

# AKTIVITAS HEMOLITIK TERIPANG (*Bohadschia graeffei*) DARI PANTAI MALALAYANG, SULAWESI UTARA PADA BEBERAPA SUHU DAN pH

Remy E.P. Mangindaan<sup>1)</sup>, Fitje Losung<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi  
Jl. Kampus Unsrat, Manado 95115  
email: [remysang@yahoo.com](mailto:remysang@yahoo.com); [vera.losung@yahoo.com](mailto:vera.losung@yahoo.com)

## ABSTRAK

Teripang (*Bohadschia graeffei*) merupakan salah satu sumber bahan hayati laut yang bermanfaat di bidang pangan maupun biomedik. Hewan ini dilaporkan memiliki kandungan hemolisin, yaitu protein aktif yang mampu melisis sel darah merah. Pengembangan potensi hemolitiknya dapat menjadikannya sebagai kandidat obat antitumor, sitolisin ataupun bahan dalam bidang kajian biomedik. Namun demikian, hingga saat ini, belum banyak penelitian mengenai hemolisin teripang yang berasal dari perairan Sulawesi Utara. Sampel teripang yang diperoleh diekstraksi mengikuti metode Kamiya *et al.* (1991) yang telah dimodifikasi. Sampel teripang segar diblender dan dilarutkan dalam larutan Buffer fosfat. Setelah diaduk, campuran disaring dan filtrat yang diperoleh disentrifus. Pada supernatan, kemudian dilakukan proses *salting out* dengan penambahan amonium sulfat. Proses ini dibantu dengan penambahan aseton. Ekstrak kasar yang diperoleh dikeringkan untuk digunakan dalam uji aktivitas hemolitik dengan menggunakan suspensi eritrosit standar. Unit Hemolitik (HU). Hasil pengujian menampakkan bahwa aktivitas hemolitik teripang terjadi pada suhu dan pH optimum berturut-turut yaitu 50 °C dan 8. Nampak bahwa suhu optimum cukup tinggi dan tidak terjadi penurunan aktivitas yang tajam pada suhu yang lebih tinggi. Hal ini merupakan suatu hal yang unik dan masih harus diteliti lebih lanjut.

Kata kunci : aktivitas hemolitik, *Bohadschia graeffei*, hemolisin, pantai Malalayang

## HEMOLYSIN ACTIVITY OF SEA CUCUMBERS (*Bohadschia graeffei*) FROM MALALAYANG COASTAL, NORTH SULAWESI ON DIFFERENT TEMPERATURES AND pH

### ABSTRACT

Sea cucumber (*Bohadschia graeffei*) is one of marine resource that useful in food and biomedical fields. This animal contains hemolysin; a protein is able to lysis red blood cells. Developing of its potential hemolytic activity can make this animal to be a candidate of antitumor drug, sitolisin or material in biomedical research. However, until now, only a little information has been found about hemolysin from sea cucumbers from seas in North Sulawesi. Sea cucumbers samples were extracted following the modified method of Kamiya *et al.* (1991). Samples of fresh cucumber were blended and dissolved in phosphate buffer solution. After stirring, the mixture was filtered and the obtained filtrate was centrifused. Then, supernatant were processed salting out with adding ammonium sulfate. This process was aided by adding acetone. Crude extract obtained was dried to be used in hemolytic activity assay by using standard erythrocyte suspension. Test results showed that the hemolytic activity of sea cucumbers occurred at optimum temperature and pH was respectively 50 °C and 8. It appears that the optimum temperature is high enough and not sharp decline in activity at higher temperatures. This is a unique thing and needed to be investigated further.

Keywords: hemolytic activity, *Bohadschia graeffei*, hemolysin, Malalayang coastal

### PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati laut dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan, di antaranya keperluan biomedik. Perairan laut

Sulawesi Utara dikenal sebagai kawasan yang memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi, antara lain teripang. Tiensongrusmee & Pontjoprawiro (1988) menyatakan

perairan Sulawesi Utara merupakan salah satu wilayah potensial bagi pengembangan budidaya teripang. Sebagai salah satu invertebrata laut, teripang dilaporkan mengandung senyawa protein aktif yang mampu melisis sel darah merah (eritrosit). Senyawa ini dikenal sebagai hemolisin, yang merupakan salah satu produk metabolit sekunder (Russell, 1965; Hashimoto, 1979; Shiomi *et al.*, 1986; Kamiya *et al.*, 1991).

