



Fraksinasi dan Antioksidan dari Ekstrak Protein Spons *Haliclona* sp. Asal Perairan Spermonde Sulawesi Selatan

Fractination and Antioxidant from Protein Extract Of Haliclona sp. Sponges From Spermonde Waters of South Sulawesi

Warsidah¹, Mega Sari Juane Sofiana¹, Ikha Safitri¹, Syarif Irwan Nurdiansyah¹

¹ Program Studi Ilmu Kelautan FMIPA Universitas Tanjungpura, Jl. Prof. Dr. Hadari Nawawi, Pontianak, Indonesia, 78124

ABSTRAK

Spons *Haliclona* sp. adalah salah satu anggota dari filum porifera kelas demospongia yang ditemukan hidup di perairan terumbu karang Spermonde Sulawesi Selatan. Interaksinya dengan berbagai mikroorganisme yang hidup di perairan menyebabkan terbentuknya berbagai macam struktur senyawa aktif dan aktivitas biologik yang penting dalam dunia kesehatan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengekstraksi dan memfraksinasi protein dari spons *Haliclona* sp asal perairan Spermonde melalui reaksi pengendapan dengan menggunakan ammonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan, dan menentukan kadar dan aktivitas antioksidan dari protein dalam masing-masing fraksi. Fraksi 1 (0-30%) memiliki kandungan protein yang tertinggi yaitu 0,143 mg/L. Aktivitas antioksidan tertinggi juga ditunjukkan oleh Fraksi 1 dengan nilai IC₅₀ 78,11 mg/L dengan kategori antioksidan sedang.

ABSTRACT

Sponge Haliclona sp. is a member of the phylum Porifera class Demospongia in the Spermonde coral reefs of South Sulawesi. Its interaction with various microorganisms that live in the waters causes the formation of several types of active compounds and biological activities that are important in the world of health. This study aimed to extract and fractionate protein from the Haliclona sp. sponge from Spermonde waters through precipitation using varied saturation level of ammonium sulfate. The fraction of protein was determined by the antioxidant activity using the DPPH method. The highest protein content was obtained by fraction 1 (0-30%) of 0.143 mg/L. The highest antioxidant activity was shown by fraction 1 with IC₅₀ 78.11 mg/L. It was categorized as having moderate antioxidant activity.

Kata kunci/keyword: Antioksidan, *Haliclona* sp., protein, spons, Spermonde, *Antioxidant*, *sponges*.

INFO ARTIKEL

Received: 02 June 2023;

Revised: 18 June 2023;

Accepted: 26 June 2023

* coresponding author: warsidah@fmipa.untan.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.22437/jisic.v15i2.25557>

PENDAHULUAN

Potensi sumber daya hayati laut meliputi tumbuhan, hewan dan mikroorganismenya telah menarik minat para peneliti, khususnya terkait penelitian pangan dan senyawa bioaktif. Biota di perairan laut sebanyak 5.000.000 spesies terdistribusi dalam 30 filum berbeda dan dengan garis pantai sepanjang sekitar 3.120.000 km, volume perairan $137 \text{ km}^3 \times 106 \text{ km}^3$ telah menjadikan lautan dunia sebagai ekosistem terbesar di bumi (Martis *et al.*, 2011). Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati laut terbesar di dunia (Abranches, 2020). Spons adalah salah satu biota laut, berupa hewan yang tumbuh di terumbu karang yang tersebar di seluruh perairan nusantara. Spons dikenal juga sebagai *reservoir* untuk mikroba laut yang keberadaannya sekitar kurang lebih 60% dari total biomassa sponsnya. Penelitian terkait aktivitas farmakologis dari spons telah banyak dilaporkan, di antaranya adalah anti-tumor, jamur, virus dan bakteri, sejumlah besar di antaranya sudah dalam tahap pengujian praklinis (Newman and Cragg, 2004).

