan regresi  $Y = a + bx$ , dengan menggunakan data jarak dan Rf. Hasil perhitungan dengan menggunakan SPSS didapatkan hasil sebagai berikut : Kurva dibawah ini menunjukkan linieritas suatu data sebelum disubstitusikan ke dalam rumus regresi (Gb 3.2.2.2).



**Gambar 3.2.2.2 Kurva Fit Hasil Pengukuran SDS-PAGE**

Persamaan regresi yang didapatkan adalah  $Y = -2.984 x + 2.2027$  (di mana Y = Berat Molekul, X = Konsentrasi/penampakan band). Dengan melakukan substitusi nilai jarak pengamatan (*band* yang tampak) pada persamaan regresi yang didapatkan dan

mengambil nilai antilog, maka akan didapatkan nilai prediksi untuk  $Y$ . Dari hasil pengamatan didapatkan *band* dominan yang akan diprediksi dengan menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh di atas. Hasil prediksi adalah dengan mensubstitusikan jarak pita pengamatan  $x_1$  pada persamaan tersebut untuk mendapat  $Y_1$  yang kemudian ditransformasi dengan menggunakan antilogaritma untuk mendapatkan berat molekul prediksi (kDa). Hasil prediksi menunjukkan bahwa Berat molekul dari pita yang ada tersebut adalah 73,970 kDa.

### 3.2.2.2 Karakterisasi Kadar glikoprotein

Karakterisasi biokimiawi tidak hanya dilakukan melalui pewarnaan tetapi juga dilakukan terhadap kadar. Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat biokimiawi glikoprotein lendir hasil isolasi yaitu: kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein (Walker, 1994 ; Sumitro , dkk.,1998), dengan menggunakan “*Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit* “ dari Pierce (No. Cat. 23260) dan metode Biuret secara spektrofotometri. Hasil dari karakterisasi kadar dapat dilihat pada tabel 3.2.1.2 di bawah ini.

Tabel 3.2.1.2 Karakter Biokimiawi lendir total dan achasin

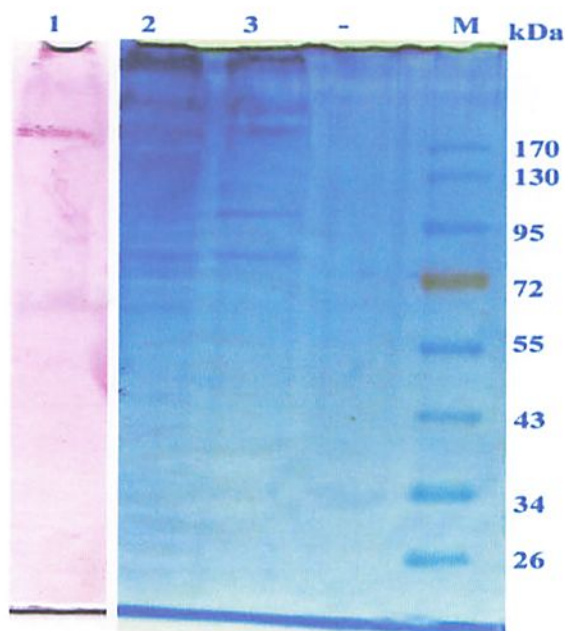
Rataan kandungan dalam Lendir	Total Lendir	Achasin	Metode
Glikoprotein	23,820 ± 7,249	10,960 ± 2,112	Metode PAS
Karbohidrat	9,862 ± 3,001	4,537 ± 0,876	Metode PAS
Protein	13,958 ± 4,248	6,420 ± 1,242	Metode Biuret
Berat Molekul Relatif (kDa)	Ada 5 pita	106,557 ± 44,519	SDS-PAGE dengan pewarna PAS

Pengukuran glikoprotein dan karbohidrat didasarkan pada prinsip bahwa glikoprotein dioksidasi oleh Kalium Perodat ( $KIO_4$ ) menjadi aldehida. Selanjutnya aldehid akan dideteksi dengan menggunakan reagen PAS. sedang kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Biuret.

