

TESIS

STUDI TENTANG EFEK PENGHAMBATAN
FASA AIR DAN FRAKSI ETANOL DAUN GANDARUSA
(*Justicia gendarussa* Burm. f.)
TERHADAP AKTIVITAS HYALURONIDASE

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



DWIRINI KARTIKASARI
NIM. 090214772 M

PROGRAM STUDI ILMU BIOLOGI REPRODUKSI

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005



TESIS

STUDI TENTANG EFEK PENGHAMBATAN FASA AIR DAN FRAKSI ETANOL DAUN GANDARUSA (*Justicia gendarussa* *Burm. f.*) TERHADAP AKTIVITAS HYALURONIDASE

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

Oleh :

**DWIRINI KARTIKASARI
NIM. 090214772 M**

PROGRAM STUDI ILMU BIOLOGI REPRODUKSI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**STUDI TENTANG EFEK PENGHAMBATAN
FASA AIR DAN FRAKSI ETANOL DAUN GANDARUSA
(*Justicia gendarussa* Burm. f.)
TERHADAP AKTIVITAS HYALURONIDASE**

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**DWIRINI KARTIKASARI
NIM. 090214772 M**

**PROGRAM STUDI ILMU BIOLOGI REPRODUKSI
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DJUJI
TANGGAL 28 MARET 2005

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Bambang Prajogo Eko Wardoyo, drs. Apt., MS.

NIP. 131 470 993

Pembimbing



Tri Agus Siswoyo, M. Agr., PhD.

NIP. 132 207 406

Mengetahui,
Ketua Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Puji Srianto, M.Kes., drh.

NIP. 131 570 349

Telah diuji pada
Tanggal 28 Maret 2005

PANITIA PENGUJI TESIS,

Ketua : Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS.

Anggota : 1. Dr. Bambang Prajogo E.W., drs.Apt., MS.
2. Tri Agus Siswoyo, M.Agr., Ph.D.
3. Dr. Djoko Agus Purwanto, drs.Apt., MS.
4. Setyawati Sigit, drh., MS.
5. Dr. Pudji Srianto, M.Kes., drh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allaah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Bambang Prajogo Eko Wardoyo, drs.Apt., MS., Pembimbing Ketua dan Pimpinan “Proyck Gandarusa” yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan bimbingan, masukan, saran, dan dorongan semangat demi terselesaikannya tesis ini dengan sebaik-baiknya.

Terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MSc., Pembimbing dan Tri Agus Siswoyo, M.Agr., Ph.D., Pembimbing Pengganti yang dengan penuh perhatian dan kesabaran tanpa kenal lelah telah membimbing, memberi masukan, saran, dan dorongan semangat mulai pelaksanaan penelitian sampai akhir penulisan tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Magister yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- o Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Dr. Med. Puruhito, dr. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.
- o Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr. atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

- Rekan-rekan di Yayasan Pendidikan Cendekia Utama : Dewan Pengurus, Dewan Pembina, Dewan Pengawas dan Badan Pengurus Harian YPCU yang selalu mendukung saya dalam mengikuti program Magister.
- Rektor Universitas Dr. Soetomo Surabaya Prof. Dr. Santoso S. Hamidjojo, MSc., Ph.D., Dekan Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo yang hingga pertengahan pendidikan dijabat oleh Ir. Didik Budiyo, MP yang kemudian dijabat oleh Ir. Agus Sutoyo, MSi. atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.
- Suami tercinta R. Goenarto Mardanoes, anak-anak terkasih mutiara-mutiara jiwa Ahmad Amin Abdulqohhar Hudiyo dan Nisrina Nurul Jannati, dan Ibu mertua tersayang RAy. Soclastris Soewondo, atas dorongan moril maupun materiil penuh kasih yang tak putus-putus.
- Ibu terkasih Sukarti Thamrin dan Adik Trimartono Agung Siswantoro serta Mas dr. Agus Purwantoro dan Mbak Masluchah beserta keponakan-keponakan tersayang (Ibrahim, Ilajar, Sarah, Khadijah, dan Fathimah) atas segala dorongan dan do'a penuh sayang.
- Sahabat saya Sri Lestari Utami, dan rekan-rekan seangkatan IBR 2002 Indra Wirawan, Erma Savitri, Gracia Angelina, dan Wiwik Kusmawati atas dorongan yang dibcrikan agar saya segera menyelesaikan tesis ini.
- Mas Agung dan Mbak Wiwik dan keponakan-keponakan (Ricky, Tia dan Shinta), Mbak Rosa dan Mas Ipung sekeluarga yang telah membantu sarana dan prasarana dalam menyelesaikan tugas di Jember.
- Rekan-rekan di Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo, kawan-kawan di PuslitBiomol Universitas Jember, dan semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas segala dorongan dan bantuan baik moril maupun materiil

Hanya Allah SWT dengan limpahan Rahmat dan Ridlo-Nya, yang dapat membalas segala apa yang telah anda sekalian lakukan untuk saya.

RINGKASAN

STUDI TENTANG EFEK PENGHAMBATAN FASA AIR DAN FRAKSI ETANOL DAUN GANDARUSA (*Justicia gendarussa* Burm. f.) TERHADAP AKTIVITAS HYALURONIDASE

Dwirini Kartikasari

Keluarga Berencana merupakan salah satu program andalan pemerintah Indonesia dalam menekan laju pertumbuhan penduduk. Pelaksanaan program KB diarahkan pada penggunaan alat kontrasepsi, yang sampai saat ini masih mayoritas diperuntukkan bagi kaum wanita, sehingga perlu dikembangkan metode kontrasepsi baru bagi pria agar pria dapat ikut lebih bertanggung jawab dalam pengaturan perencanaan keluarga.

Kontrasepsi baik hormonal maupun non- hormonal banyak digali dan dikembangkan lebih lanjut dalam rangka mewujudkan adanya "pil pria". Diantara kontrasepsi non-hormonal ini adalah ramuan-ramuan yang digunakan oleh suku-suku bangsa tertentu (etno-medisin), seperti penggunaan tumbuhan *gossypol* dalam ramuan obat Cina yang ternyata kemudian terbukti mempunyai efek samping yang toksik dan sifat reversibilitasnya masih diragukan sehingga tidak dapat dijadikan sebagai pilihan kontrasepsi yang ideal.

Dari hasil studi eksplorasi di pedalaman Irian Jaya, diketahui adanya dua tanaman yang digunakan penduduk setempat untuk menjarangkan kelahiran, yaitu *Endospermum mollucanum* Becc. dan *Justicia gendarussa* Burm. f. dan dari kedua tanaman tersebut hanya *J. gendarussa* yang khusus diberikan kepada pria.

Di antara banyak penelitian yang mengarah pada potensi khasiat gandarusa sebagai kontrasepsi pria, terdapat beberapa penelitian yang mengarah pada efek hambatan gandarusa pada fungsi spermatozoa dalam proses fertilisasi ovum. Fertilisasi ini terutama terkait dengan penetrasi spermatozoa ke dalam ovum yang akan merangsang dimulainya perkembangan embrio. Untuk melakukan penetrasi ini, spermatozoa harus dapat menembus lapisan sel-sel folikuler yang tertanam dalam matriks ekstraseluler di sekeliling ovum yang disebut kumulus oophorus, yang kaya akan senyawa asam hyaluronat. Oleh karenanya akrosom spermatozoa akan mengeluarkan enzim hyaluronidase yang akan melonggarkan lapisan sel folikuler barrier spermatozoa tersebut, sehingga apabila enzim ini tidak ada atau tidak berfungsi maupun terhambat aktivitasnya, maka fertilisasi pun tidak akan terjadi.

Beberapa penelitian yang sudah dilakukan terkait efek gandarusa pada proses fertilisasi antara lain pada pemberian gandarusa akan menyebabkan adanya penurunan daya dispersi kumulus oophorus manusia *in vitro*, menurunkan aktivitas akrosin dan β -glukosidase kelinci, fraksi polifenolnya diketahui bersifat inhibitor hyaluronidase pada kumulus oophorus mencit *in vitro* dan secara kualitatif bersifat inhibitor hyaluronidase testis sapi.

Flavonoid, antara lain flavon, flavanol dan *chalcone* memiliki kemampuan untuk menghambat hyaluronidase. Penyelidikan juga menunjukkan bahwa bahan-bahan tersebut bertindak sebagai inhibitor kompetitif terhadap aktivitas hyaluronidase. Apigenin merupakan salah satu flavonoid yang dapat bertindak sebagai inhibitor aktivitas hyaluronidase dengan mekanisme inhibisi kompetitif. Gendarusin A yang merupakan turunan dari apigenin diharapkan juga mempunyai aktivitas inhibisi kompetitif terhadap hyaluronidase. Studi bioaktivitas bahan ini telah dilakukan, seperti adanya penurunan aktivitas hyaluronidase spermatozoa pada mencit.

Berkaitan dengan pengaruhnya pada fungsi penetrasi spermatozoa, maka fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa dapat dijadikan sebagai model untuk mempelajari hubungan senyawa flavonoid dengan kemampuan penetrasi spermatozoa dalam proses fertilisasi yang berupa penurunan aktivitas hyaluronidase testis sapi.

Dari hasil penelitian yang diperoleh, dapat dilihat bahwa baik fasa air maupun fraksi etanol dari daun gandarusa, seperti juga apigenin dan hesperidin mempunyai efek menghambat aktivitas hyaluronidase testis sapi, dan dari hasil Uji Kinetika dengan pemetaan kebalikan ganda data kecepatan enzim, dapat diketahui bahwa tipe penghambatannya adalah kompetitif reversibel, yang menandakan bahwa fasa air daun gandarusa dari segi enzimatis memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan kontrasepsi.

SUMMARY

THE STUDY OF INHIBITION EFFECT OF WATER FASA AND ETHANOL FRACTION OF GANDARUSA (*Justicia gendarussa* Burm.f.) TO HYALURONIDASE ACTIVITY

Dwirini Kartikasari

Birth control is one of the Indonesian government mainstay program for pressing the rate of the population growth. Until now this program is more resemble to the use of the contraception for the women, so it's necessary to develop a new contraceptive method for the men so that they can more responsible in the role of family planning.

Such hormonal or non-hormonal contraception discovered and resembled for more in the framework to give shape to "man's pill". Among the non-hormonal contraception is the ingredients used in the certain ethnic group (ethnomedicine), like the use of gossypol in Chinese potion that appears proven to have toxic side-effect and a hesitant reversibility so that it can not be chosen to be an ideal contraception. From the result of exploration study in Papua, there were two plant that used by the local people for space birth, *Endospermum moluccanum* Becc. And *Justicia gendarussa* Burm. f. and only *J. gendarussa* that specially given to the men.

Among the studies that aim at the potency of gandarusa special virtue as men contraception, there is several studies that resemble to the obstacle effect of gandarusa at the function of spermatozoa in the fertilization, particularly related with the penetration of the spermatozoa into the ovum that stimulate initiation of embryo development. To do the penetration, spermatozoa has to break through follicular cells into extracellular matrix around the ovum that calls cumulus oophorus, enrich with hyaluronic acid, therefore the acrosom of spermatozoa produce hyaluronidase that will mitigate follicular cells, so that if the enzyme doesn't exist or being malfunction or even have impeded activity, fertilization won't occur.

Several studies of the gandarusa effects to the fertilization showing the decrease of human cumulus oophorus dispersion *in vitro*, reduce the rabbit acrosin and β -glucosidase activity, the polyphenol fraction nature was hyaluronidase inhibitor at the mice cumulus oophorus *in vitro* and qualitatively hyaluronidase bovine testes inhibitor.

Flavonoid, such as flavon, flavanol, and chalcone have ability to block hyaluronidase. Studies also prove that such material act as competitive inhibitor to the hyaluronidase activity. Apigenin is one of the flavonoid that can be hyaluronidase activity competitive inhibitor. Gendarusin-A, the apigenin derivate is also expect to have hyaluronidase competitive obstruction.

Bioactivity study for this material has been done, like the decline of mice spermatozoa hyaluronidase activity.

And related to the influence of spermatozoa penetrating function, water fasa and ethanol fraction of gandarusa leaves can be a model for studying the relationship between flavonoid and the spermatozoa penetrating capability in the fertilization in the form of the descent of bovine testes hyaluronidase activity.

The result was showing that both water fasa and ethanol fraction from gandarusa leaves, like apigenin and hesperidin too, have impeded bovine testes hyaluronidase activity, and the result of double reciprocal kinetics analysis of enzyme rate data was showing that the impeded type was reversible competitive, indicating that gandarusa can be used as a contraceptive material, from enzymatically point of view.

ABSTRACT

THE STUDY OF INHIBITION EFFECT OF WATER FASA AND ETHANOL FRACTION OF GANDARUSA (*Justicia gendarussa* Burm.f.) TO HYALURONIDASE ACTIVITY

Dwirini Kartikasari

Flavonoid have ability to block hyaluronidase and proven to act as competitive inhibitor to the hyaluronidase activity. Apigenin is one of the flavonoid that can be hyaluronidase activity competitive inhibitor. Gendarusin-A as the apigenin derivate, is also expect to have hyaluronidase competitive obstruction. And the objective of this study was to find out the inhibition of water fasa and ethanol fraction of gandarusa leaves to hyaluronidase activity.

The first step of the study was identifying bovine testes hyaluronidase from Sigma with SDS-PAGE, and the result was showing that the bovine testes hyaluronidase from Sigma had many protein bands, and to eliminate the unwanted protein it was precipitated with ammonium sulfate and then desalted with dialyze membrane.

The second step was measuring both crude and desalted hyaluronidase activity with Morgan-Elson method, and the result showed that desalted hyaluronidase had a higher specific activity than the crude one.

The third step was the treatment of water fasa and ethanol fraction of gandarusa to the desalted hyaluronidase, and was being compared with apigenin and hesperidin. The result was showing a decline of hyaluronidase activity along with the increase of water fasa and ethanol fraction dose. And the result of double reciprocal kinetics analysis of enzyme rate data was showing that the impeded type was reversible competitive, indicating that gandarusa was enzymatically able to fulfill the term to be used as a contraceptive material.

Keywords : enzyme activity inhibition, bovine testes hyaluronidase, water fasa and ethanol fraction of gandarusa leaves

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	viii
Summary	x
Abstract	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Lampiran	xviii
Daftar Singkatan	xx
Bab 1 PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
Bab 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan tentang <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.	
2.1.1. Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2. Morfologi Tanaman	7
2.1.3. Penyebaran dan Tempat Tumbuh	8
2.1.4. Kandungan dan Kegunaan Tanaman	8
2.1.5. Penelitian yang telah dilakukan	10
2.2. Tinjauan tentang Flavonoid	11
2.3. Preparasi <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.	13
2.4. Tinjauan tentang Spermatozoa dan Ovum	14
2.5. Tinjauan tentang Fertilisasi	16
2.6. Tinjauan tentang Hyaluronidase	
2.6.1. Tinjauan Umum tentang Enzim	18
2.6.2. Enzim Hyaluronidase	19
2.6.3. Klasifikasi dan Nomenklatur Hyaluronidase	20
2.6.4. Sifat-sifat Enzimatis Hyaluronidase	20

2.6.5. Keberadaan Hyaluronidase pada Hewan dan Manusia	21
2.6.6. Fungsi Biologis	22
2.6.7. Reaksi dan Spesifitas Hyaluronidase	24
2.7. Tinjauan tentang Purifikasi Enzim Hyaluronidase	25
2.8. Tinjauan tentang Pengukuran Aktivitas Enzim Hyaluronidase	26
2.9. Konsep Perkiraan Peranan Hyaluronidase dalam Fertilisasi Mamalia	31
2.10. Tinjauan tentang Inhibitor Enzim Hyaluronidase	31
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1. Landasan Teori	36
3.2. Hipotesis Penelitian	38
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1. Rancangan Penelitian	42
4.2. Sampel, Banyak Replikasi dan Teknik Pengambilan Sampel	43
4.2.1. Sampel	43
4.2.2. Banyak Replikasi	43
4.2.3. Teknik Pengambilan Sampel	43
4.3. Variabel Penelitian	44
4.4. Bahan Penelitian	44
4.4.1. Bahan Tanaman	44
4.4.2. Enzim Hyaluronidase	44
4.4.3. Bahan Kimia	45
4.5. Instrumen Penelitian	45
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	45
4.7. Prosedur Pengumpulan Data	46
4.7.1. Ekstraksi Daun Gandarusa	46
4.7.2. Purifikasi Parsial Enzim Hyaluronidase Testis Sapi	46
4.7.3. Karakterisasi Parsial Hyaluronidase Testis Sapi	47
4.7.4. Penentuan Efek dan Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase	47
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1. Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Gandarusa	52
5.2. Hasil Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase	52
5.2.1. Pembuatan Kurva Standar	52
5.2.2. Hasil Optimasi Panjang Gelombang Spektrofotometer dan Waktu Inkubasi	54
5.3. Hasil Purifikasi Parsial Hyaluronidase Testis Sapi (Sigma)	55
5.4. Hasil Karakterisasi Parsial Hyaluronidase	57
5.5. Hasil Pengukuran Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase	58
5.6. Hasil Uji Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase	60

BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1. Ekstraksi dan Fraksinasi Dun Gandarusa	61
6.2. Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase	62
6.3. Optimasi Panjang Gelombang Spektrofotometer dan Waktu Inkubasi	64
6.4. Purifikasi Parsial Hyaluronidase	64
6.5. Karakterisasi Parsial Hyaluronidase	66
6.6. Pengukuran Efek dan Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase	67
BAB 7 PENUTUP	
7.1. Kesimpulan	69
7.2. Saran	69

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1. Metode Pengujian Aktivitas Hyaluronidase dengan Reaksi Warna	29
Tabel 2.2. Metode Pengujian Aktivitas Hyaluronidase dengan Spektrofotometri	29
Tabel 5.1. Berat hasil ekstraksi daun Gandarusa	52
Tabel 5.2. Data pengukuran absorbansi Glukosamin N-asetat	53
Tabel 5.3. Data hasil perhitungan aktivitas dan aktivitas spesifik hyaluronidase testis sapi sebelum dan sesudah purifikasi parsial	56
Tabel 5.4. Data kinetik hyaluronidase sebelum dan sesudah purifikasi parsial	57
Tabel 5.5. Data pengukuran absorbansi pada λ 585 nm	59
Tabel 5.6. Data kinetik (nilai K_m dan V_{maks}) hyaluronidase testis sapi dengan beberapa inhibitor	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Tanaman gendarusa (<i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.)	7
Gambar 2.2. Struktur kimia apigenin	9
Gambar 2.3. Struktur kimia Gendarusin A dan B	9
Gambar 2.4. Struktur kimia asam hyaluronat	16
Gambar 2.5. Grafik Lineweaver–Burk tentang penghambatan kompetitif	33
Gambar 2.6. Grafik Lineweaver–Burk tentang penghambatan nonkompetitif	34
Gambar 2.7. Struktur kimia hesperidin	35
Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual	39
Gambar 3.2. Bagan Kerangka Operasional	40
Gambar 3.3. Pohon Penelitian tentang <i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.	41
Gambar 4.1. Kerangka kerja	49
Gambar 4.2. Skema ekstraksi dan fraksinasi daun gendarusa	50
Gambar 4.2. Diagram alir pengukuran aktivitas enzim dengan metode Morgan-Elson	51
Gambar 5.1. Kurva standar Glukosamin N-asetat	53
Gambar 5.2. <i>Scanning</i> panjang gelombang spektrofotometer λ 520 – 600	54
Gambar 5.3. Pengukuran absorbansi pada rentang waktu inkubasi 0 – 120'	55
Gambar 5.4. SDS-PAGE electrograph hasil dialisa hyaluronidase	55
Gambar 5.5. Plot Lineweaver – Burk hyaluronidase (Sigma) sebelum dan sesudah purifikasi parsial	57
Gambar 5.6. Pengukuran absorbansi pada rentang suhu 27 – 45°C	58
Gambar 5.7. Pengukuran absorbansi pada rentang pH 6 - 8	58
Gambar 5.8. Grafik penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dan fraksi etanol gendarusa, apigenin dan hesperidin	59
Gambar 5.3. Grafik uji tipe penghambatan aktivitas hyaluronidase	60

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Penentuan Kadar Total Protein Terlarut	75
Lampiran 2. Optimasi panjang gelombang Spektrofotometer pada pengukuran aktivitas hyaluronidase metode Morgan - Elson	76
Lampiran 3. Optimasi waktu inkubasi	77
Lampiran 4. Optimasi pH	78
Lampiran 5. Optimasi suhu inkubasi	79

DAFTAR SINGKATAN

ABS	:	absorbansi	
ATP-ase	:	adenosine 5'-triphosphatase	
cAMP	:	cyclic adenosine monophosphate	
CHCl ₃	:	chloroform	
CPE	:	Corona Penetrating Enzyme	
ECM	:	extracellular matrix	
EDTA	:	ethylene diamine tetra acetic acid	
GAA	:	glacial acetic acid	
GlcNAc	:	<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	
GlcUA	:	glucosamine uronic acid	
HA	:	hyaluronic acid	
HCl	:	hydrogen chloride (chloric acid)	
I	:	inhibitor	
IU	:	International Unit	
IVF	:	<i>in vitro</i> fertilization	
kDa	:	kilo Dalton	
K _m	:	konstanta Michaelis – Menten	
LD ₅₀	:	Lethal Dosage 50 %	
mM	:	mili Molar	
NaCl	:	natrium chloride	
<i>n</i> -butanol	:	normal butil alkohol	
<i>n</i> -heksan	:	normal heksana	
NH ₄ OH	:	ammonium hydroxide	
(NH ₄) ₂ SO ₄	:	ammonium sulphate	
<i>p</i> DMAB	:	<i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyde	
pH	:	power of hydrogen	
<i>po.</i>	:	per oral	
ppm	:	part per million	
rpm	:	rotation per minute	
S	:	substrat	
SDS-PAGE	:	sodium dodecyl sulphate	polyacrylamide gel
		electrophoresis	
U/mg	:	Unit per milligram	
<i>v</i> ₀	:	kecepatan awal	
<i>v</i> _{max}	:	kecepatan maksimum	

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sebagai negara yang tergolong berpenduduk terpadat di dunia, Indonesia telah mengupayakan berbagai cara untuk menekan laju pertumbuhan penduduk, terutama penerapan Program Keluarga Berencana. Dalam program ini, kepada pasangan suami istri, khususnya yang tergolong dalam pasangan usia subur, ditekankan pengertian tentang perlunya ber-KB untuk mensejahterakan keluarga.