Mikroba simbiosis biota laut termasuk spons dapat menghasilkan senyawa yang mampu merespon perubahan lingkungan yang ekstrim melalui mekanisme pertahanan tubuh. Spons memiliki kemampuan berasosiasi dengan banyak mikroorganisme yang berbeda seperti *cyanobacteria*, bakteri heterotrofik dengan potensi aktivitas farmakologis (Hentschel *et al.*, 2002). Interaksi antara spons dan bakteri sifatnya adalah komensalisme dan berpotensi menghasilkan produk senyawa bioaktif (Roy *et al.*, 2000). Metabolit mikroba berasosiasi dengan invertebrata laut memiliki struktur dan aktivitas yang

mirip dengan inangnya (Proksch *et al.*, 2002; Putri *et al.*, 2015). Beberapa aktivitas mikroba simbiosis spons telah dilaporkan antara lain fungi *Gymnascela* dan *Kaliensis* yang berasosiasi spons *Halichondria japonica* memiliki aktivitas sitotoksik sehingga berpotensi digunakan untuk antikanker (Bugni & Ireland, 2004). Senyawa-senyawa seperti seskuiterpenoid jenis bisabolen, curcuphenol, dan kurkudiol dihasilkan dari mikroba simbiosis spons *Axynissa* sp. Simbiosis spons *Axynissa* spp ini memiliki aktivitas dalam menghambat sintesis protein kinase pada pengujian anti kanker secara *in vitro* (Hertiani *et al.*, 2008). Penemuan senyawa baru juga telah ditemukan dari spons *Theonella swinhoei* asal perairan Spermonde Sulawesi Selatan. Senyawa tersebut adalah senyawa polipeptida siklik yang dinamai dengan barrangamida (Roy *et al.*, 2000).

Haliclona sp adalah salah satu spesies spons yang tumbuh di perairan Spermonde Sulawesi Selatan. Informasi ilmiah tentang spesies *Haliclona* sp ini masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian tentang isolasi protein dan aktivitas biologis dari spons tersebut perlu dilakukan. Ekstrak metanol dari spons *Haliclona* sp. asal perairan Lemukutan Kalimantan Barat telah dilaporkan memiliki potensi anti kanker dengan toksisitas (LC_{50}) yang dihasilkan sebesar 70,1 ppm. Hasil uji fitokimia dari ekstrak metanol tersebut menunjukkan bahwa spons *Haliclona* sp. mengandung gugus alkaloid dan steroid (Kurniawan *et al.*, 2021). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein dari spons *Haliclona* sp. menggunakan metode pengendapan dengan ammonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan dan dialisis dengan

menggunakan membran selofan, serta menentukan aktivitas antioksidan dari ekstrak protein kasar yang diperoleh,

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Visible, alat sentrifugasi, blender, corong buchner, pompa vakum dan peralatan gelas secara umum. Bahan-bahan yang digunakan antara lain adalah Tris-HCl 0,1 M-pH 8,3, NaCl 2M, CaCl₂ 0,01 M, B-merkaptotanol 1%, Triton X-100 0,5%, ammonium sulfat, Na-bikarbonat, EDTA, membran selofan.

Penyiapan dan ekstraksi protein kasar

Sampel spons *Haliclona* sp diambil dari perairan Spermonde Sulawesi Selatan. Sampel dibersihkan dari pasir dan lumpur dan kemudian dicuci dengan air mengalir. Sampel selanjutnya dihaluskan dan ditambahkan buffer A (0,1 M Tris-HCl pH 8,3; 2 M NaCl; 0,01 M CaCl₂; 1% B-merkaptotanol; Triton X-100 0,5%). Sampel kemudian disimpan pada suhu 4°C selama 1x24 jam. Larutan sampel disaring menggunakan corong Buchner. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dibekukan kemudian dicairkan selama siklus 2-3 kali. Filtrat kembali disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan yang mengandung protein kasar ini disimpan pada suhu dingin sebelum melakukan tahapan pengerjaan fraksinasi protein.