### 3.2.2.3. Karakterisasi Ahasin Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Dengan Enzim *N-glycanase*

Proses deglikosilasi terhadap molekul Ahasin dilakukan menurut metode Tufsiani (2000). Proses deglikosilasi merupakan metode kimia yang sudah diperbaiki digambarkan untuk memisahkan karbohidrat dari glikoprotein dengan menggunakan Enzim *N-glycanase* yang dipakai adalah PNGaseF (No.cat. E-5006, produk Genzyme corporation). Pemotongan terjadi pada rantai karbohidrat yang terikat pada rantai polipeptida molekul ahasin, khususnya yang terikat melalui ikatan *N-linked Oligosaccharide*. Hasilnya molekul Ahasin terdeglisosilasi.

#### Hasil SDS PAGE



**Gambar 3.2.2.3 Hasil Deglikosilasi enzimatis**

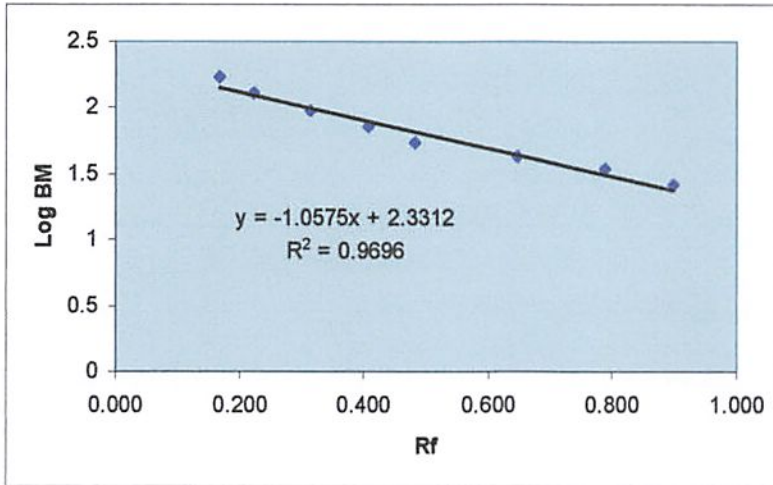
#### Keterangan:

1 = Hasil isolasi glikoprotein yang diwarnai dengan pewarnaan *Glikoprotein*

2 = Hasil isolasi glikoprotein yang diwarnai dengan *Commasie Brilliant Blue*

3 = Hasil deglikosilasi enzimatis yang diwarnai dengan *Commasie Brilliant Blue*

M = *Marker*

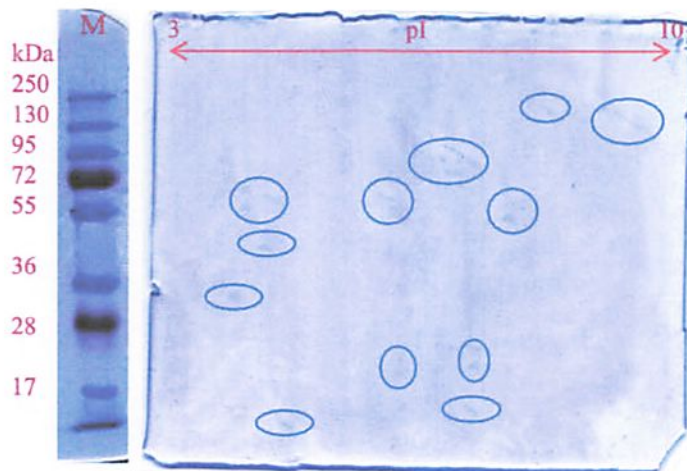


**Gambar 3.2.2.4 Kurva Fit Hasil Pengukuran SDS-PAGE**

### 3.2.3. Hasil Elektrofocusing

Konfirmasi Penyusunan Protein achasin berdasarkan point isoelectric (pI)

Dari hasil 2D elektroforesis diperoleh gambaran bahwa protein achasin tersusun atas beberapa spot ( fraksi) polipeptida dengan pH isoelektrik yang berbeda, yaitu disekitar misalnya pH 5 – 6 seperti pada Gambar dibawah ini.



