

ISBN: 978-602-53915-9-7

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL Tumbuhan Obat Indonesia Ke-55

Merawat Tumbuhan Obat Menuai Manfaat

Penggalian, Pelestarian, dan Pemanfaatan Berkelanjutan
Tumbuhan Obat Indonesia

Kajian Tumbuhan Kelembak (*Rheum officinale* Baill.)
dan Nagasari (*Mesua ferrea* L.)

Review Tanaman Pare (*Momordica charantia* L.)

Hotel Grand Artos & Convention
Magelang, 17-18 Oktober 2018



KEMENTERIAN
KESEHATAN
REPUBLIK
INDONESIA



Universitas Tidar

bersama dengan

Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia

DAFTAR ISI

KODE	JUDUL	HALAMAN
PRAKLINIS		
O02	EFEK EKSTRAK METANOL MAKROALGA MERAH (<i>Eucheuma cottonii</i>), GAMBIR LAUT (<i>Clerodendrum inerme</i>), DAN TAURIN TERHADAP PROFIL PROTEIN PLASMA DARAH MENCIT JANTAN (<i>Mus musculus</i> L.) YANG DIINDUKSI SENYAWA KARSINOGEN BENZO(α)PIREN Rizka Arifianti, Endang L. Widiastuti, Endang Nur Cahyani	1
O03	EKSTRAK ETANOL <i>Bauhinia purpurea</i> DAN TAURINE DALAM PEMULIHAN FERTILITAS HIPERGLIKEMIK MENCIT JANTAN Endang Linirin Widiastuti, Yulianti, Fhora Candra Sari, Wulan Ayu Nurfitri	9
O06	EFEK SITOTOKSIK DAN ANTIMIGRASI EKSTRAK Zingiber zerumbet L. PADA SEL KANKER PAYUDARA 4T1 Sari Haryanti dan Ika Yanti M. Sholikhah	16
O08	AKTIVITAS EKSTRAK METANOL DAUN SIRIH MERAH (<i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.) TERHADAP <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTEN ANTIBIOTIK Yustina Sri Hartini	23
O13	PENGARUH PEMBERIAN JAMU ANTIHIPERTENSI DIBANDING KOMBINASI JAMU ANTIHIPERTENSI DAN PALA TERHADAP TEKANAN DARAH DAN KUALITAS HIDUP PASIEN DI KLINIK HORTUS MEDICUS Fajar Novianto, Agus Triyono	28
O14	PENGGUNAAN PULASARI (<i>Alyxia reinwardtii</i>) DI RUMAH Riset JAMU (RRJ) HORTUS MEDICUS TAWANGMANGU Enggar Wijayanti, Ulfa Fitriani, Zuraida Zulkarnain, David Abiyoso	33
O15	PENETAPAN KANDUNGAN TANIN TOTAL DAN UJI IRITASI KUTAN EKSTRAK ETANOL UMBI AKAR TAWAS UT (<i>Ampelociscus rubiginosa</i> Lauterb.) PADA TIKUS Khoerul Anwar, Yandini Putri Aprilidana, Siti Sumainah, Nurlily, Liling Triyasmono, Sudarsono, Agung Endro Nugroho	39

**EFEK EKSTRAK METANOL MAKROALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*),
GAMBIR LAUT (*Clerodendrum inerme*), DAN TAURIN TERHADAP PROFIL
PROTEIN PLASMA DARAH MENCIT JANTAN (*Mus musculus L.*) YANG
DIINDUKSI SENYAWA KARSINOGEN BENZO(α)PIREN**

Rizka Arifianti¹*, Endang Linirin Widiastuti²*, Endang Nur Cahyani³*

¹Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam, Universitas Lampung
Email: rizkaarifianti@gmail.com

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam, Universitas Lampung
Email: elwidi@yahoo.com

³Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam, Universitas Lampung
Email: endang_nurcahyani@yahoo.com