Istilah KB dalam pengertian masyarakat awam sering dipahami sebagai alat kontrasepsi yang dipergunakan untuk menjarangkan kehamilan, umumnya diperuntukkan bagi kaum wanita yang meliputi IUD, pil, Norplant, dan perkembangan lebih lanjut meliputi diafragma, *sponge*, *cervical caps*, Depo Provera, detektor ovulasi, kondom wanita, krim/jelli, tablet busa, suppositoria, sterilisasi dan banyak lagi yang lainnya (Albar, 1991, Hatcher *et al.*, 1990)

Metode kontrasepsi yang diperuntukkan bagi kaum pria misalnya sanggam terputus (*coitus interruptus - withdrawal*), kondom dan sterilisasi (*vasectomy*), sedangkan perkembangannya jauh ketinggalan dibandingkan dengan perkembangan kontrasepsi wanita. Hal ini disebabkan banyak faktor yang terkait. Namun demikian sampai saat ini penelitian tentang kontrasepsi pria terus diupayakan untuk menghasilkan suatu metode kontrasepsi yang ideal, dalam arti berdaya guna (dapat dipercaya keberhasilannya dan daya kerjanya dapat diatur sesuai kebutuhan), aman, tidak mahal, nyaman (mudah digunakan,



tidak mengganggu dan dapat diterima oleh pasangan), mudah didapat, efek samping minimal, bersifat reversibel (dapat balik / kembali seperti semula), menghindari pembedahan, dan bisa diterima oleh agama, etika dan latar belakang budaya pemakainya sehingga nantinya si pemakai tidak memerlukan motivasi yang terus menerus untuk menggunakan kontrasepsi tersebut (Prajogo *et al.*, 1999).

Salah satu metode kontrasepsi pria yang diteliti adalah suatu metode kontrasepsi yang bekerja untuk menghambat fertilisasi melalui gangguan mekanisme penetrasi spermatozoa. Seperti diketahui, pada sel telur terdapat 3 lapisan yang mengelilinginya, yaitu (dari luar ke dalam) kumulus ooforus, korona radiata dan zona pelusida. Proses fertilisasi tercapai jika spermatozoa dapat menembus ketiga lapisan sel telur tersebut. Dalam hal ini spermatozoa mempunyai enzim spesifik pada bagian akrosomnya yang mempunyai fungsi spesifik, yaitu hyaluronidase berfungsi untuk membuka matriks kumulus ooforus, *Corona Penetrating Enzyme* (CPE) berperan dalam penetrasi pada lapisan korona radiata dan akrosin yang berperan dalam penetrasi pada daerah zona pelusida. Enzim-enzim tersebut bersifat individual, spesifik dan sinergis atau berurutan kerjanya, jadi apabila enzim hyaluronidase telah bekerja menghidrolisis kumulus ooforus, maka enzim berikutnya akan disekresi. Sebaliknya bila daya kerja enzim hyaluronidase dihambat, tentunya akan menurunkan kemampuan mendispersi kumulus ooforus yang pada akhirnya tidak terjadi penetrasi dan ini merupakan sifat kerja inhibitor enzim hyaluronidase (Zaneveld, 1976).

Beberapa komponen diketahui mempunyai aktivitas inhibitor enzim hyaluronidase, antara lain flavonoid, tanin, hidrangenol dari hidrangea, kurkumin, kumin, *glycyrrhizin* dari *licorice* dan tranilast, sebuah modifikasi kimia asam sinamat. Beberapa bahan tersebut dan derivat sintetisnya selanjutnya digunakan sebagai kontrasepsi dengan kemampuannya untuk menghambat aktivitas hyaluronidase spermatozoa manusia (Mio and Stern, 2002). Apigenin, yang merupakan derivat *benzo- γ -pyrone* (flavonoid), telah dilaporkan sebagai inhibitor kompetitif hyaluronidase (Tung *et al.*, 1994).

Kandungan flavonoid sering diketemukan pada beberapa tanaman, salah satunya dalam gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) yang tergolong suku Acanthaceae. Tanaman ini oleh masyarakat pedalaman Papua telah digunakan sebagai bahan kontrasepsi pria (Moeso and Agus, 1985), dan pada penelitian selanjutnya terbukti mengandung senyawa flavonoid, sterol, β -sitosterol, lupeol, friedelin, iridoid, triterpena, kumarin alkaloid dan amina aromatik sederhana (Prajogo *et al.*, 1997; Chakravarty *et al.*, 1982).

Studi bioaktivitas yang telah dilakukan terkait dengan efek gandarusa pada proses fertilisasi antara lain dapat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa kelinci, mencit dan manusia *in vitro* (Hartati *et al.*, 1997), menurunkan daya dispersi kumulus ooforus manusia *in vitro* (Lestari *et al.*, 1997), menurunkan aktivitas akrosin dan β -glukosidase kelinci (Prajogo *et al.*, 1998^a), dan secara kualitatif mempunyai sifat inhibitor hyaluronidase testis mencit (Prajogo *et al.*, 1998^b). Adanya kandungan senyawa aktif dari golongan flavonoid pada gandarusa (diantaranya disebut sebagai gendarusin A dan B)

dapat mencegah penetrasi spermatozoa mencit pada proses fertilisasi *in vitro* (IVF) serta menunjukkan adanya penurunan aktivitas hyaluronidase tersebut (Prajogo, 2002).

Sebagai kelanjutan penelitian-penelitian di atas, maka dalam penelitian ini akan dikaji adanya efek penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh komponen aktif dalam fasa air dan fraksi etanol gandarusa.

Hyaluronidase dideteksi keberadaannya dengan melakukan pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode kolorimetri Morgan-Elson (Takahashi *et al.*, 2003) dan juga dilakukan karakterisasi enzim. Kemudian hyaluronidase tersebut diperlakukan dengan fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa berbagai konsentrasi untuk mengetahui efek penghambatan aktivitas enzimnya menggunakan asam hyaluronat sebagai substratnya dan apigenin serta hesperidin sebagai pembanding, dimana apigenin dan hesperidin telah terbukti dapat menurunkan aktivitas hyaluronidase spermatozoa mencit dengan tipe penghambatan kompetitif.

1.2. Rumusan Masalah

Dari uraian latar belakang tersebut, timbul masalah sebagai berikut :

1. Benarkah fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa dapat menghambat aktivitas hyaluronidase testis sapi?
2. Bagaimanakah tipe penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini mempunyai tujuan :

1. Tujuan Umum

Mengetahui efek penghambatan dan tipe penghambatan fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa terhadap aktivitas hyaluronidase, yang berperan dalam pencegahan fertilisasi, dan nantinya dapat dipergunakan sebagai titik tolak langkah penggunaan gandarusa untuk bahan kontrasepsi pria.

2. Tujuan Khusus

Mempelajari tentang pengukuran persen penghambatan untuk menentukan adanya pengaruh penghambatan aktivitas hyaluronidase dan pengukuran nilai v_{max} untuk mengetahui tipe penghambatan aktivitas hyaluronidase karena pengaruh fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa

1.4. Manfaat Penelitian

Dengan penelitian ini diharapkan akan dapat diambil manfaat berupa pembuktian ilmiah tanaman obat berdasar etnomedisin, dari kajian tentang adanya pengaruh penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa (*J. gendarussa* Burm.f.) dan tipe penghambatannya, yang mengungkapkan adanya mekanisme kerja kontrasepsi pria pada gangguan fungsi penetrasi spermatozoa dalam tingkatan enzimatis.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang *Justicia gendarussa* Burm.f.

2.1.1. Klasifikasi Tanaman

Menurut Bailey (1963) dan Tjitrosoepomo (1991), klasifikasi tanaman gendarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) adalah sebagai berikut :

Divisi	:	Spermatophyta
Anak Divisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Anak Kelas	:	Sympetalae (Metachlamydeae)
Bangsa	:	Tubiflorae (Solanales, Personatae)
Suku	:	Acanthaceae
Marga	:	<i>Justicia</i>
Jenis	:	<i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.

Sedangkan sinonim, nama daerah, nama asing dan nama simplisia *J. gendarussa* Burm.f. yaitu (Backer and Van den Brink Jr., 1965 ; dan Van Steenis, 1997) :

Sinonim : *Justicia dahona* (Buch) Ham. ; *J. vulgaris* Lour. ; *J. salicina* Vahl. ;
Gendarussa vulgaris Nees

Nama daerah : besi – besi (Sumatera / Aceh) ; gendarusa (Melayu) ; handarusa (Sunda) ; gandarusa, tetesan, trus (Jawa) ; ghandharusa (Madura) ; gandarisa (Bima) ; puli (Maluku / Ternate)

Nama asing : Bo gu dan , chin chiu (bahasa Cina) ; kapanitulot , malabulak (bahasa Tagalog)

Nama Simplisia : Gendarussae Folium (daun gendarusa) ; Gendarussae Radix (akar gendarusa)

Genus *Justicia* meliputi 250 – 300 spesies dengan ciri-ciri yang hampir sama dengan sekitar 30 genus lain dalam suku *Acanthaceae* yang terdiri atas 173 genus. Di antara beberapa jenis / spesies genus *Justicia* selain *Justicia gendarussa*, adalah *J. procumbens*, *J. leptostachya*, *J. magnifica*, *J. carnea*, *J. pohliana*, *J. velutina*, *J. mohintlii*, *J. coccinea*, *J. ghiesbreghtiana* dan *J. lindeni* (Bailey, 1963 ; Tjitrosoepomo, 1991).

2.1.2. Morfologi Tanaman



Gambar 2.1. Tanaman gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.)
(Anonim, 2004)

Gandarusa (*J. gendarussa* Burm.f.) merupakan tanaman setengah perdu yang tumbuh tegak dengan tinggi 0,7 – 2 m, batang berkayu, berbentuk segiempat tumpul atau cukup bulat, dan sering bercabang banyak yang dimulai dari dekat pangkal batang dengan cabang muda berwarna ungu gelap dan mengarah ke warna coklat mengkilat untuk bagian batang tua. Daun tunggal bertangkai pendek (5 – 8 mm) letak berhadapan bersilang, helai daun berbentuk lanset, beringgit lebar dan tidak dalam dengan tepi rata, ujung meruncing dan pangkal berbentuk baji dan pertulangan

menyirip, panjang 5 – 20 cm dan lebar 1 – 3,5 cm berwarna hijau tua. Bunga majemuk kecil putih/dadu, terkumpul dalam rangkaian berupa malai/bulir menguncup sangat sempit, panjang 3 – 12 cm yang tersusun dari anak payung menggarpu yang rata, berambut menyebar dan keluar dari ketiak daun atau ujung tangkai. daun pelindung kecil, sempit, runcing dan hampir sama. Mahkota gundul, tabung pucat, berbintik ungu dengan pinggiran mahkota berbibir dua : bibir bawah bentuk baji hingga bulat telur terbalik dengan tiga taju membulat pendek, putih, pada pangkal ungu, berbintik, dan dengan lipatan miring ; bibir atas segitiga, runcing, putih, berbintik ungu. Tangkai putik gundul 6 –10 mm. Buah berbentuk bulat panjang serupa gada, gundul, dan berbiji 4 (Van Steenis, 1997).

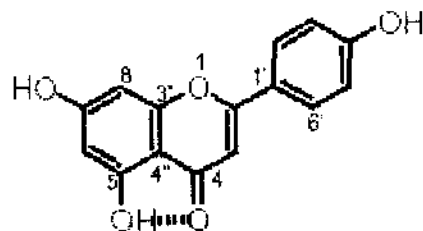
2.1.3. Penyebaran dan Tempat Tumbuh

Tempat tumbuh asal gandarusa tidak diketahui, daerah penyebaran terutama di daerah tropis termasuk Indonesia. Di Jawa terdapat di dataran rendah sampai pada ketinggian 500 m dari permukaan laut. Pada umumnya ditanam sebagai pagar hidup atau tanaman obat dan juga tumbuh liar secara lokal di batas kawasan hutan dan di tanggul sungai (Anonim, 2004).

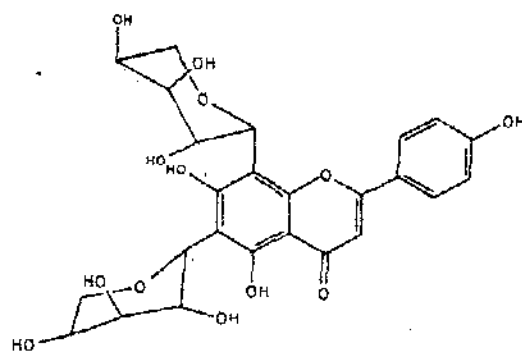
2.1.4. Kandungan dan Kegunaan Tanaman

Kandungan kimia yang terdapat pada tanaman gandarusa ini antara lain steroid, alkaloid, triterpena, iridoid, kumarin dan kalium (Prajogo *et al.*, 2001^b), amina aromatik, β -sitosterol, lupcol, friedelin (Chakravarty *et al.*, 1982; Wahi *et al.*, 1974), justicin, minyak atsiri, dan alkaloid yang agak beracun (Anonim, 2004), dan juga glikosida flavonoid (Prajogo *et al.*, 1989), gendarusin A (6,8-di- α L-arabino piranosil-4',5,7-trihidroksi-flavon) dan gendarusin B (6- α -L-arabino-piranosil-

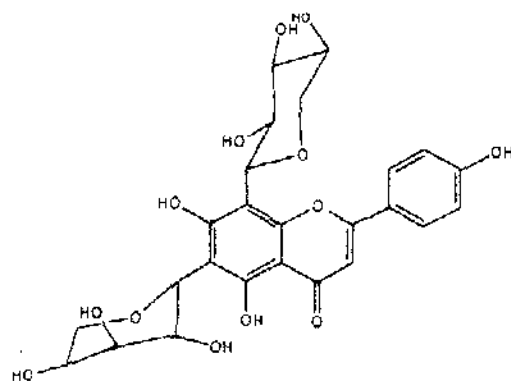
4',5,7 trihidroksi-8- β -D-silanopiranosilflavon) yang merupakan derivat apigenin (4',5,7-trihidroksi-flavon) (Prajogo, 2002).



Gambar 2.2. Struktur Kimia Apigenin (Mio and Stern, 2002)



Gendarusin A



Gendarusin B

Gambar 2.3. Struktur Kimia Gendarusin A dan B (Prajogo, 2003)

Gandarusa sering dipakai sebagai bahan ramuan obat tradisional. Bagian tanaman yang digunakan pada umumnya adalah akar dan daun, baik segar maupun kering. Akar, sebagai obat cupak, upas putih dan malaria. Daun, digunakan sebagai obat encok, sakit kepala, sakit pinggang, bisul, memar, keseleo dan rematik. Juga digunakan untuk mengobati haid tidak teratur atau tidak datang haid, kencing nyeri, demam sakit kuning dan diare. (Siti, 1995). Akar dan daun, sebagai obat kontrasepsi pria dan ramuan ini dibuat dengan merebus akar dan daun gandarusa dan airnya diminum dua kali dalam sebulan (Moeso and Agus, 1985). Kulit kayunya bersifat merangsang muntah (Dalimartha, 1999).

Di samping itu di India digunakan untuk mengobati kelumpuhan otot wajah, eksim, sakit mata, sakit telinga dan emetik. Terkadang juga disebarkan diantara pakaian untuk mencegah masuknya serangga. Sedangkan di Sulawesi Selatan juga digunakan sebagai obat pencahar (Wahi *et al.*, 1974 ; Heyne, 1987).

2.1.5. Penelitian yang Telah Dilakukan

Dari studi aktivitas gandarusa diketahui beberapa fraksi dan infus daun yang diberikan pada mencit dan tikus mempunyai sifat analgetik, menurunkan kadar testosteron dalam serum darah tikus dan mempengaruhi spermatogenesis tikus (Prajogo *et al.*, 1994). Fraksi diklormetana dan metanolnya menghambat spermatogenesis dengan efek penurunan jumlah sel-sel spermatogonium, spermatosit primer, spermatosit sekunder, spermatid dan spermatozoa ; menurunkan motilitas, viabilitas spermatozoa kelinci, mencit dan manusia *in vitro*, serta menurunkan daya dispersi kumulus ooforus manusia *in vitro* (Wahyudi *et al.*, 1997 ; Lestari *et al.*, 1997).

Diketahui pula bahwa ekstrak metanol dapat menghambat penetrasi spermatozoa mencit, menurunkan aktivitas akrosin dan α -glukosidase kelinci

(Prajogo *et al.*, 1997, 1998^a, 1998^b) dan LD₅₀ adalah 180 mg/kg BB mencit *po.* dan termasuk katagori praktis tidak toksik serta tidak ada pengaruhnya pada hati, ginjal dan usus mencit (Prajogo *et al.*, 1999). Secara kualitatif ditunjukkan adanya sifat inhibitor hyaluronidase testis sapi dari fraksi *n*-butanol pada kadar 50 dan 100 ppm, dan juga adanya penghambatan penetrasi spermatozoa mencit pada proses fertilisasi *in vitro* (Prajogo *et al.*, 2002).

Dari beberapa hasil penelitian di atas terlihat bahwa gandarusa dapat memberikan efek analgetik dan merupakan alternatif kontrasepsi pria karena dapat menurunkan kadar testosteron, motilitas dan viabilitas spermatozoa, menghambat spermatogenesis dan kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi pada ovum karena adanya penghambatan aktivitas enzim-enzim pelisis yang berfungsi menembus lapisan-lapisan pelindung ovum. Salah satu enzim pelisis tersebut adalah hyaluronidase yang dihambat oleh senyawa aktif gandarusa dari golongan flavonoid, di antaranya gendarusin A dan B (Reza, 2004).

2.2 Tinjauan tentang Flavonoid

Flavonoid secara umum dapat dideskripsikan sebagai anggota fenol yang terbesar ; mencakup berbagai macam pigmen di antaranya merah, jingga, kuning dan kuning pucat ; terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh ; umumnya terikat pada gula sebagai glikosida dan di antara golongan-golongannya adalah antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavon, khalkon dan auron, flavanon dan isoflavon (Harborne, 1988).

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil sehingga flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol, methanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air dan lain-

lain. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air. Sedangkan aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon dan flavon cenderung lebih mudah larut dalam pelarut non polar seperti eter dan kloroform (Markham, 1988).

Flavonoid mempunyai efek sebagai antiinflamasi, anti alergi, anti viral dan anti pendarahan. Selain itu beberapa penelitian menunjukkan bahwa flavonoid mempunyai kemampuan untuk mempengaruhi aktivitas berbagai macam sistem enzim seperti transport ATPase, protein kinase, nukleotida siklik fosfodiesterase, lipoksigenase dan lain-lain. Dan karena pengaruhnya pada sistem enzim ini maka regulasi dari proses sekretori, kontraktile dan motilitas juga akan terpengaruh (Middleton Jr., 1984).

Flavonoid juga diketahui sebagai inhibitor hyaluronidase. Beberapa penelitian menunjukkan tentang pengaruh beberapa flavonoid pada hyaluronidase baik *in vitro* maupun *in vivo* dan terlihat bahwa flavon, flavanol, dan kalkan bertindak sebagai inhibitor kompetitif (Lauwers and Scharpe, 1997).

Gandarusa mengandung senyawa flavonoid, yaitu gendarusin A yang merupakan senyawa mayor flavonoid dari tanaman ini, dan gendarusin B yang merupakan salah satu senyawa minor ; yang mempunyai khasiat sebagai antifertilitas yaitu mencegah penetrasi spermatozoa dengan menurunkan aktivitas enzim hyaluronidase (Prajogo, 2002).

Standarisasi bahan baku atau simplisia yang berasal dari daerah Mojokerto dihasilkan informasi yang sama dengan Materia Medika Indonesia (MMI). Isolasi flavonoid gandarusa mengandung flavanol-3-glikosida (Prajogo and Pramono, 1989) dan pada ekstrak metanol diketahui mengandung 8 komponen flavonoid dan ditemukan senyawa sterol dalam ekstrak kloroform. Hasil ekstraksi dihasilkan fraksi



n-butanol (1,2%) yang termasuk golongan polifenol dengan kadar flavonoid total 0,9% (Prajogo *et al.*, 1997).

2.3. Preparasi *Justicia gendarussa* Burm.f.

Tanaman ini akan dikeringkan lebih dulu sebelum diekstraksi agar tetap dapat digunakan untuk analisis walaupun telah disimpan dalam jangka waktu yang lama. Hal ini dapat dilakukan pada tumbuhan yang mengandung flavonoid. Pengeringan hanya dilakukan dengan sirkulasi aliran udara yang baik dan tanpa pemanasan pada suhu yang tinggi (pada suhu 30°C dalam oven) (Harborne, 1988).

Bahan-bahan tumbuhan yang sudah kering harus digiling lebih dulu, yang bertujuan agar penetrasi pelarut dalam struktur seluler pada jaringan tumbuhan menjadi lebih mudah, sehingga memudahkan terlarutnya metabolit sekunder dan meningkatkan hasil ekstraksi (Cannel, 1998).

Ekstraksi merupakan istilah yang digunakan dalam farmasetika dan meliputi pemisahan bahan-bahan aktif tumbuhan obat atau jaringan tumbuhan dari komponen-komponen yang tidak aktif atau inert dengan menggunakan pelarut-pelarut tertentu yang terdapat pada prosedur ekstraksi standar. Proses ekstraksi yang paling sederhana akan dikelompokkan sebagai ekstraksi dengan pelarut organik dan ekstraksi dengan pelarut air. Proses-proses pada ekstraksi dengan pelarut organik akan meliputi perkolasi, maserasi dan ekstraksi menggunakan peralatan Soxhlet (Cannel, 1998).