**Gambar 3.2.3.1 Hasil Elektrofocusing**



Two Dimension Polyacrylanide Gel Electrophoresis (2D-PAGE) berguna untuk menganalisa protein dari sumber yang berbeda dan sel pada kondisi kultur yang berbeda, juga untuk polipeptida-polipeptida dalam satu sel. Sistem 2D-PAGE juga umum dipakai untuk mendeteksi protein yang mengalami substitusi, terhidrolissi partial, hal ini mengingat karena kejadian-kejadian akan merubah susunan asma amino dan selanjutnya akan memberikan gambaran perubahan titik isoelektik dari protein. Melalui sistem 2D-PAGE ini dapat digunakan memperjelas apabila protein tersebut akan digunakan sebagai vaksinasi karena akan memberikan keuntungan dalam hal spektrum yang luas Untuk melengkapi karakter protein achasin dapat dilakukan sekuens asam amino untuk mengetahui gen penyandi protein achasin tersebut.

#### **3.2.4 Aktivitas achasin sebagai antibakteri terhadap viabilitas Bakteri *Porphyromonas endodontalis***

Pengujian aktivitas dimaksudkan untuk mendapatkan isolat murni yang dengan aktivitas antibakteri. Spesies dibiakkan dalam medium *modified chopped meat*. Media untuk pertumbuhan terdiri dari campuran Ground beef 500,0 gram. Air distilasi 1 l, 1N NaOH 25.0 ml, Trypticase (BD211921),30.0g, Yeast extract,5.0 g. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.0 g, 0,025 %, dan Resazurin 4.0 ml. Dan media padat yang merupakan campuran Agar (dibutuhkan untuk media padat) 20.0 g, Cystein HCL H<sub>2</sub>O 0.5 g. Larutan Hemin, 10.0 ml Larutan Vit K1, 0.2 ml, Etanol 90 % 30.0, 1N NaOH. 1.0ml dan Air distilasi 100.0 ml. Pembenihan berhasil menumbuhkan bakteri gram positif *anaerob Porphyromonas endodontalis* seperti pada gambaran bakteri dibawah :

#### 3.2.4.1. Pembenuhan Bakteri Bakteri gram positif *anaerob Porphyromonas endodontalis*



Pengujian aktivitas bakteri anaerob tidak cukup sukses, karena sebelum pengujian dengan glikoprotein bakteri tidak bisa bertahan hidup. Peneliti mencoba melakukan pembenuhan sebagaimana gambar diatas bisa hidup tidak begitu lama. Kendala ini yang menyebabkan peneliti belum bisa menyajikan uji aktivitas tersebut.

### 3.3 Diskusi dan Kesimpulan

Penelitian ini dilakukan dalam upaya untuk membuktikan dugaan adanya faktor antibakteri yang terkandung dalam glikoprotein yang diisolasi dari lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac isolat lokal (Galur Jawa). Untuk dapat menggambarkan secara detail target yang diharapkan maka penelitian dilakukan beberapa tahap. Karakterisasi yang dilakukannya sebelumnya adalah merupakan karakterisasi terhadap Berat molekul protein. Pada tahap berikut ini dilakukan karakterisasi biokimiawi terhadap molekul glikoprotein yaitu mengukur kandungan



glikoprotein, protein dan karbohidrat serta penentuan berat molekul dengan metode elektroforesis satu dimensi. Dari karakterisasi yang dilakukan sebelumnya dengan SDS-Poliakrilamide Gel Electrophoresis didapatkan BM 71 kDa dengan pewarnaan protein.