Fraksinasi dengan amonium sulfat

Fraksinasi protein kasar dari spons *Haliclona* sp. menggunakan ammonium

dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH.

sulfat pada tingkat kejenuhan (0-90%) seperti metode yang dilakukan oleh (Bollag et al., 1996). Pengendapan protein dengan ammonium sulfat dilakukan pada tingkat kejenuhan 0-30%; 30-50%; 50-70%, dan 70-90%. Ekstrak kasar protein ditambahkan dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai benar-benar larut dan dibiarkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Hasil dari masing-masing proses pengendapan disentrifugasi dengan putaran 6.000 rpm, 4°C selama 30 menit untuk memisahkan endapan dan selanjutnya fraksi protein kasar yang sudah diendapkan dilarutkan kembali dalam larutan buffer Tris-HCl pH 8,3.

Dialisis

Dialisis menggunakan membran selofan (Sigma D 0655). Membran berukuran 10 cm dipanaskan dalam larutan 2,0% (b/v) Na-bikarbonat dan 10 mM EDTA selama 10 menit (pengulangan 2-3 kali). Dialisis dilakukan selama tiga jam pada suhu dingin, dan larutan buffer diganti setiap 1 jam. Endapan dari setiap fraksi dengan tingkat kejenuhan amonium sulfat didialisis dalam beberapa buffer, yaitu: buffer B (0,1 M Tris-HCl pH 8,3; 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl₂), kemudian didialisis dengan buffer C (Tris HCl 0,01 M pH 8,3; 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl₂). Setiap fraksi protein dimasukkan dalam kantong plastik kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi buffer B, dan diaduk, selanjutnya mengganti buffer B dengan buffer C. Dialisis dilanjutkan sampai larutan atau fraksi protein sudah tidak memberikan warna. Fraksi protein yang diperoleh selanjutnya ditentukan kadar proteinnya dengan spektrofotometer

UV-Visibel menggunakan pembandingan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan melalui penangkapan radikal bebas DPPH oleh ekstrak protein yang terkandung dalam

HASIL DAN PEMBAHASAN

Adanya interaksi antara bakteri dengan spons laut menyebabkan spons sebagai invertebrata laut yang memiliki potensi aktivitas biologiknya sangat tinggi, terutama jika dibandingkan dengan organisme darat dan laut lainnya (Kanagasabhapathy et al., 2005). Kehadiran mikroba yang beraneka ragam dan kelimpahan yang cukup tinggi di dalam interaksinya dengan spons, diperkirakan menjadi sumber dari berbagai jenis dan jumlah dari senyawa aktif yang dikandungnya. Spons memiliki produktivitas tinggi dalam pembentukan berbagai jenis struktur senyawa melalui jalur biosintesis yang khusus (Taylor et al., 2007). Spons *Haliclona* sp adalah salah satu spesies spons dari golongan invertebrata, filum porifera dan kelas demospongia yang memiliki potensi bioaktif yang tinggi. Sejalan dengan penelusuran kandungan kimia dan aktivitas biologik dari beberapa biota laut asal perairan tersebut, *Haliclona* sp. termasuk spesies yang menjadi target beberapa kajian riset.

Ekstraksi protein dari *Haliclona* sp. dilakukan dengan menggunakan pelarut buffer A dan filtrat yang dihasilkan selanjutnya diendapkan dengan menggunakan ammonium sulfat yang kejenuhannya bervariasi, antara lain 0-30%; 30-50%; 50-70%, dan 70-90%. Jenis

sampel spons *Haliclona* sp. Fraksi protein masing-masing dibuat dalam beberapa konsentrasi (ppm), dan kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 517 nm. Asam askorbat digunakan sebagai pembandingan.

protein kasar akan terendapkan dalam masing-masing tingkat kejenuhan ammonium sulfat, dan selanjutnya hasil dari pengendapan kemudian didialisis dengan menggunakan membran selofan untuk memurnikan protein atau menghilangkan garam ataupun pelarut yang terdapat dalam masing-masing fraksi. Hasil pengukuran konsentrasi protein *Haliclona* sp. dengan menggunakan *Bovine SerumAlbumin* (BSA) sebagai standar ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi protein kasar dalam masing-masing fraksi