Perkolasi merupakan metode yang paling banyak digunakan pada ekstraksi tumbuhan karena waktu prosesnya yang singkat dan hanya sedikit manipulasi yang dilakukan. Perkolasi menggunakan perkolator yang berupa wadah dari kaca atau logam berbentuk kerucut dengan sumbat pada dasarnya untuk mengatur kecepatan lewatnya pelarut. Sampel perkolasi berukuran ± 3 mm agar lebih efisien dalam

melarutkan metabolit pada tumbuhan dan akan direndam dalam perkolator dengan pelarut selama 24 jam (dapat diulangi hingga 3 kali). Karena flavonoid biasanya merupakan senyawa berpigmen maka eluen yang tidak berwarna lagi merupakan indikasi bahwa ekstraksi metabolit telah selesai (Cannel, 1998)

Maserasi dilakukan dengan memasukkan sampel tumbuhan yang telah dilembutkan ke dalam wadah dari kaca atau besi baja yang tertutup, kemudian struktur seluler tumbuhan ini akan direndam dengan pelarut untuk melarutkan senyawa-senyawa terlarut. Efisiensi dari metode ini dapat ditingkatkan dengan pengocokan atau pengadukan mekanis atau magnetis agar terjadi homogenasi larutan akhir dan saturasi pelarut. Untuk menghindari hilangnya pelarut, metabolit dan atau bahan tumbuhan, maka bahan dasar tumbuhan ini dapat di-masukkan dalam suatu wadah yang terikat dan digantung di bagian atas pelarut (Cannel, 1998).

2.4. Tinjauan tentang Spermatozoa dan Ovum

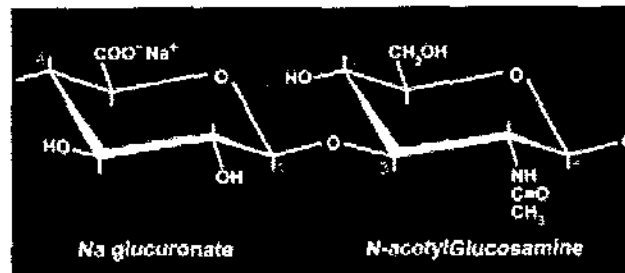
Spermatozoa merupakan sel kelamin/gamet jantan yang dihasilkan oleh testis sebagai organ reproduksi yang utama pada manusia dan hewan mamalia. Spermatozoa terbentuk sebagai hasil transformasi spermatid yang haploid. Selama proses spermatogenesis, materi nukleus spermatid didapatkan membentuk kepala spermatozoa, sedangkan sitoplasmanya direduksi dan berubah menjadi bagian tengah dan ekor. Organel sel kompleks golgi membentuk kap diatas nukleus dan dinamakan akrosom (Zaneveld, 1976)..

Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran sel. Bila terjadi reaksi akrosom membran plasma lepas dan hilang dari permukaan anterior akrosom. Kejadian tersebut diikuti dengan pelepasan enzim akrosom sedikit demi sedikit (Zaneveld, 1976)..

Akrosom mempunyai peranan yang sangat penting, karena mengandung enzim yang esensial untuk proses fertilisasi. Enzim-enzim tersebut antara lain : hyaluronidase, akrosin, Enzim Penetrasi Korona (CPE), neuroaminidase, ATP-ase, fosfatase, sulfatase, asetilglukosaminidase, asparatil amidase dan glukoronidase. Fungsi dari enzim-enzim tersebut antara lain : **Hyaluronidase** berfungsi untuk mendispersikan kumulus oophorus dan dengan demikian memungkinkan spermatozoa menembus lapisan terluar ovum ; **Enzim Penetrasi Korona (CPE)** berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa pada korona radiata, sehingga korona radiata akan hancur. Aktivitas enzim ini dihambat oleh faktor dekapasitasi yang dilepaskan selama perjalanan spermatozoa melalui traktus genitalia betina ; **Akrosin** berfungsi dalam proses penembusan spermatozoa melalui zona pelusida. Aktivitasnya dihambat oleh inhibitor dari traktus genitalia jantan yang melekat pada spermatozoa dan dilepaskan pada saat perjalanan spermatozoa melalui traktus genitalia betina ; **ATP-ase** mempengaruhi akrosom untuk mengadakan kapasitasi ; dan **Glukoronidase** berfungsi memecahkan tetrasakarida yang dihasilkan oleh enzim hyaluronidase dari asam hyaluronat (Zaneveld, 1976).

Ovum merupakan sel kelamin/gamet betina dan dihasilkan oleh ovarium sebagai organ reproduksi utama betina dalam proses oogenesis. Ovum akan terovulasi dari ovarium dalam bentuk yang kompleks dengan sel-sel matriks yang mengelilinginya yaitu : zona pellusida, korona radiata dengan dua hingga tiga lapis sel folikuler dan matriks yang lengket dengan sel-sel kumulus ooforus di sekelilingnya dan pada sel-sel ini akan ditemukan asam hyaluronat yang disekresi sebagai respon terhadap adanya berbagai faktor yang dikeluarkan oleh oosit II pada proses oogenesis menjadi ovum (Alberts *et al.*, 1994).

Asam hyaluronat adalah suatu asam muko-polisakarida terdiri dari unit ulangan *n*-asetilglukosamina dan glukoronat acid yang berikatan (1 – 4) dan asam glukoronat melekat pada *n*-asetilglukosamina berikutnya melalui ikatan (1 – 3) Dalam kumulus ooforus, asam hyaluronat berfungsi sebagai perekat sel penyusun matriks kumulus ooforus (Lauwers and Scharpe, 1997).



Gambar 2.4. Struktur kimia asam hyaluronat (Lauwers and Scharpe, 1997)

2.5. Tinjauan tentang Fertilisasi

Fertilisasi atau pembuahan merupakan proses masuknya gamet jantan (spermatozoa) ke dalam gamet betina (ovum) dan terjadinya penyatuan kedua materi genetik yang terkandung dalam kedua sel kelamin tersebut, yang akan menstimulasi dimulainya pembentukan zigot dan perkembangan embrio. Yang menjadi pemicu fertilisasi adalah penetrasi spermatozoa ke dalam sel telur (Keeton, 1980).

Spermatozoa mamalia, termasuk manusia secara alami dapat membuahi ovum atau sel telur apabila telah berada dalam traktus genitalia betina selama beberapa saat, yaitu dalam uterus dan tahap kedua berlangsung di tuba falopii. Hal tersebut diperlukan karena disini spermatozoa mengalami reaksi kapasitasi, yang merupakan proses transformasi spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina agar ia dapat memfertilisasi sel telur, dimana kemampuan ini dapat diperoleh karena adanya modifikasi oleh sekresi pada saluran reproduksi betina. Diantaranya melibatkan

perubahan komposisi lipid dan glikoprotein dari membran plasma spermatozoa, meningkatkan metabolisme dan motilitas spermatozoa, dihilangkannya faktor seminal plasma yang menyelubungi permukaan spermatozoa, modifikasi muatan pada permukaannya dan terbatasnya mobilitas reseptor yang akan menyebabkan ketidakstabilan membran plasma dan membran luar akrosom. Para ahli menduga bahwa proses tersebut berlangsung karena terjadi kontak spermatozoa dengan cairan folikel yang dikeluarkan pada saat ovulasi dan karena adanya cAMP (Keeton, 1980).

Pada spermatozoa mamalia reaksi akrosom didahului oleh reaksi kapasitasasi. Dalam proses kapasitasasi terjadi pelepasan inhibitor proteinase dan proses ini merupakan hal yang penting sekali karena inhibitor tersebut bila tidak dilepaskan akan menghambat kerja enzim proteinase yang terdapat dalam akrosom. Dari penelitian yang telah dilakukan pada babi, diduga bahwa permukaan ovum diselubungi oleh reseptor yang konfigurasiya berkomplemen dengan molekul yang menyelubungi permukaan membran spermatozoa. Keduanya diberi nama fertilisin dan antifertilisin. Reaksi fertilisin – antifertilisin merupakan tahap penting dalam proses fertilisasi. Reaksi tersebut diduga merupakan proses pendahuluan dari reaksi akrosom dan berfungsi untuk menempelkan kepala spermatozoa pada permukaan ovum supaya reaksi selanjutnya dapat terjadi. Menurut beberapa ahli reaksi akrosom terjadi sebelum atau segera setelah kepala spermatozoa menempel pada ovum. Pada reaksi ini terjadi fusi antara membran akrosom luar dengan membran plasma sehingga terbentuk pori-pori, dengan demikian enzim akrosom dapat keluar dan menghidrolisis lapisan-lapisan yang menyelubungi ovum (Keeton, 1980).

2.6. Tinjauan tentang Hyaluronidase

2.6.1. Tinjauan Umum tentang Enzim

Enzim pada hakikatnya merupakan katalis efektif, yang bertanggung jawab bagi terjadinya reaksi kimia terkoordinasi yang terlibat dalam proses biologi dari sistem kehidupan. Suatu enzim mempercepat kecepatan reaksi dengan menurunkan energi aktivasi yang diperlukan untuk terjadinya reaksi. Sebagai katalis, enzim tidak dirusak dalam reaksi dan karena itu tetap tidak berubah dan dapat digunakan kembali. Suatu ciri yang menonjol dari enzim sebagai katalis adalah spesifitas substrat, yang menentukan fungsi biologinya. Ciri biologi kritis lain dari reaksi enzim adalah bahwa substrat dan spesifitas katalitiknya menjamin sintesis hanya dari produk biomolekular spesifik tanpa produksi serentak dari produk samping (Armstrong, 1995).

Pada tahun 1960-an, *International Union of Biochemistry (IUB)* mendirikan *Commission on Enzyme Nomenclature* untuk menyetujui suatu klasifikasi dan nomenklatur spesifik untuk jumlah enzim yang semakin banyak diidentifikasi dan dilaporkan. Komisi ini mengidentifikasi enzim menurut jenis reaksi yang dikatalisis, menentukan enam kelas utama, yaitu :

1. *Oksidoreduktase*, yang mengkatalisis berbagai macam reaksi oksidasi-reduksi
2. *Transferase*, yang mengkatalisis reaksi pemindahan/transfer gugus seperti amino, karboksil, karbonil, metil, asil, glikosil atau fosforil
3. *Hidrolase*, yang mengkatalisis reaksi hidrolitik atau pemutusan ikatan antara karbon dengan berbagai atom lain sambil mengikat molekul air
4. *Liase*, yang mengkatalisis pemecahan ikatan antara karbon dengan karbon, karbon dengan belerang serta beberapa jenis ikatan antara karbon dengan nitrogen (tidak termasuk ikatan peptida) dengan membentuk ikatan rangkap

5. *Isomerase*, yang mengkatalisis reaksi rasemisasi isomer optik atau geometric dan reaksi-reaksi oksidasi-reduksi intramolekuler tertentu
6. *Ligase*, yang mengkatalisis pembentukan ikatan antara karbon dengan oksigen, belerang, nitrogen dan atom-atom lain (Montgomery *et al.*, 1992)

2.6.2. Enzim Hyaluronidase

Hyaluronidase merupakan enzim yang mempunyai aktivitas pada asam hyaluronat (hyaluronan) dan tidak aktif pada substrat lain. Hyaluronan banyak tersebar pada ruang ekstraseluler hewan tinggi dan berperan secara struktural pada jaringan kartilago dan jaringan lainnya (Lauwers and Scharpe, 1997).

Hyaluronidase pertama kali diisolasi dari mikroorganisme, kemudian pada testis mamalia yang saat ini merupakan sumber utama. Salah satu perkecualian, semua enzim ini adalah endoheksosaminidase. Telah ditunjukkan bahwa enzim yang berasal dari bakteri bukan hidrolase, tetapi aktivitasnya eliminase. Sementara hyaluronidase dari testis, meskipun hidrolase juga mempunyai aktivitas transglikolase. Enzim-enzim yang bersifat homologi hyaluronidase testikular dapat berasal dari anak katak, bisa ular, bisa tawon, jaringan hewan, serum manusia dan sumber lain dengan lokasi ekstraseluler. Selain itu hyaluronidase berada pada bagian kepala spermatozoa mamalia yang berperan dalam penetrasi pada lapisan sel granulosa sel telur (Linker, 1974).

Sebagai dasar utama penelitian hyaluronidase digunakan antara lain dalam studi pada struktur kimia asam mukopolisakarida, demonstrasi histologi keberadaannya dalam jaringan, studi difusi pelarutan dan partikulasi bahan dalam jaringan, dan pada penggunaan terapi enzim untuk mempercepat absorpsi bahan yang diberikan secara parenteral (Meyer *et al.*, 1960).

2.6.3. Klasifikasi dan Nomenklatur Hyaluronidase

Klasifikasi hyaluronidase testikular menurut Webb (1992), yaitu :

EC 3	:	Hydrolase
EC 3.2.	:	Glycosylase
EC 3.2.1.	:	Glycosidase (enzim yang menghidrolisis senyawa <i>O</i> - dan <i>S</i> -glycosyl)
EC 3.2.1.35.	:	Hyaluronoglucosaminidase

Nomenklatur hyaluronidase testikular menurut Meyer *et al.* (1960), Webb (1992) dan (Kusumarini, 1997) yaitu :

Nama Umum	:	Hyaluronoglucosaminidase
Nama sistematik	:	Hyaluronate 4-glycanohydrolase
Nama rekomendasi	:	Hyaluronate lyase
Nama sinonim	:	Hyaluronidase Lyase, hyaluronate Glucuronoglycosaminoglycan lyase <i>Spreading factor</i> Mucinase

2.6.4. Sifat-sifat Enzimatis Hyaluronidase

Diantara sifat-sifat yang dimiliki hyaluronidase terutama hyaluronidase testicular adalah (Lauwers and Scharpe, 1997) :

1. Profil pH

Terdapat perbedaan profil aktivitas pH diantara berbagai jenis hyaluronidase, terutama antara hyaluronidase testicular dan lisosomal. Rentang pH untuk

hyaluronidase testicular adalah 3,5 - 8 dengan pH optimumnya 3,8 dan tidak tampak aktivitas hyaluronidase pada pH di bawah 2,6. pH optimum ini sama untuk hyaluronidase lisosomal, walaupun menunjukkan aktivitas yang lebih besar pada media asam dan tidak tampak adanya aktivitas pada pH di atas 4,8.

2. Kekuatan Ionik

Profil pH dan pH optimum sangat tergantung pada kekuatan ionik dan komposisi buffer yang digunakan. Hyaluronidase testicular, serum dan lisosomal mempunyai sensitivitas yang berbeda terhadap NaCl.

3. Berat Molekul

Hyaluronidase testicular, lisosomal dan bakteri terdapat dalam berbagai bentuk. Sedang berat molekul hyaluronidase testicular terdapat pada rentang antara \pm 60.000 - 90.000 Dalton.

4. Struktur Molekul

Struktur hyaluronidase biasanya merupakan glikoprotein, yaitu yang terdapat pada testis, lisosomal, racun kadal, *stonefish* dan *Staphylococcus aureus*. Lacey *et al.* (1990) membuktikan bahwa hyaluronidase testicular merupakan jenis glikoprotein yang kaya mannose.

2.6.5. Keberadaan Hyaluronidase pada Hewan dan Manusia

Hyaluronidase terbagi atas 3 golongan utama berdasarkan mekanisme kerjanya pada hyaluronan (Lauwers and Scharpe, 1997):

1. Hyaluronoglukosaminidase (hyaluronat 4-glukanohidrolase ; EC 3.2.1.35.)

Hyaluronidase jenis ini secara acak menghidrolisis ikatan 1,4 diantara *N*-asetil- β -D-glukosamin dan residu D-glukoronat dalam hyaluronan.

Berdasarkan sumbernya, terbagi menjadi :

- a. Hyaluronidase testikular, didapatkan dalam jaringan testis sebagian besar mamalia dan terletak dalam akrosom. Hyaluronidase ini mendegradasi hyaluronan, khondroitin, khondroitin-4- dan -6 sulfat menjadi oligosakarida, terutama tetrasakarida. Juga terjadi degradasi parsial pada dermatan sulfat. Aktivitas hyaluronidase testikular memiliki rentang pH yang lebar.
 - b. Hyaluronidase jaringan atau lisosomal, ditemukan pada berbagai jaringan mamalia selain testis, juga pada fraksi lisosom dari jaringan (banyak terdapat di hati) dan serum manusia. Hyaluronidase ini berbeda dengan hyaluronidase testicular pada pH optimum dan rentang aktivitas pHnya.
 - c. Hyaluronidase bisa/racun, didapatkan pada ular, kadal, kalajengking, laba-laba, semut, tawon dan lebah.
2. Hyaluronoglukuronidase (hyaluronat 3 – glikanohidrolase ; EC 3.2.1.36.)
 Hyaluronidase jenis ini menghidrolisis ikatan 1,3- diantara β -glukoronat dan residu *N*-asetil D-glukoronat dalam hyaluronan. Enzim ini didapatkan pada lintah (*Hirudo medicinalis* dan *Sanguisoga gramilosa*) dan krill (*Euphausia superba*).
 3. Hyaluronat lyase (EC 4.2.2.1.)
 Hyaluronidase jenis ini biasanya berasal dari bakteri seperti dari golongan pneumokokus, stafilokokus, streptokokus dan klostridia. Enzim ini men-degradasi hyaluronan menjadi disakarida yang mengandung Δ -4-5-asam uronat tak jenuh.

2.6.6. Fungsi Biologis

Terdapat beberapa fungsi biologis dari hyaluronidase, diantaranya yaitu (Lauwers and Scharpe, 1997) :

1. Faktor virulensi dan pengurai (*spreading factor*)

Hyaluronidase bekerja pada makromolekul matriks ekstraseluler dengan mengubah komposisi dan strukturnya. Hyaluronidase juga meningkatkan absorpsi obat dan faktor pengurai dari racun serta virulensi bakteri yang sering dihubungkan dengan produksi hyaluronidase.

2. Fertilisasi

Oosit mamalia dikelilingi oleh beberapa lapis sel yang tertanam dalam matriks ekstraseluler, yang terbukti mengandung protein dan hyaluronan. Spermatozoa yang memfertilisasi oosit harus menembus lapisan sel-sel tersebut yaitu dengan menguraikan dan mendigestinya, dan kemudian terbukti bahwa hyaluronidase akan membantu mengarahkan individu spermatozoa menuju ke oosit (Dandekar *et al.*, 1992).

3. Kanker

Hyaluronan banyak ditemukan pada tumor. Sel kanker menghasilkan banyak sekali hyaluronan atau merangsang sel-sel lain untuk menghasilkan polisakasida, dimana hyaluronan akan melindungi sel dari limfosit sitotoksik. Juga diperkirakan bahwa hyaluronan meningkatkan pergerakan sel dengan membuka jalur migrasi sebagai penyebaran tumor. Sehingga disinilah hyaluronidase akan berperan.

4. Diferensiasi dan pengaturan jaringan

Banyak peneliti menunjukkan bahwa aktivitas hyaluronidase ditemukan pada jaringan yang dapat mengalami resorpsi atau pengaturan kembali secara cepat. Aktivitas enzim yang penting dalam lisosom selama mitosis akan hilang (termasuk hyaluronidase), yang berada di bawah kontrol hormon tiroid. Hyaluronan ditunjukkan terlibat dalam proliferasi, pengenalan dan pergerakan sel. Perubahan produksi hyaluronan pada berbagai sistem perkembangan dan

regenerasi berhubungan terbalik dengan aktivitas hyaluronidase yang berubah, dan kemudian sintesis hyaluronan yang banyak ini akan diikuti oleh meningkatnya aktivitas hyaluronidase.

2.6.7. Reaksi dan Spesifitas Hyaluronidase

Reaksi katalisa	:	Hyaluronat \rightarrow n3-(4-deoksi- β -D gluk-4-enuronosil)-N-asetil-D glukosamina
Tipe reaksi	:	Eliminasi (ikatan C-O)
Substrat	:	asam hyaluronat
Inhibitor	:	asam iodoasetat, heparin, sisteina, antikoagulan, EDTA, kondroitin sulfat, polifenol, kuinoid
Aktivitas spesifik	:	7,75 U/mg
Harga Km (mM)	:	0,38 (hyaluronat tetramer)
pH	:	4,4 – 7,4 (pH optimum : 6,4)
Suhu	:	37°C
Penyimpanan	:	- 20°C (enzim kasar dan murni tetap aktif selama 2 tahun)

Enzim hyaluronidase merupakan endoglikosidase yang terdispersi meluas dan berfungsi untuk memotong ikatan heksosamin. Enzim hyaluronidase bekerja pada asam hyaluronat dan kondroitin sulfat. Dari asam hyaluronat, enzim hyaluronidase menghasilkan suatu tetrasakarida dengan struktur (GlcUA- β -1,3-GlcNAc- β -1,4)₂. Selanjutnya tetrasakarida tersebut dipecah oleh enzim glukuronidase dan β -N-Asetil heksosaminidase (Kusumarini, 1997).

Selain secara acak menghidrolisis dari ikatan 1,4- di antara *N*-asetil- β -D-glukosamin dan residu D-glukoronat dalam hyaluronat, hyaluronidase juga menghidrolisis ikatan 1,4- β -D-glikosidik di antara *N*-asetil-galaktosamin atau *N*-asetilgalaktosamin sulfat dan asam glukoronat pada khondroitin, khondroitin 4- dan 6- sulfat, dan dermatan (Kusumarini, 1997).

2.7. Tinjauan tentang Purifikasi Enzim Hyaluronidase

Tujuan purifikasi/pemurnian enzim adalah mengisolasi protein enzim spesifik dari ekstrak mentah seluruh sel yang mengandung banyak komponen lain. Molekul-molekul kecil dapat diangkat dengan dialisis atau filtrasi gel, asam nukleat dengan presipitasi dengan antibiotika streptomisin, dan seterusnya. Prinsipnya adalah memisahkan enzim yang diinginkan dari campuran ratusan protein yang secara kimia dan fisika serupa (Martin *et al.*, 1987).

Prosedur pemurnian klasik yang berguna termasuk pengendapan (presipitasi) dengan konsentrasi garam yang bervariasi (umumnya amonium atau natrium sulfat) atau pelarut (aseton atau etanol), pemanasan diferensial atau denaturasi pH, sentrifugasi diferensial, filtrasi gel, dan elektroforesis. Penyerapan (adsorpsi) selektif dan pelarutan (elution) protein dari penukar anion selulosa dietilaminoetilselulosa dan penukar kation karboksimetilselulosa juga telah sangat berhasil untuk pemurnian dalam jumlah besar dan cepat. Pemisahan protein pada saringan molekul seperti Sefadex yang memisahkan protein berdasarkan ukurannya juga banyak dipergunakan. Meskipun demikian, cara ini relatif tidak selektif karena tidak dapat (kecuali dalam kombinasi) memisahkan satu protein dari protein lainnya. Hal ini lebih mudah dicapai dengan kromatografi afinitas (Martin *et al.*, 1987).