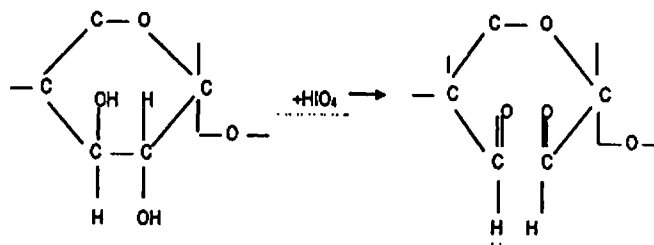
Penentuan berat molekul glikoprotein dilakukan pada achasin hasil purifikasi dengan kromatografi penukar ion, dengan metode elektroforesis SDS-PAGE menggunakan pewarnaan glikoprotein dari Pierce co. (No. Cat. 24562). Prinsip pewarnaan glikoprotein adalah terjadinya oksidasi karbohidrat yang terikat melalui ikatan proteoglikan di dalam glikoprotein menjadi aldehid dan dapat terwarnai berupa pita berwarna merah muda. Didapatkan 5 pita pada protein total dan 4 pita pada Achasin hasil purifikasi. Pita pertama mempunyai BM 177,732 kDa, pita kedua 114,659 kDa, pita ketiga 101,163 kDa, pita keempat 73,970 kDa dan pita kelima adalah 55,263 kDa. Munculnya lima pita tersebut kemungkinan masih terikutnya protein lain yang tidak tampak pada pewarnaan protein sebelumnya. Namun demikian dari beberapa pita yang ada pita dengan BM 73 kDa diharapkan merupakan pita glikoprotein yang sesuai dengan protein yang diharapkan sebagai antibakteri.

Penemuan ini membuktikan bahwa lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac isolat lokal (Galur Jawa) adalah suatu glikoprotein BM 71-73 kDa dengan pewarnaan protein dan karbohidrat. Sedikit berbeda dengan lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac *Giant African* temuan Iguchi, 1981 yaitu suatu glikoprotein dengan BM 70-80 kDa dengan pengecatan protein dan karbohidrat.

Pengukuran glikoprotein dan karbohidrat mempunyai prinsip bahwa glikoprotein dioksidasi oleh kalium periodat menjadi aldehid. Aldehid ini akan dideteksi menggunakan reagen deteksi glikoprotein yaitu pereaksi dari Pierce (no. kat 23260). Reagen deteksi glikoprotein memberikan warna ungu dengan aldehid dan mempunyai absorbansi maksimum pada  $\lambda$  550 nm. Absorbansi pada  $\lambda$  550 nm sebanding dengan persentase komponen karbohidrat dalam glikoprotein. Hal ini dapat dibuktikan bahwa pada protein yang tidak mengandung karbohidrat seperti *lysozyme* dan BSA (pada standar) memberikan absorbansi rendah pada  $\lambda$  550 nm.).

Glikoprotein dalam sampel dapat dideteksi melalui reaksi PAS (*Periodic Acid Schiff*) yaitu suatu reaksi yang didasarkan pada efek oksidatif asam periodat

(HIO<sub>4</sub>) pada gugus 1,2 - glikol di dalam residu karbohidrat yang menghasilkan gugus aldehid, dan dimana reaksinya dapat dituliskan sebagai berikut :



gugus 1,2- glikol pada glukosa

gugus aldehid

#### Reaksi PAS (*Periodic Acid Schiff*)

Isolat *glikoprotein* Achasin mengandung karbohidrat sebesar  $4,537 \pm 0,876$ . Kandungan senyawa karbohidrat yang terukur dalam sampel menunjukkan bahwa di dalam sampel tersebut mengandung glikoprotein. Kandungan karbohidrat pada glikoprotein sangat penting dalam hal pengenalan antar sel, dimana karbohidrat tersebut terikat pada rantai polipeptida melalui *N-linked* dan *O-linked oligosaccharide*. *N-linked oligosaccharide* merupakan bentukan *bi-*; *tri-* dan *tetra antennary*, sehingga berat molekul karbohidrat ini bisa mencapai 40 % dari total berat molekul glikoprotein. Komposisi 40 % karbohidrat dan 60 % protein ini memang terbukti pada lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac isolat lokal (Galur Jawa) yaitu  $4,537 \pm 0,876$  karbohidrat dan  $6,420 \pm 1,242$  untuk protein.