Ekstrak protein	Konsentrasi protein (mg/L)
Ekstrak kasar (sebelum dialisis)	0,277
Fraksi 0-30%	0,143
Fraksi 31-50%	0,045
Fraksi 51-70%	0,020
Fraksi 71-90%	0,112

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari perhitungan kadar protein spons *Haliclona* sp. menunjukkan kandungan protein masing-masing fraksi protein berbeda, di mana fraksi kejenuhan 0-30% memiliki kadar protein lebih besar daripada tingkat kejenuhan lainnya. Protein kasar yang diendapkan dengan ammonium sulfat akan menghasilkan perbedaan jenis dan jumlah dari protein yang dikandungnya, artinya

bahwa setiap tingkat kejenuhan akan mengendapkan jenis dan jumlah protein yang berbeda.

Salah satu aktivitas biologik yang diujikan pada fraksi protein yang dihasilkan dari spons *Haliclona* sp. pada berbagai tingkat kejenuhan adalah aktivitas antioksidan, dengan menggunakan metode DPPH. Radikal bebas adalah elektron yang tidak stabil, sangat reaktif sehingga akan berusaha untuk mendapatkan pasangan elektron dengan menarik atau menangkap elektron bebas dari makromolekul biologis di lingkungan sekitarnya, seperti lipid, protein, dan asam deoksiribosa nukleat (DNA) (Warsidah *et al.*, 2020). Radikal bebas yang terbentuk dapat dinetralkan oleh senyawa antioksidan baik yang diproduksi sendiri oleh tubuh ataupun melalui asupan antioksidan dari luar yang dikonsumsi atau digunakan baik secara oral maupun *topical*. Tubuh memiliki kemampuan dalam melawan radikal bebas yang terbentuk, tetapi jika serangan radikal bebas intensif dan jumlahnya melebihi kemampuan tubuh untuk mendetoksifikasi efek radikal bebas tersebut, maka sistem pertahanan antioksidan tubuh akan menurun dan pada akhirnya menyebabkan kondisi stres oksidatif (Minsas *et al.*, 2020; Son & Lewis, 2002). Aktivitas antioksidan yang terukur menyatakan jumlah kandungan aktif yang dapat mengurangi 50% radikal bebas DPPH, atau juga dinyatakan dengan *Inhibitory Concentration 50* (IC₅₀).

Dari fraksi protein berdasarkan tingkat kejenuhan amonium sulfat yang dihasilkan dari protein *Haliclona* sp, menunjukkan aktivitas antioksidan (IC₅₀) yang dihasilkan dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Antioksidan fraksi protein *Haliclona* sp.

Fraksi Protein (%)	Nilai IC ₅₀ (mg/L)
0-30	78,11
31-50	153,55
51-70	161,12
71-90	104,71
Crude Protein (Protein kasar)	115,22
Vitamin C	2,74

Hasil perhitungan aktivitas antioksidan ini menunjukkan bahwa protein fraksi 1 memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dibandingkan dengan fraksi lainnya dan protein kasar sebelum dialisis, tetapi masih jauh lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas antioksidan dari vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian ini. Perbedaan besarnya aktivitas antioksidan dari masing-masing fraksi protein tersebut selain disebabkan oleh kadar protein yang berbeda, juga kemungkinan disebabkan oleh komposisi asam amino penyusun protein pada masing-masing fraksi.

Mekanisme aktivitas antioksidan dalam sampel terhadap paparan radikal bebas DPPH akan tergantung pada konformasi kandungan senyawa antioksidan (Sofiana *et al.*, 2020). Dalam mekanisme antioksidan, jumlah hidroksil (OH) atau gugus yang dapat mendonorkan -NH dan -SH seperti hidrogen dalam struktur molekul secara umum akan dapat meningkatkan kerja antioksidan (Proksch *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2020). Fraksi protein dari spons *Haliclona* sp memiliki aktivitas antioksidan dalam kategori berpotensi sedang, menunjukkan bahwa dalam fraksi-fraksi tersebut terdapat senyawa antioksidan alami dapat digunakan oleh tubuh untuk menangkap paparan radikal bebas di lingkungan.