Corresponding author : Endang Linirin Widiastuti, Ph.D

Abstrak

Zat karsinogen merupakan pencemar berbahaya yang tercampur oleh udara, makanan, dan minuman. Salah satu prokarsinogen yaitu benzo(α)piren yang memiliki sifat mutagenik penyebab kanker. Ekstrak dari makroalga merah dan gambir laut serta taurin diduga memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah menguji efek pemberian ekstrak metanol makroalga merah (*Eucheuma cottonii*) dan gambir laut (*Clerodendrum inerme*) serta taurin terhadap profil protein plasma darah mencit jantan (*Mus musculus L.*) yang diinduksi senyawa karsinogen benzo(α)piren. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Sebanyak 25 mencit jantan dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu : K1= (kontrol negatif), K2= kelompok yang diinduksi benzo(α)piren selama 10 hari, K3= benzo(α)piren selama 10 hari, diberi ekstrak makroalga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan dosis 14,7 mg/ekor/hari selama 15 hari, K4= benzo(α)piren selama 10 hari, diberi ekstrak gambir laut (*Clerodendrum inerme*) dengan dosis 10,5 mg/ekor/hari selama 15 hari, K5= benzo(α)piren selama 10 hari, diberi taurin 15,6 mg/ekor/hari selama 15 hari. Data dianalisis dengan ANOVA pada taraf nyata 5%. Hasil penelitian menunjukkan visualisasi profil protein plasma darah mencit belum memberikan hasil yang bermakna terhadap kelompok mencit yang diberikan ekstrak daun gambir laut, makroalga merah dan taurin serta induksi karsinogenik benzo(α)piren dikarenakan respon fisiologis setiap individu berbeda-beda. Hal tersebut berkaitan dengan kemampuan depurasi makhluk hidup berbeda-beda, tergantung dari daya tahan tubuh, jenis, ukuran, berapa banyak polutan yang masuk, dan berapa lama makhluk hidup terpapar polutan.

Kata kunci: *Mus musculus L.*, *Eucheuma cottonii*, *Clerodendrum inerme*, taurin, benzo(α)piren, SDS-Page, plasma darah

Abstract

Carcinogens are dangerous radionuclide pollutants which are mixed with the air we breathe, food and drinks. One of the strongest carcinogens is benzo (α) pyrene which is a polycyclic aromatic hydrocarbon with cancer-causing mutagenic properties. Extracts from red macroalgae and sea gambir and taurine have anticancer and antioxidant activity. The purpose of this research is to examine the effect of methanol extract of red macroalgae (*Eucheuma cottonii*) and sea gambir (*Clerodendrum inerme*) and taurine on the profile of blood plasma protein in male mice (*Mus musculus L.*) due to benzo (α) pyrene carcinogenic induction. This research used *Completely Randomized Design*. Twenty five male mice were divided into 5 treatment groups, as follows: K1 = (control), K2 = induced by benzo (α) pyrene for 10 days, K3 = after induced by benzo (α) pyrene for 10 days. K1, K2 and K3 were given red macroalgae extract (*Eucheuma cottonii*) orally with a dose of 14,7 mg / mice during 15 days. K4 = induced by benzo (α) pyrene for 10 days than was given sea gambir extract (*Clerodendrum inerme*) orally with a dose of 10,5 mg / mice during 15 days. K5 = induced benzo (α) pyrene for 10 days than was given taurine orally with a dose 15,6 mg / mice during 15 days. The data in this research were analyzed by the ANOVA statistical method at a

significant level of 5%. The results showed that the visualization of blood plasma protein profiles of mice did not give significant results for the mice group which was given gambir laut leaf extract, red macroalgae and taurine and induction of benzo(α)pyrene because the physiological responses of each individual different. This is related to the ability of the depuration of living things to vary, depending on the body's resistance, type, size, how many pollutants enter, and how long living things are exposed to pollutants.

Keywords: *Mus musculus* L., *Euचेuma cottonii*, *Clerodendrum inerme*, taurine, benzo (α) pyrene, SDS Page, blood plasma

PENDAHULUAN

Proses modernisasi yang terjadi di era global menyebabkan kebutuhan akan toksikologi lingkungan meningkat sehingga menaikkan harga konsumsi dan produksi. Dengan demikian industrialisasi dan penggunaan energi akan meningkat yang tentunya akan meningkatkan resiko toksikologis. Proses industrialisasi sendiri memanfaatkan bahan baku kimia, fisika, biologi yang akan menghasilkan limbah dalam bentuk gas, cair, dan padat. Limbah ini tentunya akan menimbulkan perubahan kualitas lingkungan yang mengakibatkan resiko pencemaran, sehingga resiko toksikologi juga akan meningkat. Hal ini menyebabkan manusia dan makhluk hidup lainnya dapat terpapar toksik berupa polutan atau zat xenobiotik yang ada di lingkungan (Casarett dan Doull, 2008).

Salah satu dari senyawa xenobiotik yang melimpah ruah di bumi adalah PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*). PAH bersifat karsinogenik yang dapat merusak sistem hormonal dan imunitas tubuh. Beberapa golongan PAH, seperti Benzo(α)piren diketahui dapat ditemukan dalam makanan dan minuman serta udara (Terzi *et al.*, 2008 dan Delaware Health and Social Services, 2009). Benzo(α)piren yang terdapat di udara, air dan sedimen, dapat masuk ke dalam tubuh makhluk hidup melalui cara dihirup (*inhalated*) atau diserap (*absorbed*) melalui kulit, dan dimakan (*ingested*), sesuai dengan habitat makhluk hidup (Faust dan Reno, 1994; Brown *et al.*, 2009). Senyawa ini bersifat prokarsinogenik yang dapat dikonversi ke karsinogen aktif dengan sitokrom P-450. Karsinogen aktif yang sangat reaktif dapat menyerang dengan mudah untuk kelompok nukleofilik dalam DNA, RNA dan protein, yang menyebabkan mutasi sehingga dapat menimbulkan berbagai penyakit degeneratif, termasuk kanker (Murray dan Granner, 2003).