Glikosilasi suatu modifikasi post translasional yang paling umum dari protein sel eukariotik. Glikoprotein ini berperan sangat luas pada fungsi biologi seperti reseptor binding, signaling sel, immune recognition, dan pathogenesis. Pada tahap penelitian ini rantai karbohidrat yang terikat melalui *N-linked Oligosaccharida* pada rantai polipeptida achasin dipotong secara enzimatis dengan menggunakan *N-glikanase*. Mammalian glycoproteins mempunyai 3 tipe utama *Oligosaccharides (glycans)*: *N-linked*, *O-linked* and *glycosylphosphatidylinositol (GPI) lipid anchors*. *N-linked glycans* melekat pada *protein backbone* melalui ikatan amide pada asparagine residue pada *Asn-Xaa-Ser/Thr* motif, dimana X dapat merupakan amino acid, kecuali Pro. *O-linked glycans linked* melalui hydroxyl group dari serine or threonine. Variasi pada tingkat saturasi tertentu pada sisi glikosilasi yang ada

linked glycans dari glikoprotein mengeliminasi heterogenitas, dan juga memperbaiki atau mengurangi *blood clearance rate* dan/atau potensi glikoprotein sebagai obat. Meskipun sisi *N-glycosylation* potential dapat diramalkan dari konsensus sequence Asn-Xaa-Ser/Thr, tidak dapat diperkurakan bahwa sisi tersebut dapat di deglikosilasi. Oleh karena itu sisi perlekatan glicans harus diidentifikasi dan dikarakterisasi melalui prosedur analitik. *Peptide-N-glycosidase F (PNGase F)* enzymes yang banyak digunakan secara luas untuk deglycosylation of glycoproteins. Enzim tersebut melepas *asparagine-linked (N-linked) oligosaccharides* dari glycoproteins and glycopeptides. Tripeptide dengan glycan-linked asparagine sebagai residu central adalah substrate minimal untuk *PNGase F*. glycan dapat merupakan *high-mannose*, type hybrid or complex. Tetapi, N-glycans dengan fucose linked  $\alpha$ 1,3 pada Asn-bound N-acetylglucosamine sangat resisten to aksi PNGase F.

Pengujian aktivitas antibakteri tidak berjalan dengan sukses karena Bakteri anaerob *Porphyromonas endodontalis* sangat sensitif. Sesudah dilakukan perbenihan bakteri tiba-tiba mati. Peneliti melakukannya sampai tiga kali dan peneliti akan mencoba lagi untuk keberhasilan penelitian ini namun dana sudah tidak cukup.

Two Dimension Polyacrylanide Gel Electrophoresis (2D-PAGE) berguna untuk menganalisa protein dari sumber yang berbeda dan sel pada kondisi kultur yang berbeda, juga untuk polipeptida-polipeptida dalam satu sel. Sistem 2D-PAGE juga umum dipakai untuk mendeteksi protein yang mengalami substitusi, terhidrolissi partial, hal ini mengingat karena kejadian-kejadian akan merubah susunan asma amino dan selanjutnya akan memberikan gambaran perubahan titik isoelektik dari protein. Melalui sistem 2D-PAGE ini dapat digunakan memperjelas apabila protein tersebut akan digunakan sebagai vaksinasi karena akan memberikan keuntungan dalam hal spektrum yang luas Untuk melengkapi karakter protein achasin dapat dilakukan sekuens asam amino untuk mengetahui gen penyandi protein achasin tersebut. Asam amino yang membentuk protein, mungkin positif, negatif, netral atau polar di alam. Protein diatas PI membawa muatan negatif dan dibawah PI membawa muatan positif.