Secara garis besar, pemurnian enzim dapat digolongkan dalam :

1. Teknik Kromatografi Afinitas, yang dapat mengangkat satu/sejumlah kecil protein khusus secara selektif dari campuran protein kompleks
2. Teknik Gel Poliakrilamid, yang dapat memperlihatkan adanya protein kontaminan mayor dan minor, memisahkan protein denaturasi dan memisahkan protein

Enzim hyaluronidase testikular diekstraksi dari jaringan testis sapi, atau semen. Bahan kasar ini dihomogenasi dan disentrifugasi, kemudian supernatan yang diperoleh diekstraksi dengan Triton X-100 dan dipresipitasi dengan ammonium sulfat. Tahapan purifikasi lebih lanjut dari enzim kasar yang didapatkan ini melibatkan tahapan kromatografi berangkai, meliputi penukar-ion, filtrasi gel, dan kromatografi afinitas (Lauwers and Scharpe, 1997).

2.8. Tinjauan tentang Pengukuran Aktivitas Enzim Hyaluronidase

Jumlah enzim yang sangat kecil dalam sel menyulitkan penentuan jumlah enzim dalam ekstrak atau cairan jaringan dibanding dengan penentuan konsentrasi senyawa organik atau anorganik. Aktivitas katalitik enzim dapat membantu pengukuran dari alat yang sensitif dan spesifik. Pengukuran jumlah enzim dalam sampel ekstrak jaringan atau cairan biologis, adalah dengan mengukur kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Pada keadaan optimum yang diukur sebanding dengan jumlah enzim yang ada (Prajogo, 2002).

Pengukuran enzim dapat juga didasarkan pada kecepatan reaksi yang dikatalisis dibanding kecepatan reaksi enzimatik yang dikatalisis oleh enzim murni dengan kadar diketahui. Dengan cara demikian dapat mengukur jumlah enzim, umumnya dinyatakan dalam mikrogram. Mengingat sulit dan mahalnya pembuatan enzim, maka banyak enzim yang tersedia masih belum murni dan biasanya jumlah

enzim dinyatakan dalam unit. Terdapat dua satuan enzim yaitu *International Unit* (IU) dan *Katal*. 1 IU artinya jumlah enzim yang mengkatalisa 1 μ mol substrat / menit pada kondisi optimal (pH dan temperatur tertentu). Sedangkan 1 Katal artinya jumlah enzim yang mengkatalisa 1 mol substrat / detik pada kondisi tertentu dan menurut metoda tertentu (Prajogo, 2002).

Untuk pengukuran aktivitas enzim hyaluronidase, terdapat beberapa metode, antara lain (Prajogo, 2002) :

A. Metode Fisika Kimia

Pengukuran aktivitas enzim hyaluronidase menggunakan metode fisika kimia, berdasarkan karakteristik dari substrat dan produk degradasi enzim tersebut, ada tiga metode yang digunakan :

1. Metode *mucin clot prevention*

Metode ini berdasarkan perubahan formasi gumpalan “mucin” yang khas dari larutan hyaluronat. Waktu yang diperlukan untuk hilangnya gumpalan ini menunjukkan adanya hyaluronidase, dan keadaan ini digunakan untuk menentukan aktivitas hyaluronidase.

2. Metode viskometrik

Pengurangan viskositas secara langsung merupakan akibat dari aksi enzim hyaluronidase pada asam hyaluronat, sejak pemecahan ikatan glikosida memberikan penurunan viskositas rata-rata berat molekul dan volume hidrodinamik dari polimer hyaluronat dan karena itu terjadi penurunan intrinsic dan viskositas relatif. Penentuan kecepatan reaksi, berupa jumlah mol dari ikatan yang terpecah per unit waktu dari data viskositas.

3. Metode turbidimetrik

Metode ini berdasar pengukuran kekeruhan yang terjadi seiring dengan penurunan viskositas asam hyaluronat, karena kerja dari hyaluronidase. Hal ini terjadi karena peningkatan jumlah kelompok anionik yang berinteraksi dengan protein, dan diikuti penurunan secara random pemecahan polimer menghasilkan partikel di bawah minimal panjang rantai untuk menghasilkan kekeruhan. Formasi kekeruhan menghilang pada berat molekul yang diperkirakan antara 6000 – 8000 dalton. Penghilangan kekeruhan ini yang menunjukkan kerja hyaluronidase.

B. Metode Kimia

1. Metode kolorimetrik

A. Hyaluronidase mengkatalisis degradasi hyaluronan yang membebaskan kelompok akhir asetilglukosamina yang dapat diukur pada kolorimetrik. Pada pengujian ini, gula anhidro pertama terbentuk dari *N*-asetilglukos-amina pada larutan alkali, dan diubah dalam larutan asam menjadi derivat furan, reaksi dengan *p*-dimetilaminobenzaldehida menyebabkan adanya perubahan warna yang intensitasnya dianalisa dengan spektrofotometri UV-Vis pada λ 585 nm. Jumlah asetilglukos-amina yang terbebaskan per unit waktu merupakan ukuran aktivitas hyaluronidase.

B. Metode lain yang meliputi tahapan :

B.1. Reaksi Enzim

Suhu inkubasi 37°C ; volume inkubasi 10 ml. Preparasi blanko 0,2 ml larutan tetraborat + 0,8 ml larutan hyaluronat + 0,2 ml sampel. Ambil 0,6 ml campuran ini untuk reaksi warna.

Tabel 2.1. Metode Pengujian Aktivitas Hyaluronidase dengan Reaksi Warna

Pipet ke tabung (10 mm x 70 mm)		Konsentrasi dalam campuran pengujian
Larutan hyaluronat	0,8 ml	
Pre-inkubasi selama 15 menit		
Sampel (buffer)	0,2 ml	
Campur dan inkubasi selama 10 menit Kemudian tambahkan segera 0,5 ml		1 mg / ml

B.2. Pengukuran Spektrofotometri

Panjang gelombang 585 nm ; lorong lampu 3,6 ml.

Tabel 2.2. Metode Pengujian Aktivitas Hyaluronidase dengan Spektrofotometri

Pipet ke dalam tabung (10 x 100 mm)	1	2	3	4	5
Larutan tetraborat					
Buffer asetat					
10 µg standard					
20 µg standard					
Larutan inkubasi					
Blanko + sampel					
Panaskan 3 menit, dalam water bath dan dinginkan					
Reagen	Masing-masing 3 ml				
Dimetilaminobenzaldehida					
Campur, inkubasi selama 20 menit, 37°C penangas air dan dinginkan. Jika perlu sentrifuse larutan sampai jernih, masukkan kuvet dan pengukuran ekstensi					

B.3. Perhitungan

Perhitungan aktivitas enzim diekspresikan sebagai µmole N-asetilglukosamina bebas per menit. Merujuk pada standard untuk menghitung jumlah asetilglukosamina bebas dalam 10 menit waktu inkubasi.

Ekstensi kedua standard harus berkaitan 1 : 2.

E_{St} = ekstensi 10 µg standard

E_{Sam} = ekstensi sampel

$E_{Blk+Sam}$ = ekstensi blanko mengandung sampel

Dalam sampel $c = \frac{E_{Sam}}{E_{St}} \frac{E_{Blk+Sam}}{2} \times 2 \text{ } \{ \mu\text{g/ml} \}$

$$\text{Volume aktivitas} = \frac{E_{\text{sam}} - E_{\text{Blk+Sam}}}{E_{\text{St}}} \times \frac{2}{0,2} \times \frac{F}{221} \times 1000$$

$$= \frac{E_{\text{sam}} - E_{\text{Blk+Sam}}}{E_{\text{St}}} \times 45 \times F \text{ (U/l)} ; 37^{\circ}\text{C}$$

Dimana :

- 0,2 = volume sampel dalam reaksi enzimatis
 221,2 = berat molekul N-asetilglukosamina
 F = faktor dilusi sampel selama pre-treatment

2. Metode Neocuprine

Pada metode ini menggunakan reagen yang berisi campuran Na_2CO_3 4 g, glisin 16 g dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 450 mg dilarutkan dalam 1 liter air dan reagen neocuprine yang berisi 150 mg disuspensikan dalam 80 ml air, tambahkan HCl 1 M beberapa tetes untuk melarutkan kemudian tambahkan air sampai 100 ml. Kedua reagen ini dicampur dengan sampel enzim Cu^{2+} diubah menjadi Cu^+ yang terikat pada neocuprine menghasilkan absorban tertentu pada spektrofotometri.

3. Metode lempeng mikro

Berdasarkan asam hyaluronat yang tidak terpecah oleh enzim hyaluronidase, yang akan mengendap dengan penambahan setilpiridinium klorida, menyebabkan penampakan lingkaran jernih yang menunjukkan jarak difusi kerja enzim. Hasil pengendapan asam hyaluronat dengan setilpiridinium klorida dapat dianalisa dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ 595 nm. Absorban hasil spektrofotometer UV-Vis menunjukkan jumlah asam hyaluronat yang tidak terhidrolisis dan mengendap dengan setilpiridinium klorida (Tung *et al.*, 1994).

2.9. Konsep Perkiraan Peranan Hyaluronidase dalam Fertilisasi Mamalia

Hyaluronidase telah dikenal secara kuantitatif dalam akrosom spermatozoa mamalia, tetapi peranan dalam fertilisasi tetap belum sepenuhnya dikaji. Selama interaksi gamet pada mamalia, spermatozoa harus melintasi kumulus ooforus, yang terdiri atas sekitar 3000 sel kumulus yang tertanam dalam matriks ekstraseluler (ECM - *extracellular matrix*) kaya asam hyaluronat. Akrosom spermatozoa mengandung hyaluronidase, yang akan dilepaskan selama reaksi akrosom. Diduga adanya hyaluronidase akan memudahkan penetrasi ke dalam lapisan tersebut (Cherr *et al.*, 1996).

Dalam penelitian tentang interaksi spermatozoa dengan ECM kumulus terlihat bahwa sebenarnya tidak terjadi degradasi matriks saat spermatozoa melewati kumulus. Tidak adanya degradasi nyata yang terlihat selama penetrasi spermatozoa pada ECM tersebut sesuai dengan aksi hyaluronidase yang tidak dapat berdifusi, yang terikat pada anterior kepala spermatozoa. Tetapi diperkirakan hyaluronidase dikeluarkan dari spermatozoa yang terfertilisasi hanya pada daerah permukaan zona, bila terjadi eksositosis akrosom spermatozoa dalam merespon sinyal zona. Dan diduga penetrasi spermatozoa pada kumulus ooforus membutuhkan motilitas yang hebat dan difasilitasi oleh hidrolisis atau alterasi ECM kumulus yang bergantung pada aktivitas hyaluronidase (Cherr *et al.*, 1996).

2.10. Tinjauan tentang Inhibitor Enzim Hyaluronidase

Zat yang secara spesifik dapat menghambat berbagai reaksi enzimatik sehingga menurunkan kecepatan reaksi enzimatik disebut penghambat / inhibitor. Inhibitor dapat berupa berbagai metabolit, obat-obatan atau bahan-bahan yang bersifat racun. Berdasarkan cara bereaksinya dengan enzim, inhibitor dapat dikelompokkan sebagai berikut (Manitto, 1981 ; Lehninger, 1982) :

1. Inhibitor Kompetitif

Seperti nama yang digunakan, suatu inhibitor kompetitif secara klasik merupakan suatu senyawa yang berkompetisi dengan substrat alamiah dari enzim untuk berikatan dengan sisi aktif enzim, tetapi sekali terikat tidak dapat diubah oleh enzim tersebut. Inhibitor seperti ini secara struktural hampir selalu mirip dengan substrat alamiah, dan melalui cara menirunya, berikatan dengan enzim dan menghalangi aktivitas katalitik. Inhibisi kompetitif adalah reversibel dan cepat diatasi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Efektivitas dari suatu inhibitor kompetitif ditentukan oleh afinitas relatif yang dimiliki enzim terhadap substrat dan inhibitor.

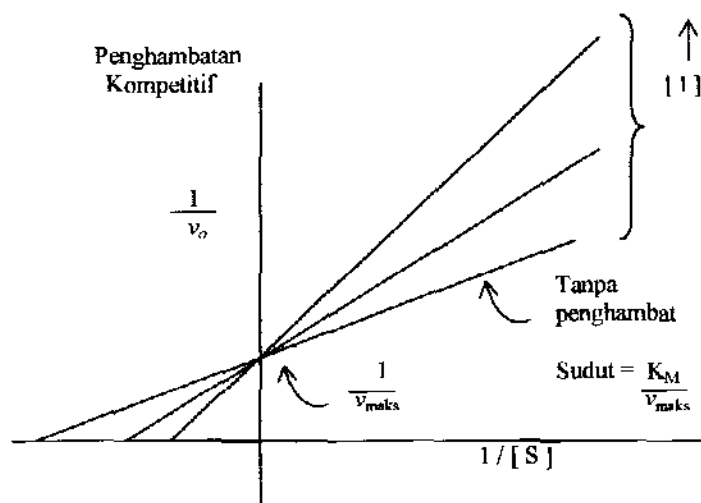
2. Inhibitor nonkompetitif

Inhibitor nonkompetitif umumnya karakteristik sebagai suatu inhibitor dari aktivitas enzimatis melalui senyawa yang tidak mempunyai hubungan struktural dengan substrat dan karena itu inhibisi tidak dibalik oleh peningkatan konsentrasi substrat. Tidak seperti inhibitor kompetitif, inhibitor nonkompetitif reversibel tidak dapat berinteraksi pada tempat aktif, tetapi berikatan dengan beberapa bagian lain dari suatu enzim atau kompleks enzim-substrat, mengubah konformasi molekul enzim sehingga mengakibatkan inaktivasi dapat balik sisi katalitik.

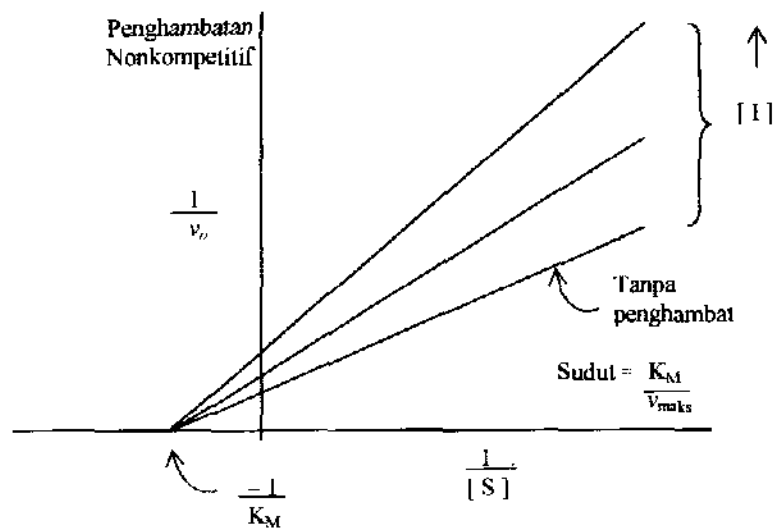
3. Inhibitor Ireversibel (inaktivator)

Inhibitor ireversibel biasanya tidak mengaktifkan enzim dengan berikatan secara kovalen pada tempat aktifnya, dan menyebabkan deaktivasi enzim secara tidak dapat balik. Golongan ini bereaksi dengan dan merusakkan suatu gugus fungsional pada molekul enzim yang penting bagi aktivitas katalitiknya. Walaupun inhibisi ireversibel pernah dikategorikan dan diuji sebagai inhibisi nonkompetitif, namun saat ini dikenal sebagai suatu jenis inhibisi khas.

Inhibisi yang diharapkan untuk enzim yang diterapkan dalam pengobatan adalah reversibel, artinya aktivitas enzim akan pulih kembali bila inhibitor dipisahkan dari medium, dengan cara dialisis, elektroforesis, dan lain-lain. Uji kinetika dengan pemetaan kebalikan ganda data kecepatan enzim memberikan cara yang mudah untuk menentukan apakah suatu penghambatan enzim bersifat kompetitif atau nonkompetitif. Dua rangkaian percobaan kecepatan reaksi dilakukan ; konsentrasi enzim dijaga tetap pada kedua percobaan. Pada salah satu rangkaian, konsentrasi substrat dijaga tetap dan pengaruh peningkatan konsentrasi penghambat terhadap kecepatan awal v_o ditentukan dengan pengukuran yang sesuai. Pada percobaan lain, konsentrasi penghambat dijaga tetap, dan konsentrasi substrat diubah-ubah. Kebalikan ($1 / v_o$) dari kecepatan reaksi v_o dipetakan terhadap kebalikan konsentrasi substrat $[S]$, yaitu $1 / [S]$ (Lehninger, 1982).



Gambar 2.5. Grafik Lineweaver-Burk tentang penghambatan kompetitif (Lehninger, 1982)



Gambar 2.6. Grafik Lineweaver-Burk tentang penghambatan nonkompetitif (Lehninger, 1982)

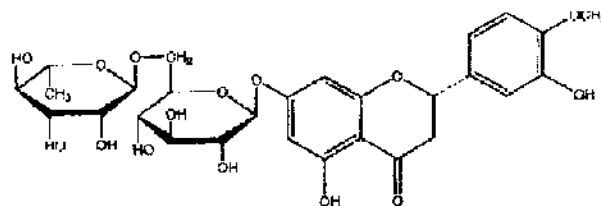
Beberapa penelitian menunjukkan bahwa hyaluronidase dihambat oleh garam-garam Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} dan Pb^{2+} . Analog substrat seperti khondroitin sulfat B, *desulfated* khondroitin sulfat B, dermatan sulfat, keratan sulfat, heparitin sulfat dan heparin terbukti bersifat inhibitor kompetitif terhadap hyaluronidase (Lauwers and Scharpe, 1997).

Inhibitor hyaluronidase secara alami tidak ditemukan dalam seminal plasma, tetapi ada di dalam serum. Penambahan serum pada spermatozoa atau pada enzim hyaluronidase dapat mencegah dispersi kumulus ooforus secara *in vitro*. Namun tidak ada hubungan antara sterilitas pria dengan konsentrasi hyaluronidase dalam serum (Kusumarini, 1997).

Terdapat banyak senyawa etno-farmakologi yang berfungsi memblokir aktivitas hyaluronidase, dan secara tradisional telah digunakan sebagai kontrasepsi, untuk pengobatan gigitan ular atau luka. Senyawa-senyawa ini antara lain flavonoid, tannin,

hidrangenol (dari *Hydrangea*), kurkumin (dari rempah-rempah), kumin, glisirizin (dari *licorice*) dan tranilas (suatu modifikasi asam sinamat (Mio and Stern, 2002).

Karena hyaluronidase berperan penting dalam proses fertilisasi, beberapa studi menyetujui kemungkinan penggunaan inhibitor hyaluronidase sebagai bahan kontrasepsi. Selama tahun 1950-an flavonoid seperti hesperidin terfosforilase (*phosphorilated hesperidin*) telah dievaluasi dengan hasil yang pasti. Bahan-bahan seperti hesperidin terfosforilasi, PS₅₃ (sebuah polimer formaldehid dan asam sulfonat hidroquinon / *hydroquinone sulphonic acid*), tetradesilsodium sulfat, dan sodium aurothiomalat (*myocrisin*) merupakan inhibitor hyaluronidase *in vitro* dan memiliki aktivitas antifertilitas ketika diberikan secara intravaginal (Lauwers and Scharpe, 1997). Hesperidin dapat mencegah penetrasi spermatozoa mencit dalam proses IVF, menurunkan aktivitas hyaluronidase spermatozoa mencit dan bersifat inhibitor hyaluronidase testis sapi (Prajogo *et al.*, 2001^a)



Gambar 2.7. Struktur kimia Hesperidin (Mio and Stern, 2002)

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Landasan teori

Keluarga Berencana merupakan salah satu program andalan pemerintah Indonesia dalam menekan laju pertumbuhan penduduk. Pelaksanaan program KB diarahkan pada penggunaan alat kontrasepsi, yang sampai saat ini masih mayoritas diperuntukkan bagi kaum wanita, sehingga perlu dikembangkan metode kontrasepsi baru bagi pria agar pria dapat ikut lebih bertanggung jawab dalam pengaturan perencanaan keluarga.

Kontrasepsi baik hormonal maupun non-hormonal banyak digali dan dikembangkan lebih lanjut dalam rangka mewujudkan adanya “pil pria”. Di antara kontrasepsi non-hormonal ini adalah ramuan-ramuan yang digunakan oleh suku-suku bangsa tertentu (etno-medisin), seperti penggunaan tumbuhan gossipol dalam ramuan obat Cina yang ternyata kemudian terbukti mempunyai efek samping yang toksik dan sifat reversibilitasnya masih diragukan sehingga tidak dapat dijadikan sebagai pilihan kontrasepsi yang ideal.

Dari hasil studi eksplorasi di pedalaman Irian Jaya, diketahui adanya dua tanaman yang digunakan penduduk setempat untuk menjarangkan kelahiran, yaitu *Endospermum moluccanum* Becc. dan *Justicia gendarussa* Burm.f. dan dari kedua tanaman tersebut hanya *J. gendarussa* yang khusus diberikan untuk pria (Moeso and Agus, 1985).

Di antara banyak penelitian yang mengarah pada potensi khasiat gandarusa sebagai kontrasepsi pria, terdapat beberapa penelitian yang mengarah pada efek hambatan gandarusa pada fungsi spermatozoa dalam proses fertilisasi ovum. Fertilisasi ini terutama terkait dengan penetrasi spermatozoa ke dalam ovum yang

akan merangsang dimulainya perkembangan embrio. Untuk melakukan penetrasi ini, spermatozoa harus dapat menembus lapisan sel-sel folikuler yang tertanam dalam matriks ekstraseluler di sekeliling ovum yang disebut kumulus oophorus, yang kaya akan senyawa asam hyaluronat. Oleh karenanya akrosom spermatozoa akan mengeluarkan enzim hyaluronidase yang akan melonggarkan lapisan sel folikuler barrier spermatozoa tersebut, sehingga apabila enzim ini tidak ada atau tidak berfungsi maupun terhambat aktivitasnya, maka fertilisasi pun tidak akan terjadi (Keeton, 1980).