KESIMPULAN

Fraksinasi protein spons *Haliclona* Sp asal perairan Spermonde Sulawesi Selatan tertinggi dihasilkan dari pengendapan menggunakan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-30%. Konsentrasi

protein dalam fraksi tersebut adalah 0,143 mg/L. Aktivitas antioksidan tertinggi juga ditunjukkan oleh fraksi protein 0-30% dengan nilai IC₅₀ 78,11 mg/L. Nilai IC₅₀ ini termasuk ke dalam kategori sedang.

DAFTAR RUJUKAN

- Abranches, S.. (2020). Biological megadiversity as a tool of soft power and development for brazil. *Brazilian Political Science Review*, 14(2), e0006. <https://doi.org/10.1590/1981-3821202000020006>.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., & Edelstein, S. J. (1996). *Protein methods*. Wiley. <https://books.google.co.id/books?id=4QZrAAAAMAAJ>
- Bugni, T. S., & Ireland, C. . (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep*, 21, 143–163.
- Hertiani, T., Edrada-Ebel, R., Kubbutat, M., Van Soest, R. W. M., & Proksch, P. (2008). Inhibitor protein kinase dari spons Indonesia *Axynissa* sp . *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(2), 78–85.
- Kanagasabhpathy, M., Sasaki, H., Nakajima, K., Nagata, K., & Nagata, S. (2005). Inhibitory activities of surface associated bacteria isolated from the marine sponge pseudoceratina purpurea. *Microbes and Environments*, 20(3), 178–185. <https://doi.org/10.1264/jsme2.20.178>.
- Kurniawan, M. R., Sapar, A., & Aritonang, B. A. (2021). Uji toksisitas dan uji fitokimia spons *Haliclona* sp. asal pulau Lemukutan kabupaten Bengkayang Kalimantan Barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 9(1), 1–5.
- Martis, E., Doshi, G. M., Aggarwal, G. V., & Shanbhag, P. P. (2011). Novel antibiotics from marine Sources. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology(IJPSN)*, 4(3), 1446-1461. <https://doi.org/10.37285/ijpsn.2011.4.3.2>
- Minsas, S., Nurdiansyah, S. I., Prayitno, D. I., Sofiana, M. S. J., Kalija, T. A., Fadly, D., & Warsidah. (2020). Screening of bioactive compounds and antioxidant activity of ale-ale shellfish (*meretrix meretrix*) crude extracts from West Kalimantan, Indonesia. *Syst. Rev. Pharm*, 11, 222–227.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of natural products*, 67(8), 1216–1238. <https://doi.org/10.1021/np040031y>.

- Proksch, P., Edrada, R. A., & Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - Current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *59*, 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1006-8>.
- Putri, D. A., Radjasa, O. K., & Pringgenies, D. (2015). Effectiveness of marine fungal symbiont isolated from soft coral *sinularia* sp. from Panjang Island as Antifungal. *Procedia Environmental Sciences*, *23*(2015), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.01.051>.
- Rahman, N., Pradana, F., Fitriyah, S. I., Hartini, D. A., Ariani, & Bohari. (2020). Antioxidant and fiber levels of sweet potato. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, *11*(3), 4779–4783.
- Roy, M. C., Ohtani, I. I., Ichiba, T., Tanaka, J., Satari, R., & Higa, T. (2000). New cyclic peptides from the Indonesian sponge *theonella swinhoei*. *Tetrahedron*, *56*(46), 9079–9092. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00762-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00762-6).
- Sofiana, M. S. J., Aritonang, A. B., Safitri, I., Helena, S., Nurdiansyah, S. I., Risko, Fadly, D., & Warsidah. (2020). Proximate, phytochemicals, total phenolic content and antioxidant activity of ethanolic extract of *eucheuma spinosum* seaweed. *Syst. Rev. Pharm*, *11*, 228–232.
- Son, S., & Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure activity relationship. *J. Agric. Food Chem*, *50*, 468–472.
- Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D. & Wagner, M. (2007). Sponge associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, *71*, 295–347.