Pembuatan achasin sebagai obat (formulasi obat) sedang dalam proses. Hal ini disebabkan proses menghasilkan protein yang terkarakterisasi cukup lama

## BAB IV

### RENCANA KERJA PENELITIAN TAHUN ANGGARAN 2007

Rencana kerja penelitian Tahap III yaitu tahun anggaran 2007 adalah sebagai berikut:

1. Lanjutan purifikasi dan karakterisasi achasin
2. Analisis Ultrastruktur Bakteri *Phorphyromonas endodontalis* dengan TEM
3. Karakterisasi Biokimiawi (Pengecatan Glikoprotein, Karakterisasi kadar, Deglikosilasi)
4. Uji Elektrofocusing
5. Uji fisikokimia dan stabilitas protein achasin
6. Formulasi obat

### JADWAL PELAKSANAAN PENELITIAN

No	Kegiatan Dan Penanggungjawabnya	Bulan									
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Isolasi lendir bekicot <i>achatina fullica</i> ferussac galur jawa	x	x								
2	Purifikasi dan karakterisasi dengan SDS-PAGE		x	x	x						
3	Karakterisasi Biokimiawi Achasin Karakterisasi dengan pengecatan			x	x						
4	Karakterisasi Kadar				x	x					
5	Deglikosilasi glikoprotein					x	x				
6	Uji Elektrofocusing						x	x			
7	Analisis Ultrastruktur Bakteri dg TEM							x	x		
8	Formulasi obat								x	x	x
	Penulisan Laporan akhir									x	x

## BAB V

### KEGIATAN PENUNJANG PENELITIAN

#### 1. Pembagian tugas antar peneliti utama, peneliti dan teknisi

No	Personal penelitian	Tugas dalam penelitian
1	Peneliti Utama	Koordinasi dengan seluruh tim peneliti Isolasi achasin, electroforesis, Pembuatan Inokulum, Uji Mikrobiologi (uji aktivitas, uji MIC) Pembuatan laporan Menyelenggarakan pertemuan mingguan untuk seluruh anggota peneliti dan teknisi
2	Peneliti I	Isolasi, Purifikasi dan karakterisasi Protein achasin Karakterisasi Biokimiawi, karakterisasi pengecatan, karakterisasi kadar Interpretasi hasil penelitian Menghadiri pertemuan mingguan
3	Peneliti II	Deglikosilasi, electrofocusing Interpretasi hasil penelitian Menghadiri pertemuan mingguan
4	Teknisi I	Penanganan isolasi achasin, electroforesis Menghadiri pertemuan mingguan
5	Teknisi II	Membantu persiapan untuk perlakuan bakteri Menghadiri pertemuan mingguan
6	Teknisi III	Mempersiapkan alat dan bahan penelitian Menghadiri pertemuan mingguan

#### 2. Pengisian Logbook

Logbook diisi masing-masing peneliti. Seluruh kegiatan penelitian dikerjakan oleh tiap peneliti dicatat pada logbook lengkap dengan tanggal kegiatan.



**RINCIAN PENELITIAN RUT XII TAHUN 2007**

No	Pelaksana	Jumlah Biaya (Rp)
1	Peneliti Utama	18.060.000
2	Peneliti	18.060.000
3	Teknisi	20.640.000
		48391200
4	Bahan 40.16 %	41766400
5	Perjalanan 9.13 %	9495200
6	Lain-lain 4.18 %	4347200

**1. Gaji dan Upah :**

No	Pelaksana	Jumlah Pelaksana	Honor Jam/Minggu	Biaya
1	Peneliti Utama	1	30/43	18.060.000
2	Peneliti Anggota	2	15/43	18.060.000
3	Teknisi	3	20/43	20.640.000
				56.760.000