Jenis teripang tertentu dapat mengeluarkan serabut getah dari dalam rongga tubuhnya yang bersifat toksik terhadap ikan, hewan laut lainnya dan pada manusia (Hashimoto 1979). Russell (1965) menyatakan bahwa beberapa spesies teripang memiliki sejumlah tubula yang berwarna putih, merah muda atau merah yang berfungsi sebagai organ-organ pertahanan khusus, yang disebut organ "cuvierian". Apabila organ ini teriritasi, tubula-tubula akan dikeluarkan melalui anus menyerupai benang yang sangat lengket dan dapat menjerat predator yang menyerangnya. Materi ini merupakan suatu massa protein tidak berbentuk dengan sifat pelekatan sangat kuat. Hashimoto (1979) menyatakan bahwa toksin yang dikandung teripang pada dasarnya adalah saponin triterpenoid yang merupakan komponen utama toksin pada Echinodermata.

Tu (1988) melaporkan, selain holothurin, jenis-jenis toksin lain yang dikandung teripang, yaitu bohadschiosida, stichoposida, thelenotosida dan holotoksin. Toksin teripang bersifat ichtiotoksik, hemolitik, sitotoksik, antifungi (Hashimoto, 1979), antiviral (Wright, 1984), antimetabolik, neurotoksik (Russell, 1965), dan antitumor (Florkin & Scheer, 1969).

Hemolisis merupakan peristiwa luruhnya membran eritrosit yang mengakibatkan keluarnya isi sel diikuti lepasnya molekul hemoglobin yang terkandung di dalamnya. Boorman *et al.* (1988) menyatakan bahwa pada peristiwa lisis membran eritrosit tetap dalam keadaan tidak terurai, tetapi pada bagian membran tertentu terjadi kebocoran yang menyebabkan keluarnya isi sel karena mekanisme komplemen pada gabungan antigen-antibodi. Mekanisma hemolisin melisis sel darah merah dari beberapa bakteri yaitu dengan membentuk pori-pori pada membran sel (Chalneau *et al.*, 2010).

Hemolisin, sebagai senyawa penyebab hemolisis, ditemukan pada beberapa biota laut misalnya anemon laut (*Anthopleura japonica*) (Shiomi *et al.*, 1986), ular laut (*Tugali gigas*) dan teripang (*Holothuria polii*) (Kamiya *et al.*, 1991), bakteri dan jamur (Humm & Lane, 1974). Aktivitas hemolitik dapat diukur dengan menggunakan satuan hemolitik unit (HU). Satu hemolitik unit merupakan jumlah hemolisin yang dapat melisis setengah dari keseluruhan jumlah eritrosit pada suspensi eritrosit standar yang digunakan (Humm & Lane, 1974).

Metabolit sekunder dari invertebrata laut dapat diekstraksi lanjut untuk dijadikan bahan baku obat (Wright, 1984; Humm & Lane, 1974). Demikian pula, hemolisin pada teripang dapat dikembangkan potensinya sebagai sitolisin, kandidat obat antitumor ataupun bahan untuk bidang kajian biomedik. Di beberapa negara maju, jenis-jenis teripang tertentu selain dimanfaatkan sebagai bahan pangan, juga telah dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam industri obat-obatan. Namun, di Sulawesi Utara pemanfaatan teripang belum terlalu berkembang dan informasi ilmiah mengenai hemolisin pada teripang belum tersedia. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur suhu dan pH optimum bagi aktivitas hemolitik dari ekstrak hemolisin teripang (*Bohadschia graeffei*).

## **METODE PENELITIAN**

### **a. Tempat dan Waktu Penelitian**

Sampel teripang (*B.graeffei*) berasal dari Pantai Malalayang, Sulawesi Utara. Uji aktivitas hemolitik dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Hayati Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi – Manado. Penelitian dilaksanakan pada April 2012 hingga Juni 2012.

### **b. Bahan dan Cara kerja**

#### **Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel *B.graeffei* dilakukan di daerah subtidal Pantai Malalayang. Sampel yang diperoleh lalu dibungkus secara terpisah dengan plastik pembungkus (*cliploc*) segera setelah

pengambilan. Sampel kemudian dibawa ke laboratorium untuk diekstraksi.

### Ekstraksi Hemolisin

Ekstraksi hemolisin mengikuti metode Kamiya *et al.* (1991) yang dimodifikasi. Sampel teripang digiling dengan *blender* hingga halus lalu diaduk dalam larutan 0,06 M PB (pH 7) selama 24 jam pada suhu 5<sup>0</sup>C lalu disaring. Selanjutnya, filtrat disentrifus (3500 rpm; 60 min) diikuti proses *salting out* dengan 50% amonium sulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam supernatan. Pengendapan ekstrak kasar dibantu dengan penambahan aseton. Ekstrak kasar dikeringkan dengan vakum evaporasi, ditimbang dan disimpan dan siap digunakan saat pengujian hemolisis.