Beberapa penelitian yang sudah dilakukan terkait efek gandarusa pada proses fertilisasi antara lain pada pemberian gandarusa akan menyebabkan adanya penurunan daya dispersi kumulus oophorus manusia *in vitro*, menurunkan aktivitas akrosin dan β -glukosidase kelinci (Prajogo *et.al.*, 1998^b), fraksi polifenolnya diketahui bersifat inhibitor hyaluronidase pada kumulus oophorus mencit *in vitro* dan secara kualitatif bersifat inhibitor hyaluronidase testis sapi (Prajogo *et.al.*, 1997).

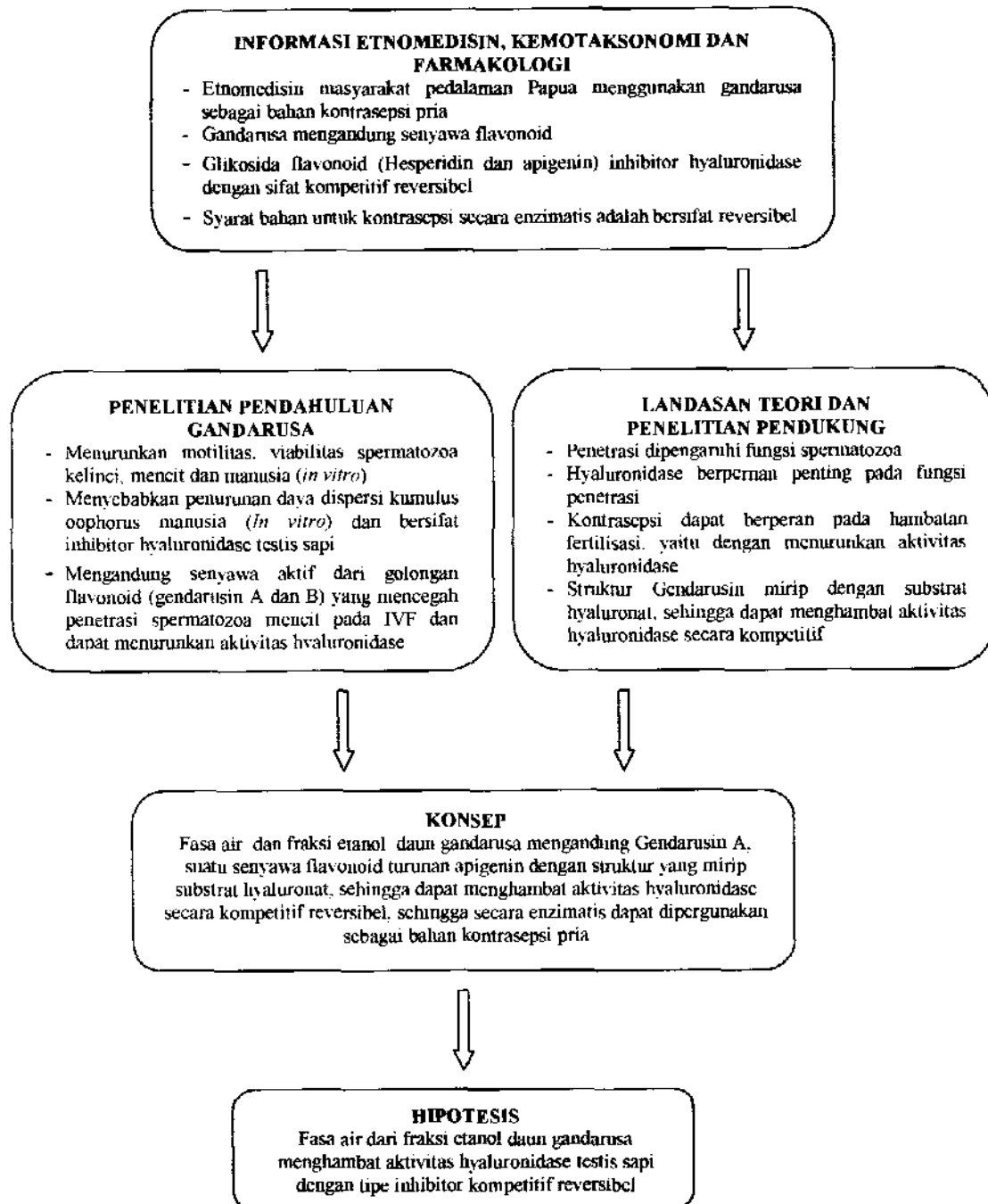
Flavonoid, antara lain flavon, flavanol, dan chalcone memiliki kemampuan untuk menghambat hyaluronidase. Penyelidikan juga menunjukkan bahwa bahan – bahan tersebut bertindak sebagai inhibitor kompetitif terhadap aktivitas hyaluronidase (Lauwers and Scharpe, 1997). Apigenin merupakan salah satu flavonoid yang dapat bertindak sebagai inhibitor aktivitas hyaluronidase dengan tipe penghambatan kompetitif (Tung *et.al.*, 1994). Gendarusin A yang merupakan turunan dari apigenin diharapkan juga mempunyai aktivitas penghambatan kompetitif terhadap hyaluronidase. Studi bioaktivitas bahan ini telah dilakukan, seperti adanya penurunan aktivitas hyaluronidase spermatozoa pada mencit (Prajogo *et.al.*, 1997).

Berkaitan dengan pengaruhnya pada fungsi penetrasi spermatozoa, maka fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa dapat dijadikan sebagai model untuk

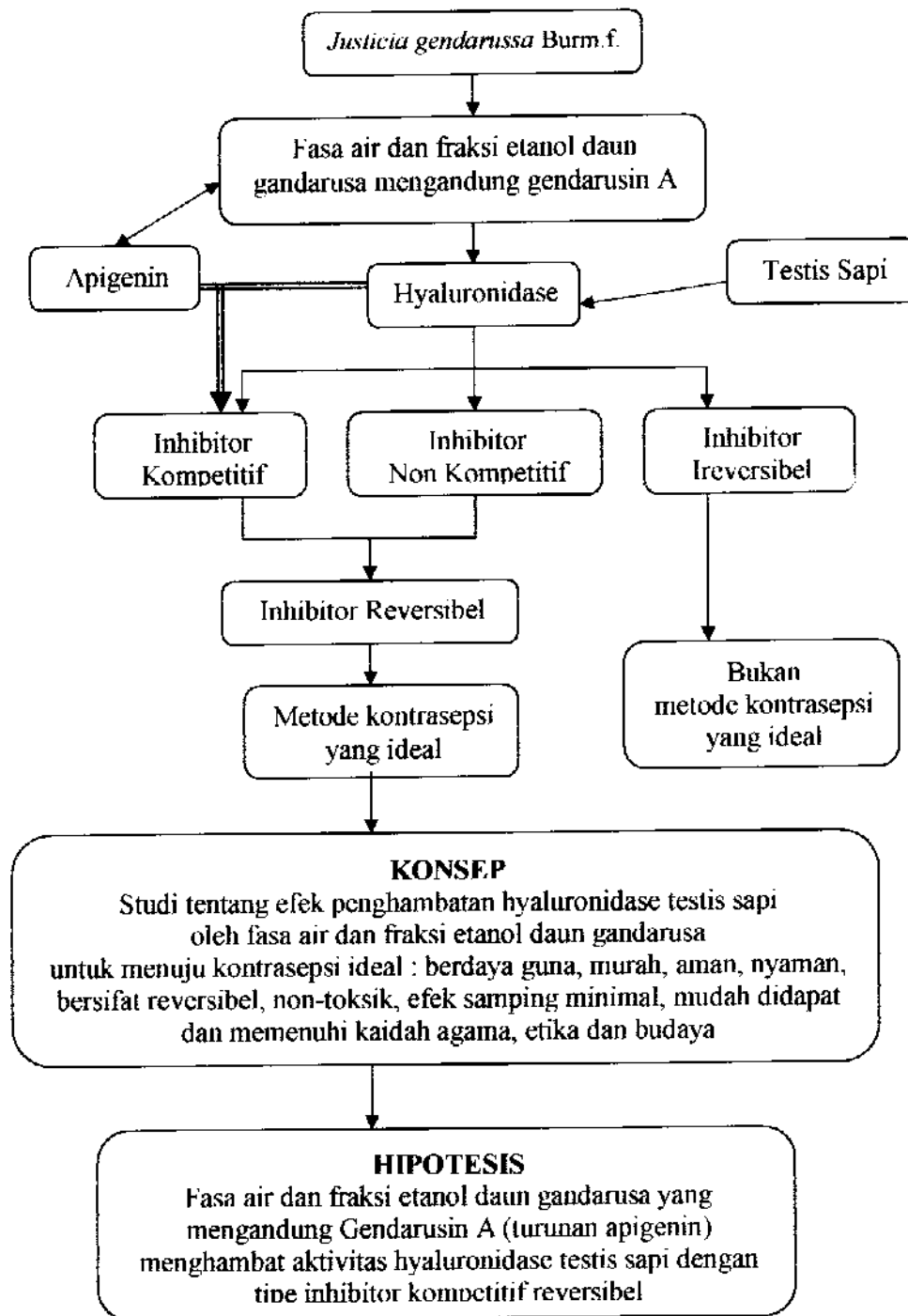
mempelajari hubungan senyawa flavonoid dengan kemampuan penetrasi spermatozoa dalam proses fertilisasi yang berupa penurunan aktivitas hyaluronidase testis sapi.

3.2. Hipotesis penelitian

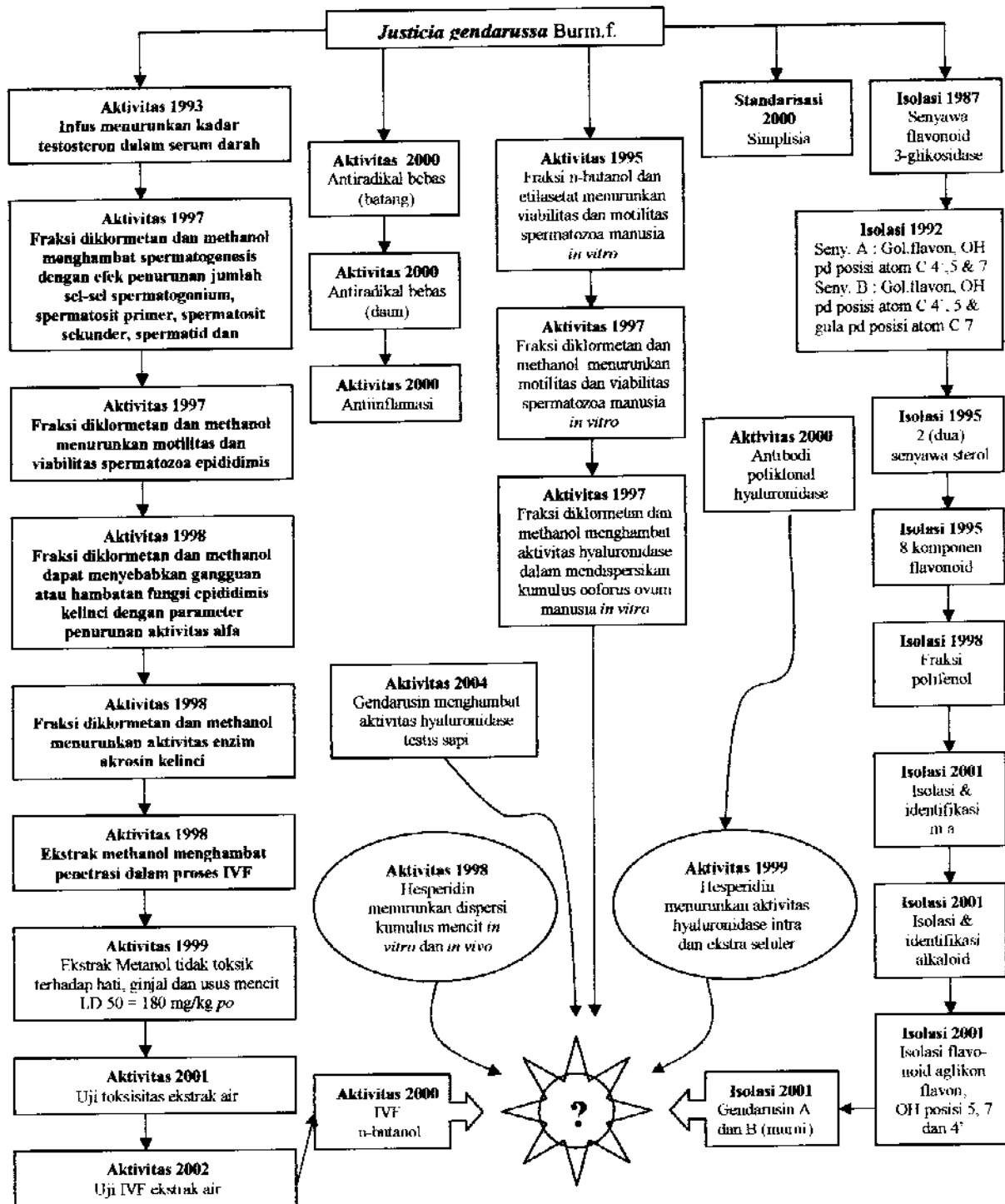
Berdasarkan kerangka konseptual yang telah disusun, maka dapat diusulkan hipotesis bahwa fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) dapat menghambat aktivitas hyaluronidase testis sapi dengan tipe inhibitor kompetitif reversibel.



Gambar 3.1. Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.2. Bagan Kerangka Operasional



Gambar 3.3. Pohon Penelitian Potensi *Justicia gendarussa* Burm.f. untuk Kontrasepsi Pria (Prajogo, 2003)

BAB 4
MATERI DAN METODE PENELITIAN

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian tersebut akan dilakukan penelitian dengan tahapan rancangan sebagai berikut :

1. Memperoleh fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa (*J. gendarussa*, Burm.f.) sebagai bahan uji. Fasa air diperoleh dari hasil ekstraksi serbuk daun gandarusa dengan cara maserasi dengan pelarut *n*-heksan, kemudian dengan etanol 60% dan diuapkan rotavapor hingga diperoleh ekstrak etanol kental (fraksi etanol). Fasa air dan fraksi etanol, dan juga apigenin dan hesperidin sebagai kontrol, kemudian dibuat kadar 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 ppm.
2. Melakukan purifikasi parsial terhadap hyaluronidase (Sigma), yang meliputi
 - a. presipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - b. desalting dengan menggunakan membran dialisaHasil desalting hyaluronidase ini digunakan sebagai bahan uji.
3. Karakterisasi parsial enzim hyaluronidase, yaitu untuk mengetahui berat molekul hyaluronidase dengan SDS – PAGE dengan pewarnaan *Silver Staining*
4. Melakukan optimasi pengukuran aktivitas hyaluronidase dengan metode Morgan-Elson, yang meliputi optimasi panjang gelombang, pH, waktu dan suhu inkubasi
5. Optimasi apigenin dan hesperidin sebagai inhibitor kompetitif hyaluronidase, yang nantinya digunakan sebagai pembanding
6. Pengujian tipe penghambatan fasa air dari fraksi etanol daun gandarusa terhadap aktivitas hyaluronidase dengan apigenin dan hesperidin sebagai pembanding menggunakan metode Morgan-Elson

4.2. Sampel, Banyak Replikasi dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Sampel

Sampel yang digunakan adalah fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.) yang diperoleh dari ekstraksi dan fraksinasi tanaman gandarusa hasil budidaya di daerah Trawas, Mojokerto, yang kemudian dibuat menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 ppm.

4.2.2. Banyak Replikasi

Menurut Gaspersz (1994), jumlah ulangan untuk setiap perlakuan yang dilambangkan dengan r ditentukan dengan menggunakan rumus sederhana :

$$r = \frac{2 t_{\alpha/2}^2 s^2}{d^2}$$

dimana :

- s^2 = ragam galat konsentrasi fasa air daun gandarusa
- t_{α} = nilai t dari tabel dengan taraf nyata α untuk derajat bebas (db) yang sesuai dengan s^2
- d = besar penyimpangan antara nilai dugaan terhadap nilai sesungguhnya dari populasi (parameter)

Dengan mengetahui jumlah ulangan r , maka banyaknya satuan percobaan (n) dapat ditentukan, yaitu dengan mengandakan nilai r dengan banyak perlakuan yang akan dicoba.

4.2.3. Teknik Pengambilan Sampel

Bahan sampel berupa daun yang dikumpulkan dari tanaman yang dibudidayakan di daerah Trawas Mojokerto, yang kemudian dikeringkan dan diserbuk, kemudian diekstraksi dengan pelarut n-heksan dan dilakukan maserasi dengan pelarut etanol sampai diperoleh fraksi etanol, yang selanjutnya diuapkan

dengan rotavapour. Kemudian dilakukan fraksinasi lebih lanjut sampai diperoleh fasa air dari fraksi etanolnya, dan setelah itu dibuat beberapa konsentrasi, yaitu 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 ppm.

4.3. Variabel Penelitian

Klasifikasi variable pada penelitian ini adalah :

1. Variabel Bebas : konsentrasi fasa air gandarusa
(yaitu 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 ppm)
2. Variabel Tergantung : total aktivitas hyaluronidase testis sapi (Unit)
3. Variabel Penghubung : proses penghambatan aktivitas hyaluronidase
4. Variabel Random : lokasi tanam
5. Variabel Kendali : umur tanaman, waktu panen

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun dari tanaman gandarusa (*J. gendarussa*, Burm.f.) yang diperoleh dari daerah Trawas, Mojokerto dan telah dideterminasi menggunakan kunci determinasi di Laboratorium Botani Farmasi-Farmakognosi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Daun Tanaman gandarusa tersebut dipanen setelah berumur 4 bulan dan dikumpulkan pada Desember 2003 dan Januari 2004.

4.4.2. Enzim Hyaluronidase

Enzim hyaluronidase yang dipergunakan adalah hyaluronidase testis sapi (*Bovine Testes Hyaluronidase*) dari Sigma dengan kode H 3506, berkualifikasi

Tipe I-S, berupa serbuk liofilisasi dengan potensi 999 unit / mg dan berat molekul 56 kDa.

4.4.3. Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut *n*-heksan, etanol 60%, HCl 2 N, kloroform, NH₄OH 25% ; (NH₄)₂SO₄ ; NaCl, aquadest, saccharic acid 1,4-lactone, asam hyaluronat, *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), tetraborat reagen, DMAB (*p*-dimetilaminobenzaldehida) reagen, HCl, asam asetat glacial; apigenin (Sigma), hyaluronidase (Sigma).

4.5. Instrumen Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah homogenator, sentrifuge berpendingin, gel elektroforesis, mikropipet, tabung bertutup ulir, water bath, inkubator dan spektrofotometer.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di 2 tempat, yaitu :

1. Pengambilan sampel dan ekstraksi daun gandarusa dilakukan di Laboratorium Botani Farmasi-Farmakognosi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga pada bulan Mei – Juli 2004.
2. pengujian efek penghambatan ekstrak daun gandarusa terhadap aktivitas enzim hyaluronidase testis sapi dilakukan di Pusat Penelitian Biologi Molekuler (Puslitbiomol) Universitas Jember pada bulan Oktober 2004 – Pebruari 2005.

4.7. Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1. Ekstraksi Daun Gandarusa (*J. gendarussa*, Burm.f.)

Daun gandarusa yang diperoleh disortasi basah agar tangkai, ranting dan kotoran-kotoran yang melekat padanya dapat dibuang, kemudian daun dicuci sampai bersih. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar dan tidak boleh terkena sinar matahari langsung dan dijaga agar tidak membusuk. Setelah itu daun yang sudah kering disortasi lagi dan kemudian diserbuk.

Serbuk daun gandarusa diekstraksi secara maserasi dan perkolasi dengan pelarut n-heksan sampai seluruh klorofil dan lemak yang terdapat dalam daun tersebut hilang (didapat ekstrak n-heksan yang jernih). Kemudian serbuk tersebut dikeringkan dengan diangin-anginkan dan diekstraksi kembali dengan cara yang sama memakai pelarut etanol 60%. Ekstrak etanol yang didapat diuapkan sampai kental dan kering dalam rotavapour dan lemari asam.

Ekstrak kering dari etanol 60% tersebut diasamkan dengan HCl 2 N sampai pH 3 - 4, kemudian dikocok dengan kloroform. Fasa air dan kloroform dipisahkan dan fasa air yang didapat dibasakan dengan NH_4OH 25% sampai pH-nya 9 - 10. Setelah itu dikocok kembali dengan kloroform dan fasa airnya dipisahkan kembali dari fasa kloroform. Selanjutnya akan didapatkan fasa air dan kloroform. Ekstrak fasa air dan ekstrak kental fraksi etanol kemudian akan digunakan sebagai bahan uji.

4.7.2. Purifikasi Parsial Hyaluronidase Testis Sapi

Hyaluronidase testis sapi (Sigma) dipresipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lalu di-*desalting* dengan membran dialisa (Lauwers and Scharpe, 1997).

Dari setiap langkah purifikasi dibutuhkan pengujian keberadaan enzim hyaluronidase dengan melakukan pengukuran aktivitas enzim menggunakan metode kolorimetri Morgan-Elson (Takahashi *et al.*, 2003).