**2. Alat dan Bahan****LEMBAR B: RINCIAN PERTANGGUNGJAWABAN KEUANGAN RUT**

No	JENIS PENGELUARAN DAN PENERIMA	VOLUME	NO BUKTI PENGELUARAN	JUMLAH (Rp)
1	Gaji dan Upah			48391200
2	Bahan			
	Bekicot	1000 biji@ 1500	No1	1.500.000
	Sepharose DEAE Anion Exchager		No2	1.632.000
	Glycine 1kg	Mei	No3	1.480.000
	Ethanol Absolut	2.5 l Februari	No4	270.000
	Marker Protein (Fermentas003)	Februari	No5	1.265.000
	Acetik acid Glacial	2.5l @360.000	No7	720.000
	Temed	10 µl	No8	803.700
	Iodo Acetamid	5 g	No9	395.000
	Tris (hydroxymetil)-aminome than 1x500 gr Cat.8382	500g	No10	1.256.000

	Bakteri Porphyromonas endodontalis (ATCC)	Februari	No11	9,500,000
	Media Tumbuh Bakteri		No12	3274000
	Metanol	2,5l @ 235000	No13	470,000

No	JENIS PENGELUARAN DAN PENERIMA	VOLUME	NO BUKTI PENGELUARAN	JUMLAH (Rp)
	UltraPure TM Acrylamide Cat no 15512-023	500 g	No14	5,156,156
	Selophan (Tabung dialisis)	200cm@ 3000	No15	600.000
	Gloves	1 Pak	No16	31.250
	Comassie Blue R 250	25 gr	No17	850,000
	Marker Protein 4038	20 µl@ 10.000	No18	200,000
	Aquabides	105 l @ 3500	No19	367,500
	Bahan analisis Elektrofocusing Ampholyte pH 3,5-4 & 6-10 HPO4 Urea	1 kit 1 kit 1 kit	No20	3.000.000 600.000 250,000
	Vitamin K1	250 gr	No21	369,000
	Resazurin	1 gr	No22	425000
	Hemin	1 gr	No23	440000
	Dialysis Tubing Closure (23/8/07)	1(5EA)	No24	954000
	Dialysis Tubing Cellulose membrane( 16/8/07)	1(50ft)	No25	1584000
	Temed 87689 (14/9/07)	1(100 ml)	No26	500850
	Coomasie Brilliant Blue (R250)	1(25 g)	No27	981750
	Bahan deglikosilasi	1 paket	No 28	3521813

### 3. Perjalanan

3.	<b>Perjalanan Surabaya – Jakarta</b> - Lumpsum Gol III - Transport	21 Maret	NO: 1	1.040.000 1.170.000
	<b>Yogyakarta-Surabaya</b> - Lumpsum Gol III - Transport	Maret	NO:2	780.000 140.000

	<b>Surabaya-Yogyakarta-</b> <b>- Lumpsum Gol III</b> <b>- Transport</b>	<b>Maret</b>	<b>NO:3</b>	<b>560,000</b> <b>140,000</b>
	<b>Surabaya-Yogyakarta-</b> <b>- Lumpsum Gol III</b> <b>- Transport</b>	<b>Mei</b>	<b>No:4</b>	<b>560,000</b> <b>140,000</b>
	<b>Surabaya-Yogyakarta-</b> <b>- Lumpsum Gol III</b> <b>- Transport</b>	<b>Juni</b>	<b>No:5</b>	<b>560,000</b> <b>140,000</b>
	<b>Surabaya-Malang</b> <b>- Lumpsum Gol III</b> <b>- Transport</b>	<b>Juli</b>	<b>No: 6</b>	<b>560,000</b> <b>100,000</b>

#### 4. Lain-lain Pengeluaran (Administrasi, Publikasi dan Opera-sional):

<b>4</b>	<b>Lain-lain</b>			
	* Administrasi:Beaya administrasi lembaga, pengiriman, staff administrasi	Mei	NO : 1	2,100,000
	Sewa Alat			675.000
	ATK	Mei	NO : 1	270.000