### Penyiapan Eritrosit

Darah manusia (golongan O) dari pendonor sebanyak 100 ml, yang telah disimpan di dalam kantung Terumo di lemari es, dimasukkan dalam tabung lalu disentrifus pada 3000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya, leukosit (*buffy coat*) dan plasma darah dikeluarkan. Larutan PBS pH 7 sebanyak dua kali volume ditambahkan pada presipitat eritrosit kemudian disentrifus kembali pada 3500 rpm selama 3 menit. Pencucian ini dilakukan tiga kali. Selanjutnya eritrosit disuspensikan kembali dalam PBS (50 x volume) sehingga diperoleh suspensi eritrosit dengan kepadatan sel 2 %.

### Uji Aktivitas Hemolitik pada Beberapa Suhu

Ekstrak kasar kering sebanyak 0,56 g dilarutkan dalam 100 ml 0,06 M PB pada pH 7. Lalu, sebanyak 1 ml larutan ekstrak tersebut ditambahkan ke dalam 7 tabung yang masing-masing berisi 9 ml larutan PB. Tabung-tabung ini lalu diinkubasi selama 30 menit, masing-masing pada suhu 25<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C, 40<sup>0</sup>C, 50<sup>0</sup>C, 60<sup>0</sup>C, 70<sup>0</sup>C, dan 80<sup>0</sup>C. Setelah diinkubasi, tabung-tabung tersebut dikembalikan pada suhu ruang (25<sup>0</sup>C) untuk uji aktivitas hemolitik. Selanjutnya, uji aktivitas hemolitik dilakukan dengan cara menambahkan 0,1 ml larutan ekstrak ke dalam 2,9 ml suspensi eritrosit 2 %. Setelah campuran diaduk dengan vorteks, campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

Campuran yang telah diinkubasi kembali diaduk dengan vorteks dan disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 3 menit. Pengukuran nilai absorbansi supernatan dilakukan pada spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

### Uji Aktivitas Hemolitik pada Beberapa pH

Setiap tabung yang telah diisi dengan 0,9 ml PB 0,06 M pada pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 ditambahkan 0,1 ml larutan ekstrak dengan konsentrasi 56 *ug/* ml. Setelah diaduk dengan vorteks, larutan ekstrak diinkubasi selama 12 jam pada suhu 5<sup>0</sup>C. Larutan ekstrak yang telah diberi perlakuan pH ini lalu diuji aktivitas hemolitiknya seperti pada pengujian untuk melihat pengaruh suhu, dengan menggunakan suspensi eritrosit 2 % dalam 0,06 M PBS pada pH 7. Setiap larutan ekstrak yang telah diberi perlakuan suhu atau pH diuji aktivitas hemolitiknya dengan tiga kali pengulangan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi *B.graeffei* sebanyak 100 g berat basah menghasilkan filtrat sekitar 80 ml. Setelah *salting out* dan pengeringan diperoleh ekstrak kering hemolisin kasar berupa tepung berwarna kuning-kecoklatan sebanyak 1,17 g dengan aroma khas.

### Pengaruh Suhu

Jumlah hemolisin yang menyebabkan 50% hemolisis pada eritrosit standar didapat dari rata-rata nilai absorbansi sampel dibagi dengan nilai absorbansi 50% hemolisis pada kurva standar. Nilai aktivitas hemolitik, dinyatakan dengan Satuan Hemolitik unit (HU), yang dihasilkan pada beberapa suhu dapat dilihat pada Tabel 1.

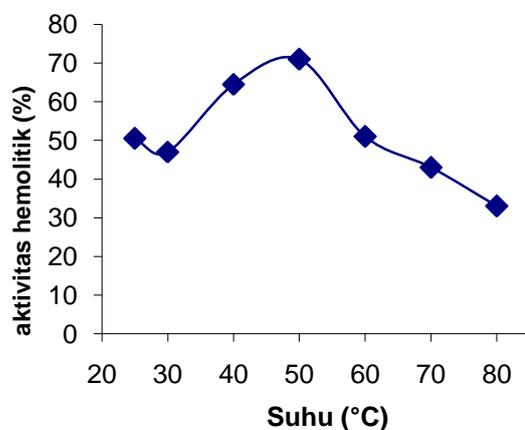
Aktivitas hemolitik meningkat seiring dengan peningkatan suhu. Nilai aktivitas optimum berada pada suhu 50<sup>0</sup>C dengan nilai aktivitas hemolitik yaitu 1,37 HU. Pemanasan hingga 50<sup>0</sup>C menyebabkan protein lain selain hemolisin menjadi tidak/kurang aktif sehingga hemolisin dapat bekerja secara optimal. Namun, pemanasan di atas 50<sup>0</sup>C menyebabkan aktivitas hemolitik menurun akibat hemolisin tidak/kurang aktif. Hasil uji

pengaruh suhu terhadap aktivitas hemolitik disajikan pada Gambar 1.