4.7.3. Karakterisasi Parsial Hyaluronidase Testis Sapi

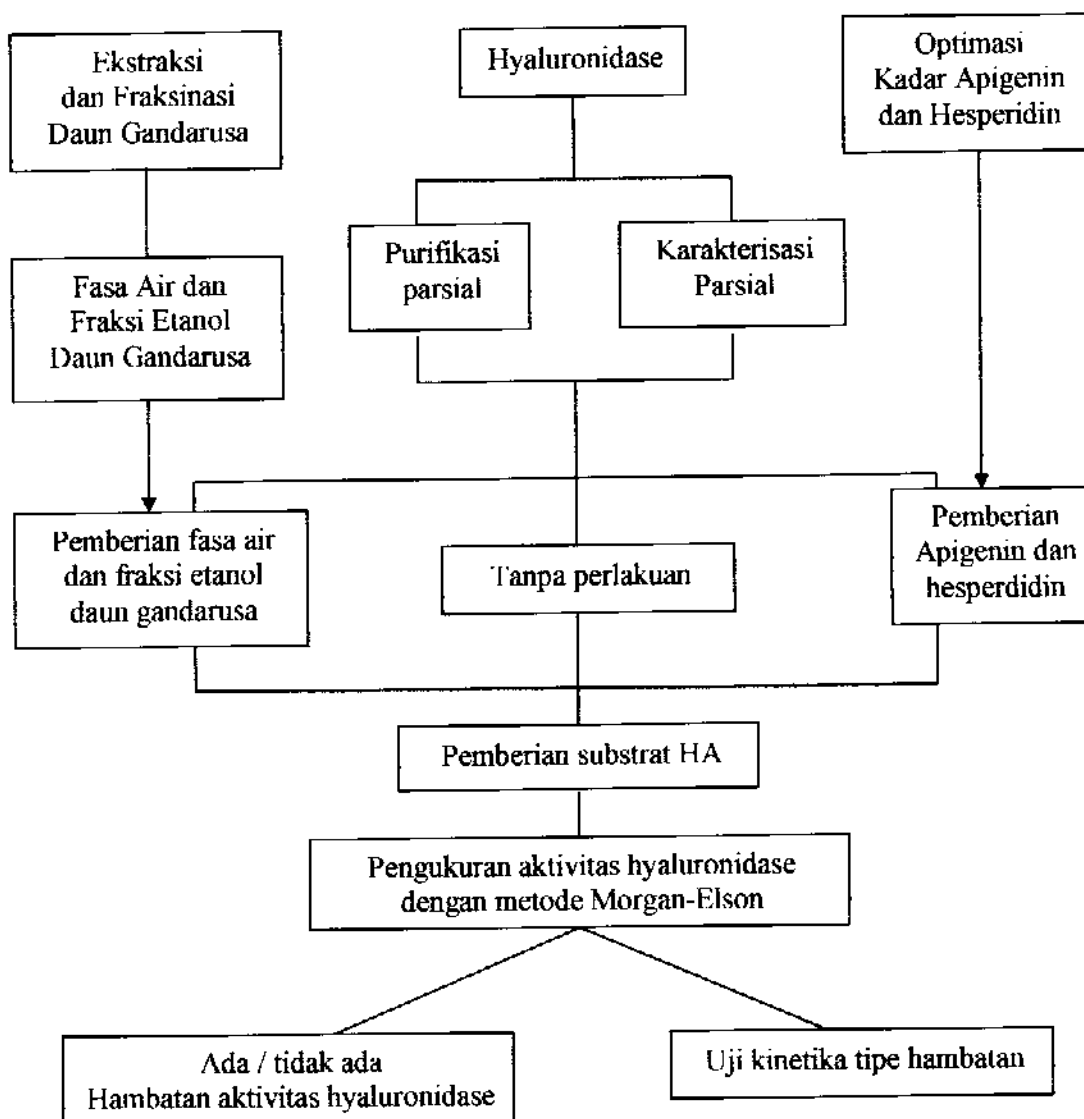
Setelah purifikasi parsial, dilakukan karakterisasi parsial hyaluronidase meliputi pH dan suhu optimum, dan berat molekul. Pengukuran pI dan suhu optimum dilakukan dengan mengukur aktivitas hyaluronidase sesuai metode Morgan-Elson pada rentang pH dan suhu tertentu. Berat molekul ditentukan dengan menggunakan SDS-PAGE (Ikegami-Kawai and Takahashi, 2002 ; Lauwers and Scharpe, 1997).

Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis dilakukan sesuai dengan metode Laemmli (1970) dengan konsentrasi akrilamid 12,5%. Pewarnaan perak dilakukan menggunakan *Silver Stain II Kit Wako*. Standart massa molekul protein yang digunakan antara lain *myosin*, *β -galactosidase*, *albumin*, *aldolase*, *carbonic anhydrase* dan *myoglobin*.

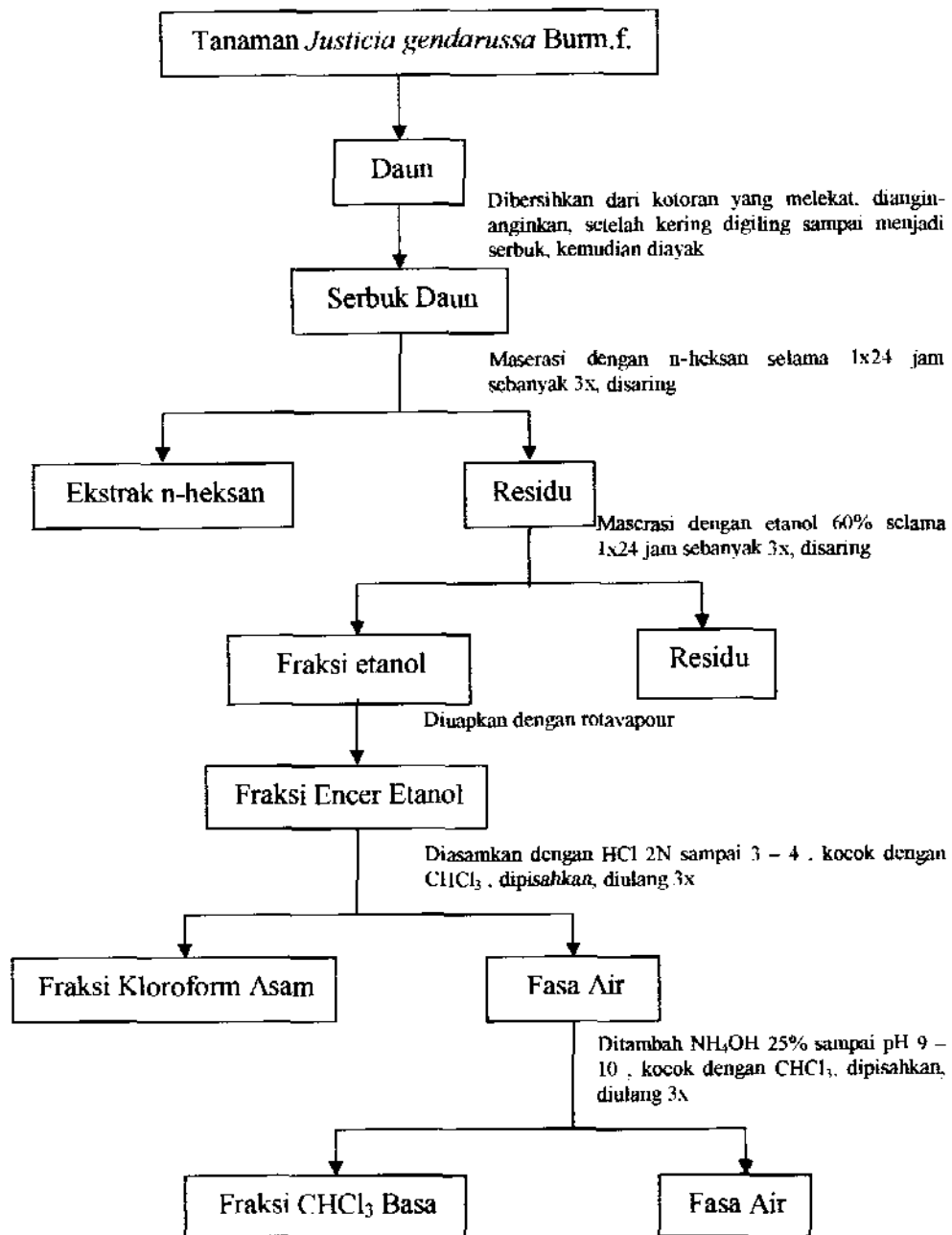
4.7.4. Penentuan Efek dan Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase

Untuk menentukan efek penghambatan aktivitas hyaluronidase, ekstrak gandarusa fasa air dan fraksi etanol dibuat dengan konsentrasi yang berbeda (yaitu 0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 dan 10 ppm), kemudian dihomogenkan ke dalam larutan substrat HA dan di-pre-inkubasi selama sekitar 5 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran aktivitas hyaluronidase yang meliputi pengukuran aktivitas total dan aktivitas spesifiknya, sesuai metode Morgan-Elson menurut Takahashi *et al.* (2003).

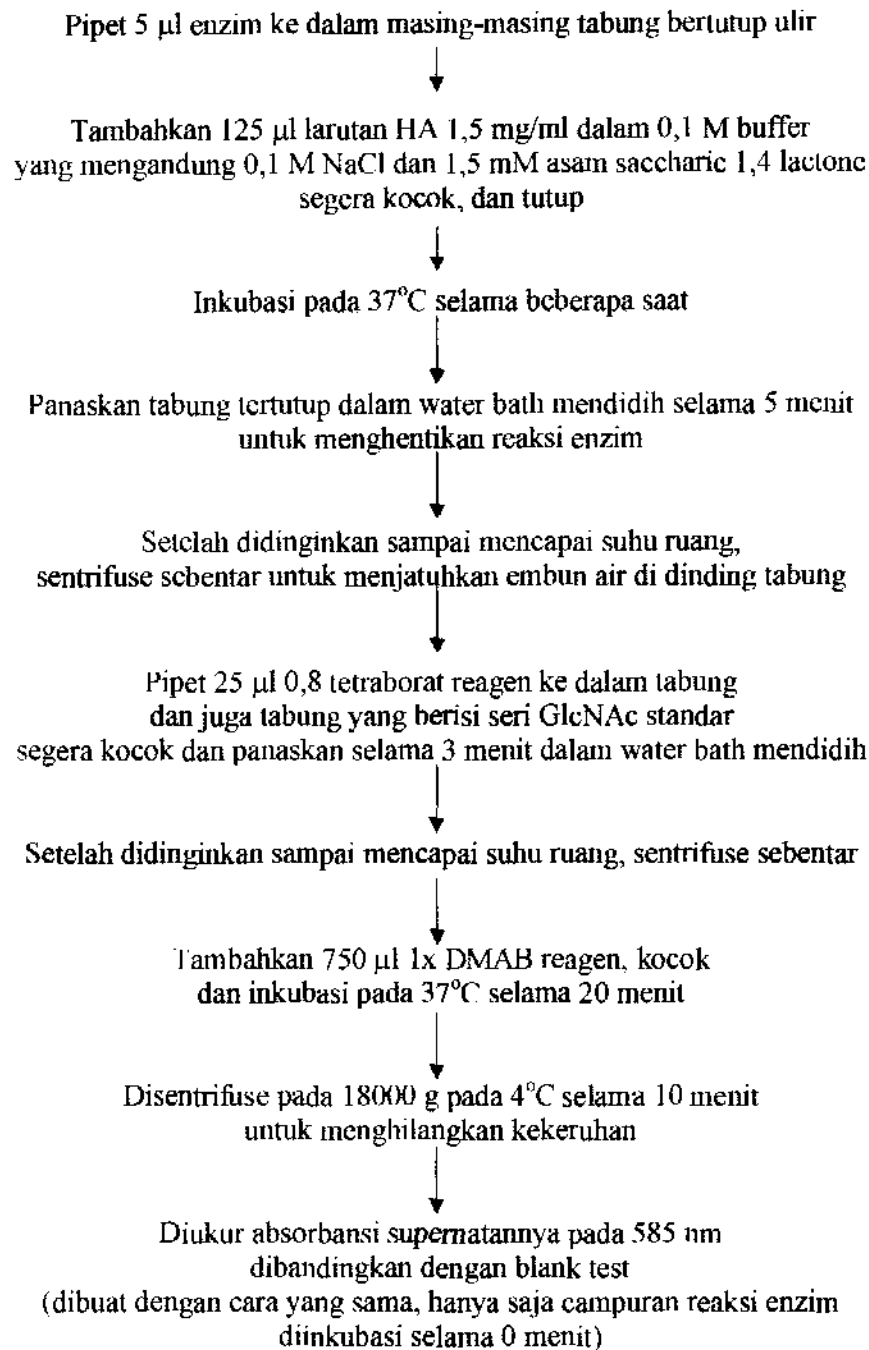
Untuk menentukan tipe penghambatannya, dilakukan uji kinetika enzim dengan pemetaan kebalikan ganda data kecepatan enzim. Pertama-tama dibuat grafik pemetaan konsentrasi produk terhadap waktu, yang menghasilkan garis linear dengan sudut α , dimana akan diperoleh nilai V_o dari tangen α . Kemudian kebalikan dari kecepatan reaksi V_o (yaitu $1/V_o$) dipetakan terhadap kebalikan konsentrasi substrat $[S]$, yaitu $1/[S]$. Dari plot data grafik Lineweaver-Burk ini, akan diperoleh nilai dari konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan reaksi maksimal (V_{maks}) hyaluronidase.



Gambar 4.1. Kerangka Kerja



Gambar 4.2. Skema Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Gandarusa (Prajogo, 2003)



Gambar 4.3. Diagram alir pengukuran aktivitas enzim dengan metode Morgan-Elson (Takahashi *et.al.*, 2003)

BAB 5
ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB V

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Daun *Justicia gendarussa* Burm.f

Sebagai bahan penelitian adalah daun gandarusa yang telah dideterminasi di Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi, Bagian Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Daun kering yang telah diserbuk diekstraksi dengan *n*-heksan secara maserasi dan dimodifikasi dengan pengadukan, kemudian ampas diekstraksi lagi dengan etanol 60%. Ekstrak etanol 60% diasamkan sampai pH 3 – 4 kemudian dilakukan partisi dengan pelarut kloroform – air. Fasa kloroform dan air dipisahkan, fasa air yang diperoleh dibasakan sampai pH 9 – 10 kemudian dilakukan partisi kloroform-air. Fasa air dipisahkan dari fasa kloroform. Fasa air kemudian dikeringkan dengan *Freeze drying*.

Tabel 5.1. Berat hasil ekstraksi daun Gandarusa

	Berat (gram)	%
Serbuk daun gandarusa	4670	100
Ekstrak <i>n</i> -heksan	85	1,82
Fraksi Etanol	1007	21,56
Fasa air	599,87	12,84
Bahan sisa	2978,13	63,78

5.2. Hasil Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase

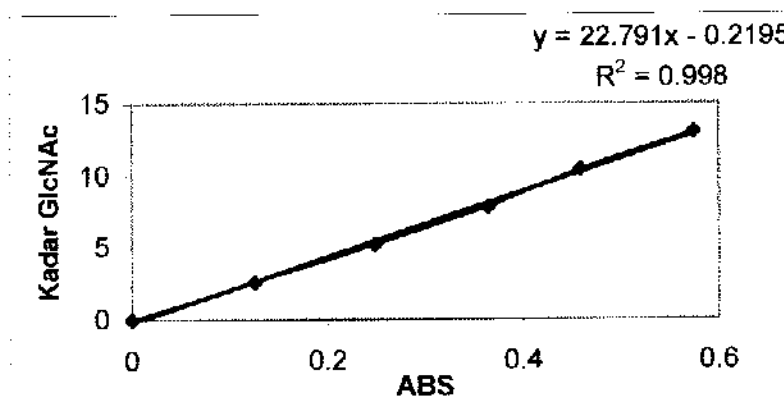
5.2.1. Pembuatan Kurva Standar

Data persamaan regresi linier $y = ax + b$ dengan y sebagai absorbansi Glukosamin N-asetat dan x sebagai kadar Glukosamin N-asetat, dengan mereaksikan Glukosamin N-asetat pada berbagai rentang kadar dengan reagen tetraborat dan *p*-dimetilaminobenzaldehida sesuai metode Morgan-Elson (Takahashi *et.al.*, 2003),

kemudian diamati absorbansi-nya pada λ 585 nm dengan Spektrofotometer. Data pengukuran absorbansi Glukosamin N-asetat pada berbagai rentang kadar dapat dilihat pada tabel 5.2 sedangkan persamaan dan kurva regresi linier $y = ax + b$ dari Glukosamin N-asetat berbagai kadar dapat dilihat pada gambar 5.1.

Tabel 5.2. Data pengukuran absorbansi Glukosamin N-asetat

Kadar Glukosamin N-asetat (μg)	Absorbansi (λ 585 nm)
0	0
2,6	0,125
5,2	0,248
7,8	0,364
10,4	0,458
13	0,574



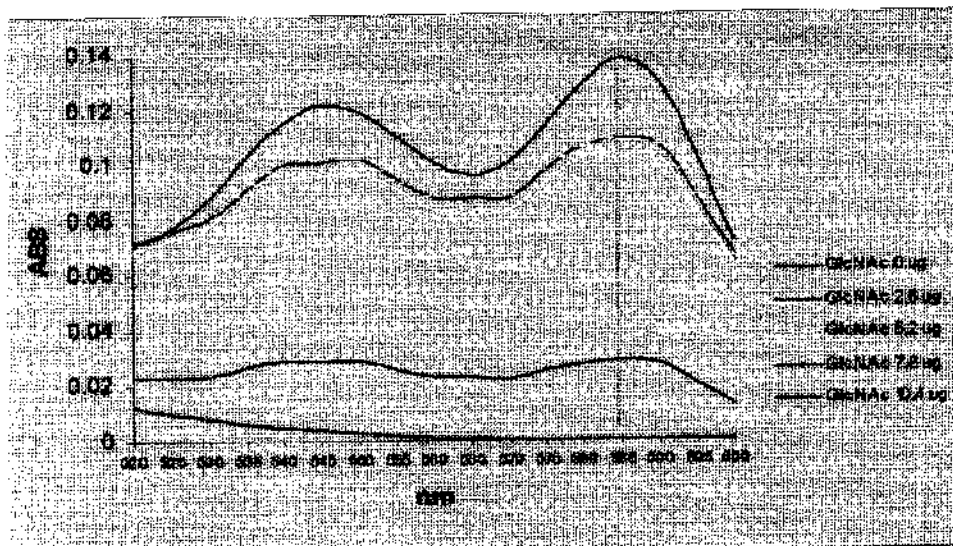
Gambar 5.1. Kurva standar Glukosamin N-asetat

Dalam metode Morgan-Elson, aktivitas hyaluronidase testis sapi dapat diketahui dari kadar Glukosamin N-asetat hasil produk yang terhidrolisa dari substrat asam hyaluronat yang membentuk produk berwarna ungu kemerahan pada penambahan reagen tetraborat dan *p*-dimetilaminobenzaldehida yang terdeteksi pada λ 585 nm.

Kadar Glukosamin N-asetat yang terhidrolisa oleh hyaluronidase dari substrat asam hyaluronat dapat diketahui dengan memasukkan data absorbansi masing-masing kelompok perlakuan pada persamaan regresi di atas.

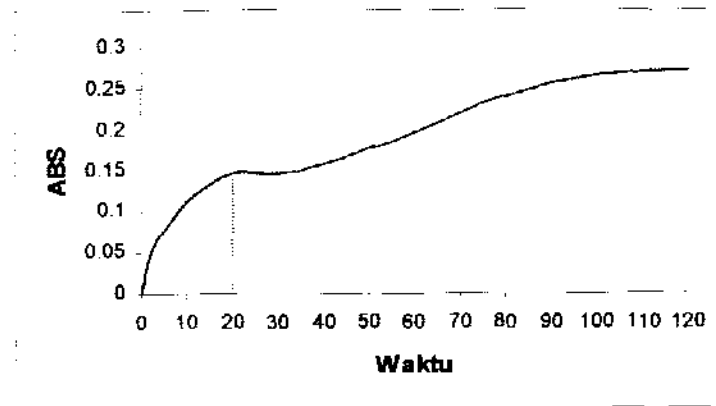
5.2.2. Hasil Optimasi Panjang Gelombang Spektrofotometer dan Waktu Inkubasi

Optimasi metode Morgan-Elson yang dilakukan meliputi panjang gelombang yang digunakan pada spektrofotometer dan waktu inkubasi campuran enzim-substrat. Untuk optimasi panjang gelombang spektrofotometer, *scanning* larutan standar Glukosamin N-asetat berbagai konsentrasi dilakukan pada rentang λ 520 - 600 nm (Takahashi *et al.*, 2003). Hasilnya dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5.2. *Scanning* panjang gelombang spektrofotometer λ 520 - 600 nm

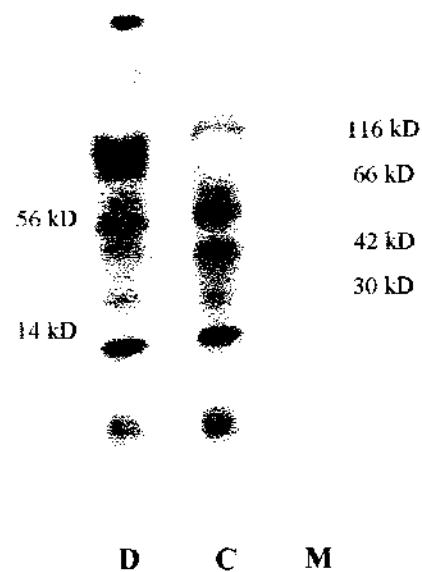
Untuk optimasi waktu inkubasi campuran enzim – substrat, dilakukan pengukuran aktivitas hyaluronidase yang diinkubasikan pada rentang waktu tertentu. Hasilnya dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5.3. Pengukuran absorbansi pada rentang waktu inkubasi 0 -120 menit

5.3. Hasil Purifikasi Parsial Hyaluronidase Testis Sapi (Sigma)

Purifikasi parsial terhadap hyaluronidase testis sapi (Sigma) meliputi presipitasi dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan desalting dengan menggunakan membrane dialisa. Hasil purifikasi ini kemudian dilakukan elektroforesis (SDS-PAGE) dengan pewarnaan *Silver staining*, dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 5.4. SDS-PAGE electrograph hasil dialisa hyaluronidase
D – Hasil dialisa ; *C* = Crude enzim ; *M* = Marker protein

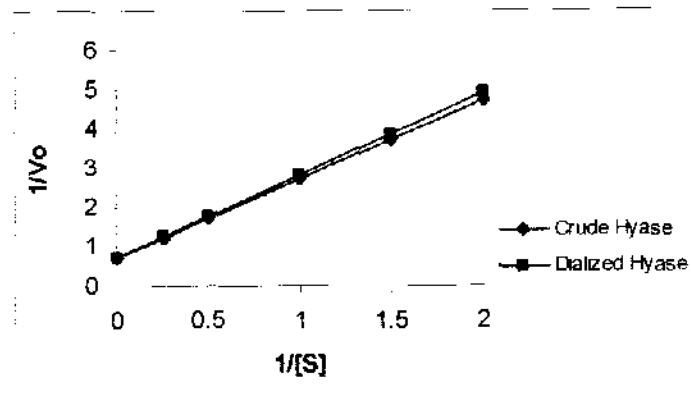
Data hasil pengukuran absorbansi untuk hyaluronidase (Sigma) sebelum dan sesudah purifikasi parsial dapat dilihat pada table 5.3 berikut :