#### 5. Jumlah anggaran Tahun III

<b>Jumlah (Rp.)</b>	<b>Rp. 104.768.000,-</b>
<b>Terbilang</b>	<b>Seratus empat juta tujuh ratus enam puluh delapan ribu</b>

## BAB VI PENUTUP

Puji Syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunianya yang telah dilimpahkan kepada saya sehingga dapat menyelesaikan penulisan laporan Penelitian Tahun ke III ini sesuai dengan yang diharapkan, walaupun sangat disadari begitu banyak kekurangan. Penuh harapan agar hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di bidang Kesehatan atau secara lebih khusus pengembangan obat dengan bahan baku lokal.

Ungkapan rasa terima kasih yang tidak terhingga kami ucapkan kepada Kementerian Riset dan Teknologi maupun pihak lain yang telah menyediakan sarana penelitian, baik dana, penyelenggara seleksi dan evaluasi, fasilitas dan lain-lain yang memungkinkan terlaksananya penelitian ini.

Surabaya, 24 Nopember 2008

Peneliti Utama ,



Mengetahui  
Lembaga Penelitian  
Universitas Airlangga

Prof.Dr.H.Sarmanu, MS

NIP : 130 675 835

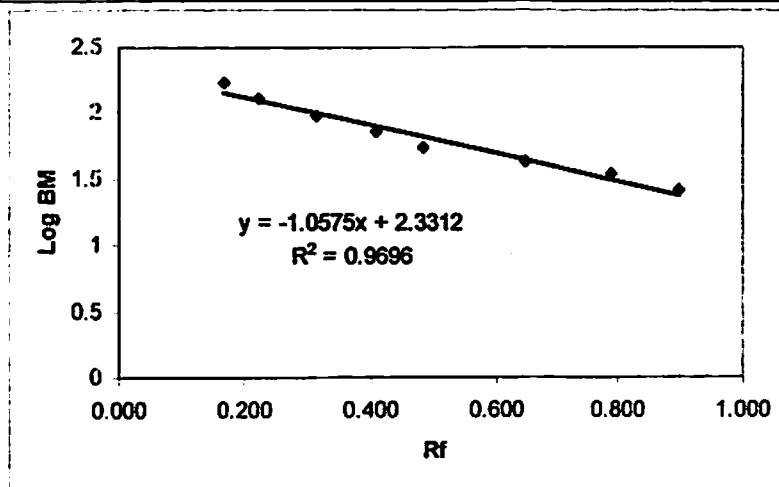
Dr. Titiek Berniyanti, drg.,MKes

NIP : 131 381 459

## Perhitungan BM

**Tabel 3.2.1.3 Nilai Pengukuran Gel Hasil SDS-PSGE Marker**

a	b	Rf	Log BM	BM
1.8	10.8	0.167	2.23	170
2.4	10.8	0.222	2.114	130
3.4	10.8	0.315	1.978	95
4.4	10.8	0.407	1.857	72
5.2	10.8	0.481	1.74	55
7	10.8	0.648	1.633	43
8.5	10.8	0.787	1.531	34
9.7	10.8	0.898	1.415	26



**Gambar 3.2.2.4 Kurva Fit Hasil Pengukuran SDS-PAGE**

Sampel	a	b	Rf	Log BM	BM
1	1.6	10.8	0.15	2.175	149.6
2	0.3	10.8	0.03	2.302	200.4
	1.1	10.8	0.10	2.223	167.1
	1.6	10.8	0.15	2.175	149.6
	2.2	10.8	0.20	2.116	130.6
	4	10.8	0.37	1.940	87.1
3	0.3	10.8	0.03	2.302	200.4
	1.1	10.8	0.10	2.223	167.1
	1.6	10.8	0.15	2.175	149.6
	3.1	10.8	0.29	2.028	106.6
	4	10.8	0.37	1.940	87.1