Tabel 1. Nilai Aktivitas Hemolitik *B.graeffeii* pada beberapa Suhu

Suhu (°C)	Aktivitas Hemolitik (HU)*
25	0,98
30	0,92
40	1,24
50	1,37
60	0,99
70	0,86
80	0,66

Keterangan: \* Konsentrasi ekstrak kasar 56 µg/ml



Gambar 1. Persentase aktivitas hemolitik *B.graeffeii* pada beberapa suhu

Martin *et al.*(1985) menyatakan bahwa kenaikan kecepatan reaksi di bawah suhu optimum disebabkan oleh peningkatan energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi. Apabila suhu tetap ditingkatkan hingga melampaui suhu optimum maka energi kinetik molekul-molekul yang bereaksi menjadi sedemikian besar sehingga melampaui penghalang energi untuk pemecahan ikatan-ikatan sekunder. Hal ini akan mengakibatkan protein/enzim kehilangan struktur sekunder dan tersier disertai kehilangan kemampuan hemolitiknya.

Shiomi *et al.* (1986) melaporkan bahwa hemolisin yang terdapat pada anemon laut (*Anthopleura japonica*) labil terhadap pemanasan. Pengujiannya pada beberapa suhu (40, 60, 80 dan 100 °C) menyebabkan aktivitas hemolitik anemon laut menurun secara linear terhadap peningkatan suhu. Penurunan aktivitas yang dilaporkannya

secara berturut-turut sebesar 15, 90 dan 95 %, sedangkan suhu 100°C merusakkan seluruh aktivitasnya. Demikian pula, hemolisin ular laut (*Tugali gigas*) dilaporkan labil pada pengujian panas (Kamiya *et al.*, 1991).

Hemolisin yang diekstraksi dari cairan *coelomic* teripang (*Holothuria polii*) terdiri dari dua jenis yaitu hemolisin yang labil dan yang tidak labil terhadap pemanasan (Kamiya *et al.*, 199). Florkin & Scheer (1969) juga menyatakan hal serupa bahwa, secara umum, saponin tipe holothurin yang dihasilkan teripang tahan terhadap pemanasan.

Hasil pengujian pada beberapa suhu yang diperoleh dapat dihubungkan dengan suhu optimum yang dibutuhkan bagi aktivitas enzim pada sel-sel teripang. Giese (1979) menyatakan bahwa umumnya aktivitas enzim sel-sel organisme di daerah dingin sangat tinggi bagi enzim bakteri termofilik pada suhu rendah, dan bagi enzim organisme daerah sedang suhu optimumnya sedang.

Teripang (*B. graeffei*) yang digunakan pada pengujian ini hidup pada zona fotik perairan. Zona ini menerima banyak energi cahaya matahari. Jika dihubungkan dengan pernyataan Giese (1979) maka habitat hidup ini dapat mempengaruhi aktivitas enzim sel-selnya. Diperkirakan, aktivitas enzim sel-sel teripang ini membutuhkan suhu optimum sedang hingga relatif tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hemolisin pada teripang (*B.graeffeii*) cukup tahan terhadap pemanasan.

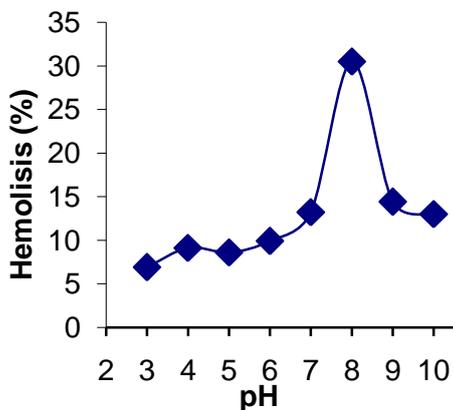
### Pengaruh pH

Hasil pengujian pada beberapa nilai pH menampakkan pH 8 adalah pH optimum bagi aktivitas hemolitik teripang (Gambar 2). Aktivitas hemolitik meningkat seiring dengan peningkatan pH kemudian menurun kembali. Nilai aktivitas hemolitik pada beberapa pH dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil penelitian ini lain halnya dengan jenis hemolisin (AJH-2) yang diisolasi dari anemon laut (*A.japonica*). Hemolisin jenis ini tidak mengalami perubahan aktivitas selama jangka waktu penyimpanan 1 minggu pada suhu 4°C maupun pada suhu -20 °C selama 6 bulan (Shiomi *et al.*, 1986).