Tabel 5.3. Data hasil perhitungan aktivitas dan aktivitas spesifik hyaluronidase testis sapi sebelum dan sesudah purifikasi parsial

	Volume awal (ml)	Aktivitas Total (U ^a)	Total Protein (mg)	Aktivitas Spesifik (U ^a /mg)	Yield
Enzim Kasar	25	5,444	112,165	0,049	100%
Hasil Presipitasi (50 – 80%)	1,75	0,615	7,573	0,081	11,3%
Hasil Dialisa	4,5	0,558	4,597	0,121	10,25%

a – Satu unit aktivitas hyaluronidase adalah sejumlah enzim yang mengkatalisa pembentukan 1 μ mol produk Glukosamin N-asetat per menit pada suhu 37°C

Penentuan nilai Km dan Vmaks dari hyaluronidase dilakukan menggunakan enzim hyaluronidase testis sapi (Sigma) sebelum presipitasi dan sesudah mengalami desalting dengan membrane dialisa. Hyaluronidase direaksikan dengan beberapa konsentrasi substrat (0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 dan 4 mg / ml asam hyaluronat) dan diperoleh nilai absorbansi produknya. Dari kurva pembentukan produk tiap waktu dari masing-masing konsentrasi substrat, diperoleh Vo yang merupakan nilai tg α . Kemudian nilai 1/[S] dan 1/Vo dimasukkan ke dalam kurva Lineweaver-Burk dan dari persamaan yang diperoleh, didapatkan nilai Km dan Vmaks dari aktivitas hyaluronidase. Data nilai Km dan Vmaks tersebut dapat dilihat pada tabel 5.4 dan gambar 5.5 berikut :



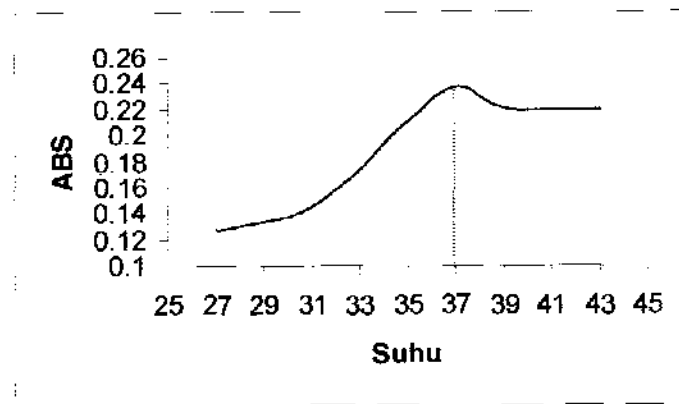
Gambar 5.5. Plot Lineweaver-Burk dari hyaluronidase (Sigma) sebelum dan sesudah purifikasi parsial

Tabel 5.4. Data kinetic hyaluronidase sebelum dan sesudah purifikasi parsial

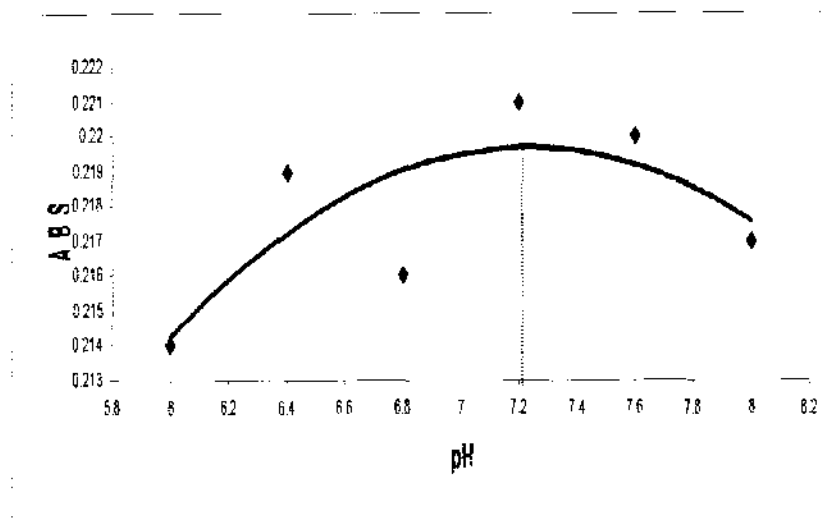
Sampel Hyaluronidase	Nilai Km (mM)	Nilai Vmaks (U)
Crude enzim	2,94	1,48
Hasil dialisa	3,18	1,51

5.4. Hasil Karakterisasi Parsial Hyaluronidase

Karakterisasi hyaluronidase secara parsial yang dilakukan meliputi suhu optimum, pH optimum dan berat molkul. Pengukuran suhu optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim-substrat pada suhu yang berbeda-beda antara 27 – 43°C, sedangkan untuk pengukuran pH optimum dilakukan dengan penggunaan buffer berbagai pH (antara 6 – 8) untuk melarutkan enzim maupun substratnya. Hasil pengukuran absorbansinya dapat dilihat pada gambar 5.5 dan 5.6.



Gambar 5.6. Pengukuran absorbansi pada rentang suhu 27 – 45°C



Gambar 5.7. Pengukuran absorbansi pada rentang pH 6 – 8

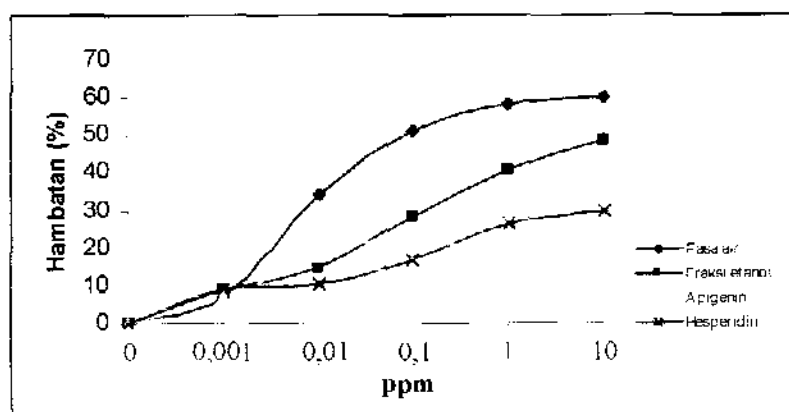
5.3. Hasil Pengukuran Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase

Data pengukuran absorbansi pada masing-masing kelompok perlakuan serta hasil perhitungan kadar Glukosamin N-asetat hasil hidrolisa substrat asam hyaluronat oleh hyaluronidase testis sapi dengan perlakuan kontrol, apigenin, fasa air dan fraksi etanol gandarusa berbagai kadar dapat dilihat pada tabel 5.5 dan gambar 5.8.

Tabel 5.5. Data pengukuran absorbansi pada λ 585 nm dan perhitungan kadar Glukosamin N-asetat oleh hyaluronidase testis sapi dengan perlakuan

Perlakuan (ppm)		Absorbansi	Aktivitas Total (μ l/unit)	Penghambatan (%)
Kontrol	0	0,123	0,584	0
Fasa Air	0,001	0,115	0,543	7,06
	0,01	0,084	0,383	34,41
	0,1	0,065	0,285	51,16
	1	0,057	0,244	58,22
	10	0,055	0,234	59,98
Fraksi Etanol	0,001	0,113	0,532	8,82
	0,01	0,106	0,496	15,00
	0,1	0,091	0,419	28,23
	1	0,077	0,347	40,58
	10	0,068	0,301	48,51
Apigenin	0,001	0,116	0,543	7,06
	0,01	0,103	0,481	17,64
	0,1	0,096	0,445	23,82
	1	0,095	0,439	24,70
	10	0,095	0,439	24,70
Hesperidin	0,001	0,113	0,532	8,82
	0,01	0,111	0,522	10,59
	0,1	0,104	0,486	16,76
	1	0,093	0,429	26,46
	10	0,089	0,409	29,99

a = Satu unit aktivitas hyaluronidase adalah sejumlah enzim yang mengkatalisa pembentukan 1 μ mol produk Glukosamin N-asetat per menit pada suhu 37°C



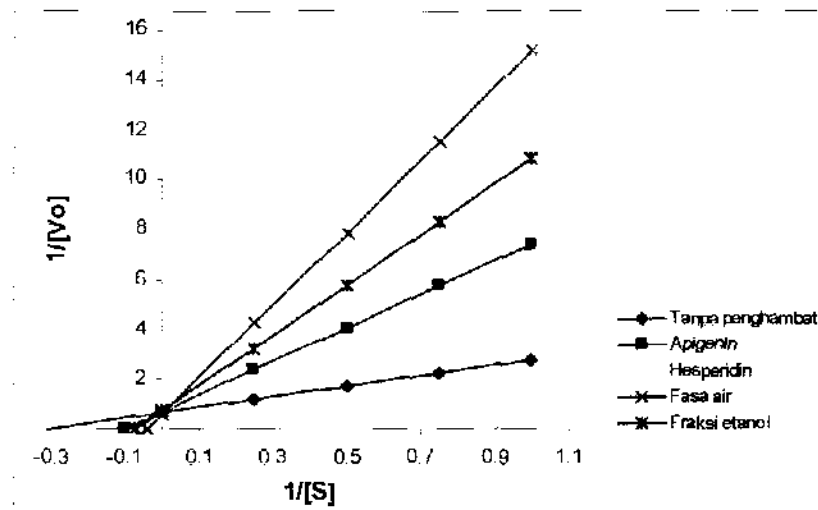
Gambar 5.8. Grafik penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dan fraksi etanol gandarusa, apigenin dan hesperidin

5.4. Hasil Uji Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase

Data kinetik hyaluronidase dengan uji tipe penghambatan aktivitas hyaluronidase, yaitu oleh apigenin, hesperidin, fasa air dan fraksi etanol daun gendarusa dengan dosis masing-masing 1 ppm, dapat dilihat pada tabel 5.6 dan grafik gambar 5.9.

Tabel 5.6. Data kinetik (nilai K_m dan V_{maks}) hyaluronidase testis sapi dengan beberapa inhibitor

Inhibitor	K_m (mM)	V_{maks} (U)
Tanpa Inhibitor	3,175	1,512
Apigenin	9,113	1,392
Hesperidin	18,347	1,717
Fraksi Etanol	13,94	1,381
Fasa Air	20,98	1,447



Gambar 5.9. Grafik uji tipe penghambatan aktivitas hyaluronidase

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Ekstraksi dan Fraksinasi Daun *Justicia gendarussa* Burm.f

Pada penelitian ini, tanaman diperoleh dari Desa Jolopeto Pacet, Mojokerto, dan telah dilakukan determinasi di Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi, Bagian Bahan Alam, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Serbuk kering daun gendarusa diekstraksi secara maserasi dan perkolasi dengan pelarut *n*-heksan dan dimodifikasi dengan pengadukan, dengan harapan lemak-lemak, lilin dan klorofil tersari oleh pelarut ini. Selanjutnya residu diekstraksi kembali dengan cara yang sama, dengan menggunakan pelarut etanol 60%, karena dari hasil penelitian terdahulu diketahui bahwa flavonoid, khususnya Gendarusin A, paling banyak tertarik dengan menggunakan etanol 60%.

Ekstrak *n*-heksana dan etanol yang didapat diuapkan pada tekanan rendah menggunakan rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak etanol kental dan kemudian diuapkan sampai kering dalam almari asam sampai pH 3 – 4, yang bertujuan untuk menggaramkan alkaloid, sehingga ketika dilakukan partisi dengan kloroform – air, alkaloid akan tertarik ke dalam fasa air (1) dan flavonoid aglikon tertarik ke dalam fraksi kloroform. Pemisahan secara partisi dalam kloroform-air, bertujuan agar lemak-lemak, lilin dan klorofil yang belum tertarik atau tersari pada pelarut *n*-heksana dapat terekstraksi ke dalam pelarut kloroform. Fasa kloroform dan air dipisahkan, fasa air (1) yang diperoleh dibasakan sampai pH 9 – 10 untuk memisahkan alkaloid dengan flavonoid glikosida, sehingga saat dilakukan partisi kloroform-air yang kedua, alkaloid akan masuk ke dalam fraksi kloroform, sedangkan flavonoid glikosida, termasuk Gendarusin A, akan masuk ke dalam fasa air (2).

Fasa air (2) dipisahkan dari fasa kloroform, dan kemudian dikeringkan dengan *Freeze drying*.

Dari berat awal serbuk daun gandarusa 4670 gram, diperoleh fraksi etanol sebanyak 1007 gram atau 21,56% dan fasa air sebanyak 599,87 gram atau 12,84%.

6.2. Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase

Dalam setiap langkah yang dilakukan untuk enzim hyaluronidase, mulai dari presipitasi, *desalting*, maupun penentuan efek penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dari fraksi etanol daun gandarusa, memerlukan penentuan aktivitas hyaluronidase. Banyak metode dikembangkan untuk menentukan aktivitas enzim hyaluronidase. Metode pertama digunakan dasar karakteristik fisikokimia substrat dan produk degradasi enzim tersebut. Pada metode fisikokimia dasar pengurangan viskositas dan kekeruhan asam hyaluronat karena kerja enzim hyaluronidase dan aktivitasnya dinyatakan sebagai pengurangan unit viskositas dan kekeruhan. Metode ini sangat berguna untuk menentukan aktivitas berbagai sumber hyaluronidase tetapi relatif tidak sensitif dan tidak praktis.

Metode lain yang dikembangkan adalah metode kimia dengan menggunakan pereaksi kimia untuk membantu menganalisa jumlah produk yang terbentuk atau sisa substrat yang masih tersisa karena kerja hyaluronidase. Metode kimia yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya adalah metode Morgan-Elson, ncokuprina, Elisa, kolorimetrik dan lempeng mikro. Metode-metode tersebut masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan. Pada penelitian ini digunakan metode kolorimetri Morgan-Elson untuk mengetahui aktivitas hyaluronidase testis sapi, karena praktis, mempunyai sensitivitas tinggi, waktu analisa cepat, memerlukan

jumlah substrat dan sampel enzim sedikit dan memberikan fleksibilitas yang cukup pada desain percobaan.

Pada metode kolorimetri Morgan-Elson substrat asam hyaluronat dengan ditambahkan bahan-bahan penghambat pada perlakuan, dipre-inkubasi terlebih dahulu untuk mengoptimalkan suhu inkubasi. Setelah sampel enzim ditambahkan, campuran enzim-substrat ini diinkubasikan selama 20 menit, dan reaksi enzimatik dihentikan dengan dimasukkan kedalam air mendidih. Penambahan reagen tetraborat memberikan suasana basa dan pada suhu 100°C akan mengubah ujung struktur Glukosamin N-asetat (GlcNAc) menjadi kromogen I dan II, dan selanjutnya menjadi kromogen III dengan adanya asam. Selanjutnya kromogen III akan bereaksi dengan *p*-dimetilaminobenzaldehid membentuk produk dengan warna ungu kemerahan, yang memberikan absorbansi pada panjang gelombang 585 nm (Lampiran 2) (Takahashi *et al.*, 2003).

Aktivitas hyaluronidase dapat diketahui dari pembentukan GlcNAc yang terhidrolisa dari substrat asam hyaluronat. Untuk mengetahui kadar GlcNAc maka dibuat kurva baku yang menghasilkan persamaan regresi $y = 22,791x - 0,2195$ dengan data absorbansi GlcNAc sebagai absis (x). Dari data persamaan regresi tersebut dapat diketahui kadar GlcNAc yang terhidrolisa oleh sampel hyaluronidase dengan memasukkan (intrapolasi) data absorbansi masing-masing kelompok perlakuan pada persamaan regresi tersebut.

Aktivitas katalitik hyaluronidase testis sapi dapat dinyatakan dalam bentuk unit yaitu jumlah enzim yang mengkatalisa pembentukan satu mikromol produk per menit, atau dalam bentuk katal yaitu jumlah enzim yang mengkatalisa pembentukan satu mol produk per detik. Aktivitas spesifik hyaluronidase dapat diketahui dari aktivitas katalitik per milligram protein. Karena kadar protein dalam sampel tidak

diketahui maka untuk perhitungannya dibandingkan dengan kadar protein standar. Pada penelitian ini digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai protein standar dan metode yang digunakan untuk analisa adalah metode Bradford (Lampiran 1) (Bio-Rad, 1984). BSA dipilih sebagai protein standar karena telah banyak protein yang dapat ditentukan perbandingannya, praktis dan murah.

6.3. Optimasi Panjang Gelombang Spektrofotometer dan Waktu Inkubasi

Hasil *scanning* panjang gelombang dari larutan standar GlcNAc berbagai konsentrasi yang dilakukan pada rentang λ 520 – 600 nm menunjukkan puncak pada λ 585 nm untuk masing-masing konsentrasi GlcNAc. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Takahashi *et al.* (2003), bahwa penggunaan panjang gelombang 585 nm akan memberikan absorbansi yang maksimum pada pengukuran produk warna reaksi Morgan-Elson.

Optimasi waktu inkubasi campuran enzim – substrat dilakukan dengan rentang waktu dari 0 – 120 menit. Hasil pengukuran aktivitasnya memperlihatkan adanya peningkatan aktivitas dengan tajam sampai waktu inkubasi 20 menit, diikuti relative stabilnya aktivitas dan meningkat kembali secara linier mulai 40 menit waktu inkubasi. Untuk efisiensi waktu percobaan, ditentukan 20 menit untuk waktu inkubasi, dan hal ini sesuai dengan yang dilakukan dalam penelitian Takahashi *et al.* (2003) bahwa aktivitas hyaluronidase meningkat secara tajam sampai 20 menit waktu inkubasi diikuti dengan penurunan akselerasi aktivitas secara linier.

6.4. Purifikasi Parsial Hyaluronidase

Hyaluronidase yang digunakan diperoleh dari Sigma dari jenis *Bovine Testes Hyaluronidase* berkode H – 3506 seri 37326 – 33 – 3 EC No. 253 – 464 – 3 , tipe I-S.

mempunyai kualifikasi serbuk liofilisasi, desikasi, 999 unit / mg padatan. Hasil SDS-PAGE dari *crude enzim*nya menunjukkan masih banyaknya protein lain di dalam serbuk liofilisasi tersebut yang kemungkinan mempunyai efek terhadap aktivitas hyaluronidase. Purifikasi parsial dilakukan dengan harapan protein-protein tersebut akan hilang / berkurang.

Purifikasi parsial yang dilakukan meliputi presipitasi *crude enzim* dengan ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan tingkatan 0 – 30% ; 30 – 50% dan 50 – 80% dan *desalting* dengan membrane dialisa. Tahapan purifikasiparsial ini menghasilkan hyaluronidase dengan aktivitas spesifik yang meningkat. Setelah mengalami purifikasi parsial total protein hyaluronidase sangat jauh berkurang, kemungkinan disebabkan hyaluronidase kurang dapat terkonsentrasi oleh ammonium sulfat sehingga proteinnya banyak berkurang ; sedangkan aktivitas spesifik hyaluronidase setelah purifikasi parsial meningkat. Purifikasi parsial juga meningkatkan kemurnian hyaluronidase 2,5 kali *crude enzim* dengan hasil 10,25% dari total hyaluronidase dalam *crude enzim*.

Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa kenyataan protein-protein antara *crude enzim* hyaluronidase maupun yang sudah mengalami dialisa hanya sedikit berbeda, yang menunjukkan bahwa adanya proses presipitasi dan dialisa belum dapat menghilangkan atau mengurangi protein-protein pegganggu dalam larutan hyaluronidase (Sigma). Hal ini didukung dengan data nilai Konstanta Michaelis-Menten (K_m) dan kecepatan reaksi maksimal (V_{maks}) antara *crude enzim* hyaluronidase maupun yang sudah mengalami dialisa yang juga hanya sedikit berbeda.

Nilai K_m *crude enzim* hyaluronidase adalah 2,94 yang berbeda jauh dengan nilai K_m hyaluronidase murni yaitu 0,46 – 0,55. Kemungkinan disebabkan kualitas

hyaluronidase yang menjadi sampel juga berbeda. Semakin tinggi kualitas enzim, semakin besar afinitasnya terhadap substrat, dan semakin kecil nilai K_m (Lauwers and Scharpe, 1997).

6.5. Karakterisasi Parsial Hyaluronidase

Pencentuan suhu optimum dilakukan dengan meng-inkubasi campuran enzim-substrat pada kisaran suhu antara 27 – 43°C. Dari hasil pengukuran aktivitas hyaluronidase, terlihat bahwa aktivitas tertinggi berada pada suhu 37°C. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Lauwers dan Scharpe (1997) bahwa suhu optimum bagi hyaluronidase adalah 37°C.

Untuk menentukan pH optimum, buffer phosphate yang digunakan baik untuk melarutkan hyaluronidase maupun substrat asam hyaluronat, terlebih dahulu diatur pH-nya dengan rentang antara 6 – 8. Hasil pengukuran aktivitas hyaluronidase menunjukkan bahwa aktivitas tertinggi berada pada pH 7,2.

Hyaluronidase dapat bekerja maksimal bila dalam kondisi optimal, untuk itu dilakukan pengendalian pH, waktu inkubasi, dan suhu inkubasi pada saat penyiapan sampel hyaluronidase. Hyaluronidase bekerja optimal pada pH 7,2 dan agar stabil kondisi pada range pH 7,2 maka sampel enzim maupun substrat asam hyaluronat dilarutkan dalam 0,1 M buffer K-phosphate pH 7,2 sedangkan suhu yang digunakan untuk inkubasi adalah 37°C. Lama waktu inkubasi pada penelitian ini adalah 20 menit, karena GlcNAc yang terhidrolisa oleh hyaluronidase meningkat secara linier setelah 15 menit waktu inkubasi (Lampiran 3).

6.6. Pengukuran Efek dan Tipe Penghambatan Aktivitas Hyaluronidase

Aktivitas hyaluronidase dapat dipengaruhi dan dihambat oleh senyawa-senyawa tertentu, misalnya senyawa golongan flavonoid. Dalam penelitian ini digunakan empat jenis senyawa penghambat yaitu apigenin, hesperidin, fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa. Penurunan aktivitas katalisa hyaluronidase testis sapi yang disebabkan oleh adanya senyawa penghambat dinyatakan dalam prosentase penghambatan, yang ditentukan menggunakan substrat asam hyaluronat dengan lima tingkat variasi konsentrasi masing-masing senyawa penghambat.