Tabel 2. Nilai Aktivitas Hemolitik *B. graeffei* pada beberapa pH

Derajat Keasaman (pH)	Aktivitas Hemolitik (HU)
3	0,14
4	0,19
5	0,18
6	0,20
7	0,27
8	0,61
9	0,29
10	0,27



Gambar 2. Persentase aktivitas hemolitik *B. graeffei* pada beberapa pH

Shiomi *et al.* (1986) memperoleh dua jenis hemolisin pada anemon laut tersebut. Jenis (AJH-2) yang stabil pada kisaran pH yang luas (pH 2 - 11) dan jenis (AJH-1) yang kehilangan 80% aktivitas hemolitiknya pada pH 11. Aktivitas hemolitik yang dihasilkan hemolisin ular laut (*T. gigas*) dinyatakan stabil pada kisaran pH 6 - 9, namun kehilangan aktivitas hemolitiknya pada nilai pH ekstrim (Kamiya *et al.* 1991).

Pada penelitian ini digunakan pH yang bervariasi tetapi konsentrasi buffer (dapar) tetap. Kecenderungan meningkatnya kemampuan hemolitik sesuai peningkatan pH ini dapat dihubungkan dengan pernyataan Martin *et al.* (1985), jika kecepatan reaksi berubah sebagai fungsi pH pada konsentrasi buffer tetap maka reaksi dikatakan dikatalisis basa spesifik (> pH 7) atau asam spesifik (< pH 7). Berdasarkan pada pernyataan tersebut dapat dikatakan bahwa protein pada hemolisin *B. graeffei* dikatalisis oleh basa spesifik.

## KESIMPULAN

Teripang (*B. graeffei*) yang diperoleh dari Pantai Malalayang, Sulawesi Utara memiliki aktivitas hemolitik yang tinggi dan berpotensi sebagai sumber hemolisin. Ekstrak kasar hemolisin teripang *B. graeffei* bekerja optimum pada 50°C dan tahan hingga pada suhu 60°C. Nilai pH optimum aktivitas hemolitik teripang ini berada pada pH 8.

## DAFTAR PUSTAKA

- Boorman, K.E., B.E. Dodd & P.J. Lincoln, 1988. *Blood Group Serology*, 6<sup>th</sup> Ed. Churchill Livingstone, New York.
- Chalneau N., N. Monina, J. Shin, C. View & V. Noireaux . 2010. *Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression*. Elsevier.
- Florkin, M & T. Scheer, 1969. *Chemical Zoology*. Vol. III. Academic Press, New York.
- Giese, A.C. 1979. *Cell Physiology*. 5<sup>th</sup> Ed. Topan Comp., Tokyo.
- Hashimoto, Y. 1979. *Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites*. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Humm, H.J & C.E. Lane. 1974. *Bioactive Compounds from the Sea*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kamiya, H., K. Muramoto & R. Goto. 1991. Naturally Occuring Hemolysin in the Marine Snail *Tugali gigas*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 57 (11) : p. 2109-2113.
- Martin, D.W., P.A. Mayes, D.K. Granner, V.W. Rodwell & I. Darmawan, 1987. *Biokimia*. Edisi 20. EGC, Jakarta.
- Russell, F.E. 1965. *Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals*. *Adv. Mar. Bio.* Vol. 3. p. 255-384.
- Shiomi, K., M. Takamiya, H. Yamanaka & T. Kikuchi, 1986. Physicochemical Properties of a Lethal Hemolysin Isolated from Sea Anemon *Anthopleura japonica*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 52 (3) : p. 539-543.

Tiensongrusmee, B & S. Pontjoprawiro.  
1988. Budidaya Teripang, Potensi  
dan Prospeknya. Seafarming Dev.  
Proj. FAO/UNDP, Jakarta.

Tu, A.T. 1988. *Marine Toxins and Venoms*.  
Handbook of Natural Toxins. Vol. 3.  
Marcel Dekker, Inc., USA.

Wright, J.L.C.1984. *Biologically Active  
Marine Metabolites: Some Recent  
Examples*. Proc. N. S. Inst. Sci. 34:p.  
131-161.