Hasil perhitungan aktivitas total dari hyaluronidase sampel menunjukkan bahwa fasa air dapat lebih menghambat aktivitas hyaluronidase dibandingkan dengan fraksi etanol, hesperidin maupun apigenin dengan penghambatan reaksi enzimatik sebesar hamper 60% (penghambatan apigenin 24,5%, hesperidin 30% dan fraksi etanol sebesar 48,5%).

Penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air terlihat lebih tinggi dibandingkan penghambatan oleh apigenin, hesperidin maupun fraksi etanol. Sedangkan penghambatan oleh fraksi etanol juga lebih tinggi dari penghambatan apigenin dan hamper menyamai hesperidin. Reaksi penghambatan oleh kedua senyawa (fraksi etanol dan fasa air) hasil ekstraksi daun gandarusa tersebut kemungkinan terjadi karena adanya gugus gula pada struktur gendarusin A maupun B yang terkandung dalam fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa, yang bersaing dengan ujung GlcNAc pada substrat asam hyaluronat untuk berkaitan dengan sisi aktif hyaluronidase.

Dari data kinetik hyaluronidase dengan menggunakan senyawa penghambat spigenin, hesperidin, fraksi etanol dan fasa air daun gandarusa masing-masing 1 ppm,

terlihat bahwa V_{maks} hyaluronidase dari keempat perlakuan penghambatan tersebut tidak berbeda jauh dengan control (hyaluronidase tanpa senyawa penghambat).

Untuk menentukan apakah penghambatan enzim tersebut bersifat kompetitif atau nonkompetitif dilakukan Uji Kinetika dengan pemetaan kebalikan ganda data kecepatan enzim. Dua rangkaian percobaan kecepatan reaksi dilakukan ; konsentrasi enzim dijaga tetap pada kedua percobaan. Pada salah satu rangkaian, konsentrasi substrat dijaga tetap dan pengaruh peningkatan konsentrasi penghambat terhadap kecepatan awal v_o ditentukan dengan pengukuran yang sesuai. Pada percobaan lain, konsentrasi penghambat dijaga tetap, dan konsentrasi substrat diubah-ubah. Kebalikan ($1 / v_o$) dari kecepatan reaksi v_o dipetakan terhadap kebalikan konsentrasi substrat [S], yaitu $1 / [S]$ (Lehninger, 1982).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penghambatan aktivitas hyaluronidase oleh fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa tersebut bersifat kompetitif reversibel. Hal ini sesuai dengan Tung *et al.* (1994) serta Lauwers dan Scharpe (1997) yang menyatakan bahwa apigenin maupun hesperidin merupakan senyawa penghambat aktivitas hyaluronidase dengan tipe penghambatan kompetitif reversible.

Hal ini membenarkan hipotesis penelitian ini, yaitu fasa air dan fraksi etanol daun gandarusa dapat menghambat aktivitas hyaluronidase testis sapi dengan tipe penghambatan kompetitif reversible, dan sesuai dengan ketentuan bahan kontrasepsi yang ideal dari segi enzimatis, yaitu bersifat reversibel, sehingga bahan aktif dari gandarusa tersebut nantinya dapat dipergunakan sebagai bahan kontrasepsi.

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100

BAB 7

PENUTUP

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa

1. Fasa air gandarusa mempunyai efek penghambatan aktivitas hyaluronidase yang paling tinggi dibandingkan dengan fraksi etanol gandarusa, apigenin maupun hersperidin
2. Fasa air gandarusa mempunyai tipe penghambatan kompetitif reversibel terhadap aktivitas hyaluronidase, sehingga secara enzimatik memenuhi syarat untuk digunakan sebagai bahan kontrasepsi.

7.2. Saran

Untuk lebih mengembangkan ilmu pengetahuan dan penggunaan praktis dari bahan aktif gendarusin dalam fasa air gandarusa tersebut, perlu nantinya dilakukan penelitian lanjutan tentang kadar optimal dari fasa air dan fraksi etanol gandarusa tersebut dalam menghambat aktivitas hyaluronidase, dan juga penerapan langsung terhadap spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2004. *Tanaman Obat Indonesia*. http://iptek.net.id/ind/cakra-obat/tanaman_obat.php
- Alberts, B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., 1994. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition, Garland Publishing, Inc., New York, pp. 1030 – 1034.
- Armstrong, F.B., 1995. *Buku Ajar Biokimia*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Backer, C.A. and Van den Brink Jr., R.C.B., 1965. *Flora of Java (Spermatophytes Only)* Vol. III. NVP. Noordhoff Groningen, Netherland, p. 589 – 590.
- Bailey, L.H., 1963. *The Standard Cyclopedia of Horticulture*, Volume I AE & Volume II F. The Macmillan Company, New York.
- Bio-Rad, 1984, *Bio-Rad Protein Assay*, Bulletin 1069, 2200 Wright Avenue, Richmond, CA 94804.
- Cammel, RJP., 1998. *Natural Product Isolation*. Humara Press, Inc., New Jersey. pp. 344.
- Chakravarty, A.K., Dastidar, P.P.G. and Pakrashi, S.C., 1982. Simple Aromatic Amines from *Justicia gendarussa*. ¹³C NMR spectra of the bases and their analogues. *Tetrahedron* Vol. 18 No. 12. pp. 1797 – 1802.
- Cherr, G.N., Meyers, S.A., Yudin, A.I., VandeVoort, C.A., Myles, D.G., Primakoff, P. and Overstreet, J.W., 1996. The PH-20 Protein in *Cynomolgus* Macaque Spermatozoa : Identification of Two Different Forms Exhibiting Hyaluronidase Activity. *Developmental Biology* 175, 142 – 153.
- Dalimartha, S., 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid I, Trubus Agriwidya, Jakarta. p. 62.
- Dandekar, P., Aggeler, J. and Talbot, P., 1992. Structure, Distribution and Composition of the Extracellular Matrix of Human Oocytes and Cumulus Masses. *Hum.Reprod.* 7 : 391.
- Gaspersz, V., 1994. *Metode Perancangan Percobaan*. Penerbit CV Armico, Bandung.

- Guyton, A.C. and Hall, J.E., 1997. *Fisiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Harborne, J.B., 1988. Flavonoid in the Environment : Structure – Activity Relationships in Plant Flavonoids in Biology and Medicine II : *Biochemical, Cellular and Medicine Properties* (Vivian Cody et.al., Eds). Alan R.Liss, Inc. p. 17 – 27.
- Hartati, A., Sutarjadi, Prajogo, B. dan Onny, P., 1997. Pengaruh Pemberian per-oral Ekstrak Diklormetan dan Ekstrak Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees terhadap Spermatozoa Epididimis Mencit. *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX*, Yogyakarta.
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III. Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, hlm. 1759.
- Ikegami-Kawai, M. and Takahashi, T., 2002. Microanalysis of Hyaluronan Oligosaccharides by Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Its Application to Assay of Hyaluronidase Activity. *Analytical Biochemistry* 311, 157 – 165.
- Keeton, W.T., 1980. *Biological Science*, 3rd Ed., WW Norton & Co., New York. pp. 697 – 699.
- Kusumarini, S.L., 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees thd Aktivitas Enzim Hialuronidase Spermatozoa pada Kumulus Ooforus Ovum Manusia – In Vitro. *Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya*.
- Lace, D., Iavessen H., Gacesa P., 1990. The Effects of Deglycosylation on the Properties of Native and Biotinylated Bovine Testicular Hyaluronidase. *Carbohydr. Res.* 208 – 306.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680 – 685.
- Lauwers, A., and Scharpe, S., 1997. *Pharmaceutical Enzymes*. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Lehninger, A.L., 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Penerbit Erlangga, Jakarta.

- Lestari, S., Sutarjadi, Hinting, A. dan Prajogo, B., 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap aktivitas Enzim Hyaluronidase Spermatozoa pada Kumulus Oophorus Ovum Manusia *in vitro*. *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX*, Yogyakarta.
- Linker, A., 1974. *Hyaluronidase. Method of Enzymatic Analysis*. (H.U. Bergmeyer, Ed.) 2nd Ed., Vol. 2, Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc New York and London. p. 943 – 948.
- Manitto, P., 1981. Biosintesis Produk Alami. IKIP Semarang Press, Semarang.
- Markham, K.R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit ITB, Bandung. hlm. 1 – 10.
- Martin, DW., Mayes, PA., Rodwell, VW. and Granner, DK., 1987. *Harper's Review of Biochemistry*. Lange Medical Publ., Drawer L, Los Altos, California.
- McClellan, D. and Rowland, IW., 1942. Role of Hyaluronidase in Fertilization. *Nature* 150 : 627.
- Meyer, K., Hoffman, P. and Linker, A., 1960. *Hyaluronidase. The Enzymes* 2nd Edition. (P.D. Boyer, Eds). Vol. 4. Academic Press, New York and London. p. 447 – 459.
- Middleton Jr. F., 1984. The Flavonoids. *TIPS (Agustus)* : 335 – 338. Elviesier Science Publishers BV.
- Mio, K. and Stern, R., 2002. *Inhibitors of the Hyaluronidases*. Mini Review, *Matrix Biology* 21, 31 – 37. www.elsevier.com/locate/matbio.
- Moeso, S. dan Agus, P., 1985. *Laporan Perjalanan ke Jayapura Sentani (Irian Jaya)*. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta. p.19.
- Montgomery, R., Conway, T.W. and Spector, A.A., 1992. *Biokimia : Berorientasi pada Kasus-Klinik*. Binarupa Aksara, Jakarta.
- Prajogo, BEW. dan Pramono, S., 1989. Isolasi Glikosida Flavonoid dari Daun Gandarusa (*Justicia gendarussa* Burm.f.). *Simposium Penelitian Tumbuhan Obat VI*, Jakarta.
- Prajogo, BEW., Emmy, K., Suhartono, Imam, R., Noor, I. And Santa, IGP., 1994. Bioactivity Study on Decoction and Extracts of *Justicia gendarussa* Burm.f. *ASOMPS VIII. UNESCO*, Melaka, Malaysia.

- Prajogo, BEW., Khoiril, A., Santa, IGP. dan Socharno, 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap Spermatogenesis mencit. *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX*, Yogyakarta.
- Prajogo, BEW., Elvi, S.S., Santa, IGP. dan Onny, P.S., 1998^a. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap Fungsi Epididimis Kelinci. *POKJANAS TOI XVIII*, Malang.
- Prajogo, BEW., Matty, N.S., Santa, IGP. dan Onny, P.S., 1998^b. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap Aktivitas Enzim Akrosin Spermatozoa Kelinci, *POKJANAS TOI XVIII*, Malang.
- Prajogo, BEW., Widjiati, Lukman, E.M, 1999. Uji Toksisitas Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap Gambaran Darah dan Histopatologis Hati, Ginjal dan Usus Mencit Jantan. *Lembaga Penelitian Unair*, Surabaya.
- Prajogo, BEW., Eka, Y.M., Hamdani, L. Widjiati dan Cholies, N., 2001^a. Pengaruh Hesperidin pada Aktivitas Hyaluronidase Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan*, Vol. 17, No.1, April, hal. 1– 8.
- Prajogo, BEW., Ekasari, W., Hamdani, L., Widjiati, Hinting, A., Mulja, H.S. dan Cholies, N., 2001^b. Potensi *Gendarussa vulgaris* Nees. sebagai Bahan Kontrasepsi Pria. *Penelitian kerjasama antara BKKBN Pusat dan Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi Unair*, Surabaya.
- Prajogo, BEW., Eka, Y., Sugiharto, B. dan Tri H., 2002. Optimazation of Mouse Sperm Hyaluronidase Activity Measurement by Microplate Assay Method. *Kongres 1 dan Seminar Nasional Bioteknologi Reproduksi*, Malang.
- Prajogo, BEW., 2002. Aktivitas Antifertilitas Flavonoid *Justicia gendarussa* Burm.f. *Disertasi Program Pascasarjana Unair*, Surabaya.
- Prajogo, BEW., 2003. Aktivitas *Gendarussa vulgaris* Nees. sebagai Bahan Kontrasepsi Pria (Aspek Farmakologi dan Toksikologi), *Laboratorium Botanifarmasi-Farmakognosi Unair*, Surabaya
- Reza, SSA., 2004. Penetapan Kadar Gendarusin A dalam Fraksi Etanol 60% dan Fasa Air Daun *Gendarussa vulgaris* Nees dengan Metode HPLC. *Skripsi Fakultas Farmasi Unair*, Surabaya.

- Siti, S., 1995. Khasiat Gandarusa sebagai Obat Tradisional. *Warta APINMAP Indonesia*. Tahun V, Vol. V, No. 1, 8 – 9.
- Takahashi, T., Ikegami-Kawai, M., Okuda, R. and Suzuki, K., 2003. A Fluorimetric Morgan-Elson Assay Method for Hyaluronidase Activity. *Analytical Biochemistry* 322, 257 – 263.
- Tjitrosoepomo G., 1991. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjahmada University Press, Yogyakarta . hlm. 371 – 372.
- Tung, J., Mark, G.E. and Hollis G.F., 1994. A Microplate Assay for Hyaluronidase and Hyaluronidase Inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 223, 149 – 152.
- Van Steenis, C.G.G.J., 1997. *Flora of Java*. PT Pradnya Paramita, Jakarta. hlm. 383
- Wahi, A.K., Wahl, S.P. and Kapoor, R., 1974. Chemical Study of the Leaf of *Justicia gendarussa* Burm.f. *Journal Res. Medicine*. 9 : 1.65 – 66.
- Wahyudi, R., Sutarjadi, Prajogo, B. dan Hinting, A., 1997. Pengaruh Ekstrak Diklormetan dan Metanol Daun *Gendarussa vulgaris* Nees. terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Spermatozoa Manusia *in vitro*. *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami IX*, Yogyakarta.
- Webb, E.C., 1992. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, Inc, New York.
- Zaneveld, LJD, 1976. *Sperm enzyme Inhibitors un Antifertility Agents*, in : *Human Semen and Fertility Regulation in Men*, Editor : Hafedz, ESE. CV Mosby Company, London. pp 576-78.

LAMPIRAN

Lampiran 1.

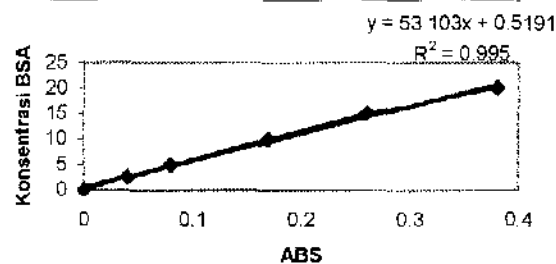
Penentuan Kadar Total Protein Terlarut

Penentuan kadar Total Protein Terlarut menggunakan metode Bradford dengan Bovine Serum Albumine (BSA) sebagai standar (Bio-Rad, 1984). Prosedur analisa :

1. Pembuatan reagen Bradford : Coomassie Brilliant Blue G-250 sebanyak 100 mg dilarutkan dalam etanol 95% dan ditambah asam fosfat 85%. Setelah larut ditambahkan aquadest sampai volume 1 L.
2. 0,005 ml sampel protein ditambah 1 ml reagen Bradford dan di-vorteks, kemudian dibiarkan selama 5 menit dan diamati pada 595 nm.

Tabel 1. Data Pengukuran absorbansi Bovine Serum Albumin (BSA) pada berbagai konsentrasi setelah direaksikan dengan Coomasie Blue pada λ 595 nm

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbansi
0	0
2,5	0,04
5	0,09
10	0,18
15	0,27
20	0,38



Gambar 1. Kurva Standar BSA

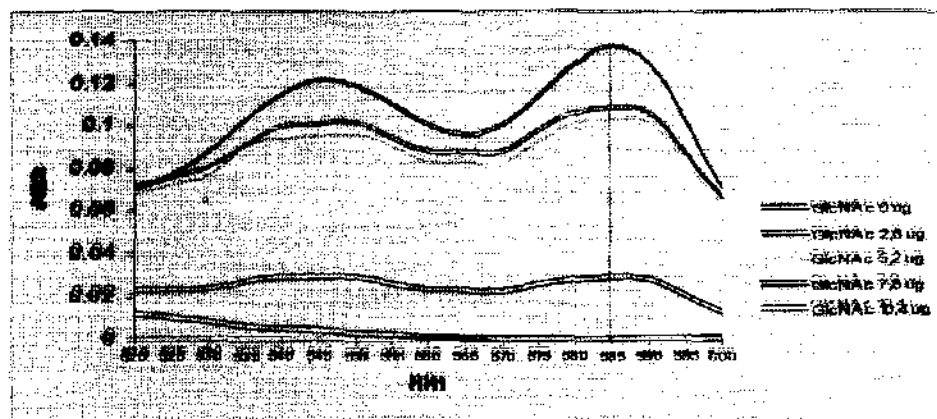
Lampiran 2.

**Optimasi Panjang Gelombang Spektrofotometer
Pada Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase Metode Morgan-Elson**

Untuk optimasi panjang gelombang spektrofotometer pengukuran aktivitas hyaluronidase dengan metode kolorimetri Morgan-Elson, *scanning* larutan standar Glukosamin N-asetat berbagai konsentrasi dilakukan pada rentang λ 520 – 600 nm (Takahashi *et al.*, 2003). Hasilnya dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut :

Tabel 2. *Wavelength Scan*

λ (nm)	Absorbansi Glukosamin N – asetat				
	0 mg / ml	2.6 mg / ml	5,2 mg / ml	7,8 mg / ml	10,4 mg / ml
520	0.012	0.023	0.069	0.071	0.072
525	0.010	0.023	0.073	0.076	0.077
530	0.008	0.024	0.078	0.081	0.088
535	0.006	0.027	0.091	0.091	0.103
540	0.005	0.029	0.095	0.100	0.115
545	0.004	0.029	0.096	0.101	0.122
550	0.003	0.029	0.097	0.102	0.119
555	0.002	0.026	0.091	0.095	0.110
560	0.001	0.023	0.084	0.088	0.101
565	0.001	0.023	0.084	0.088	0.096
570	0.000	0.022	0.083	0.088	0.101
575	0.000	0.026	0.093	0.098	0.114
580	0.000	0.029	0.102	0.107	0.129
585	0.000	0.029	0.102	0.107	0.138
590	0.000	0.028	0.102	0.108	0.129
595	0.000	0.020	0.083	0.087	0.103
600	0.001	0.013	0.064	0.067	0.072



Gambar 2. *Scanning* panjang gelombang spektrofotometer λ 520 -600

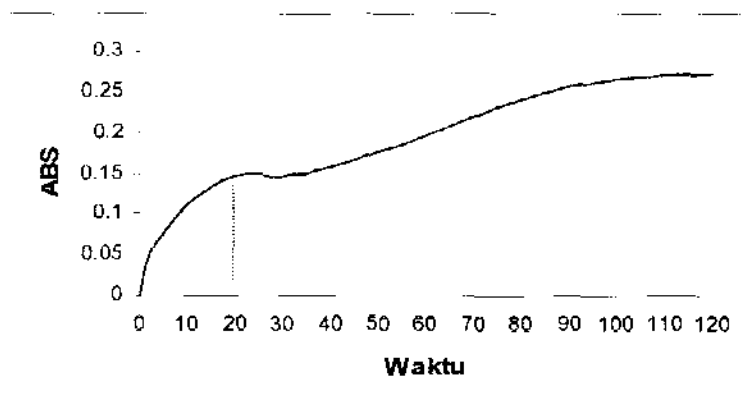
Lampiran 3.

Optimasi Waktu Inkubasi pada Pengukuran Aktivitas Hyaluronidase Metode Morgan-Elson

Untuk optimasi waktu inkubasi campuran enzim substrat, dilakukan pengukuran aktivitas hyaluronidase yang diinkubasikan pada rentang waktu tertentu dengan metode kolorimetri Morgan – Elson. Hasilnya dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut :

Tabel 3. Absorbansi aktivitas hyaluronidase dengan waktu inkubasi 0 – 120 menit

Subu	Absorbansi (λ 585 nm)	
	I	II
0	0.000	0.000
2	0.050	0.050
10	0.120	0.104
20	0.146	0.149
40	0.161	0.153
60	0.198	0.198
80	0.225	0.257
100	0.279	0.254
120	0.273	0.272



Gambar 3. Pengukuran absorbansi pada rentang waktu inkubasi 0 – 120 menit

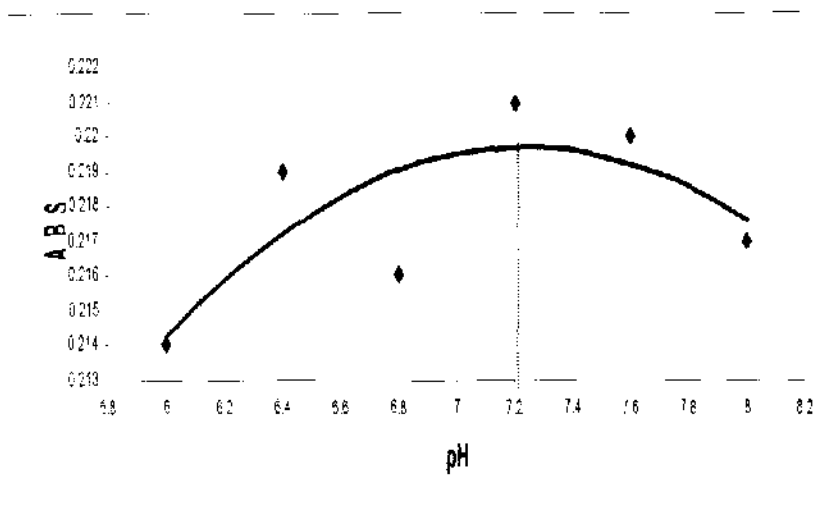
Lampiran 4.

Optimasi pH

Untuk optimasi pH, dilakukan pengukuran aktivitas hyaluronidase dengan buffer pada rentang pH tertentu menggunakan metode kolorimetri Morgan – Elson. Hasilnya dapat dilihat pada tabel dan gambar berikut :

Tabel 4. Absorbansi aktivitas hyaluronidase dengan pH buffer 6 - 8

pH	Absorbansi (λ 585 nm)	
	I	II
6	0.212	0.216
6.4	0.218	0.220
6.8	0.214	0.218
7.2	0.219	0.223
7.6	0.221	0.219
8	0.218	0.216



Gambar 4. Pengukuran absorbansi pada rentang pH 6 – 8