Oleh karena itu, berbagai penelitian penting dikembangkan sebagai upaya mengeksplorasi potensi senyawa-senyawa bioaktif alami yang dapat berperan sebagai antikanker. Potensi yang dapat dimanfaatkan sebagai antikanker adalah keanekaragaman hayati laut dan pesisir di Indonesia (Gudbjarnason, 1999).

Salah satu sumber agen kemoterapi berupa mangrove yaitu daun gambir laut (*Clerodendrum inerme*) yang termasuk keluarga Verbenaceae, mengandung banyak metabolit aktif biologis, termasuk glikosida jantung, antrakuinon, protein, fenolik, flavonoid, saponin, tanin, iridoid, diterpenes, triterpen, sterol, steroid, karbohidrat, minyak tetap, minyak atsiri dan lignin. Serta memiliki efek farmakologis seperti anti-inflamasi, analgesik, antipiretik, saraf dan otot polos efek, antimikroba, antidiabetes, antioksidan, antiparasit, insektisida, anti alergi, antikanker, pelindung dan banyak efek farmakologis lainnya (Al-Snafi AE, 2016). Pemberian oral ekstrak air daun *C. inerme* (500 mg/kg) mampu mengurangi kejadian, volume, beban dan jumlah tumor dari karsinoma sel skuamosa oral pada hamster golden Syrian yang diinduksi 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (Manoharan *et al.*, 2006). Ekstrak etanol daun *C. inerme* (300 mg/kg) secara signifikan mencegah kejadian tumor, menurunkan volume dan beban tumor kulit pada mencit Swiss yang diinduksi DMBA (Renju *et al.*, 2007).

Jenis kekayaan laut lainnya adalah rumput laut yaitu *Euचेuma cottonii* yang memiliki potensi sebagai antioksidan karena mengandung pigmen fotosintesis dan pigmen aksesoris lainnya yaitu klorofil-a, α -karoten, β -karoten, fikobilin, neozanthin, dan zeanthin serta potensial sebagai bahan antikanker (Ismail *et al.*, 2013). Fraksi protein dari alga merah *Euचेuma cottonii* memiliki aktivitas terkuat sebagai antikanker terdapat pada fraksi 40-60% dengan nilai LC₅₀ sebesar 91,83 μ g/mL terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan nilai IC₅₀ sebesar 74,13 μ g/mL terhadap sel

zigot bulubabi *Tripneustes gratilla* Linn. Sifat antikanker dan antioksidan juga dimiliki oleh taurin. Taurin diduga dapat digunakan sebagai antioksidan sehingga membantu mencegah kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh oksidasi (Murray, 1996). Fungsi penting lainnya dari zat ini adalah sebagai antikarsinogenik dengan cara melindungi sel tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Redmon *et al.*, 1983).

Diagnosa biokimia klinis, monitoring kesehatan dan nutrisi suatu organisme, serta mengungkap gangguan kesehatan yang bersifat subklinis, dapat dilakukan dengan menganalisis metabolit darah, konsentrasi protein total dan fraksi albumin dan globulin serum darah. Peningkatan atau penurunan konsentrasi protein total dianggap sebagai suatu abnormalitas yang terjadi pada tubuh suatu organisme (Franca *et al.*, 2011 dan Irfan *et al.*, 2014). Beberapa penelitian mengenai perubahan profil protein plasma darah akibat paparan zat toksik telah banyak dilakukan. Paparan asap rokok kronis pada tikus menyebabkan perubahan ekspresi protein pada profil protein plasma darah tikus yang menunjukkan adanya perkembangan penyakit kardiovaskular dan pulmonal (Tewari, *et al.*, 2011).

Penelitian lainnya yang dilakukan Sa'adah *et al.* (2016), bahwa terdapat perubahan profil protein plasma darah mencit yang diinduksi karsinogenik benzo(α)piren, dimana terlihat adanya penambahan dua pita protein baru dibandingkan kontrol. Pita tersebut berkaitan dengan protein yang dihasilkan oleh hepar sebagai penanda adanya infeksi dan protein yang dihasilkan oleh sel kanker osteosarkoma. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan menguji efek pemberian ekstrak metanol makroalga merah dan gambir laut serta taurin terhadap profil protein plasma darah mencit jantan (*Mus musculus* L.) yang diinduksi senyawa karsinogen Benzo(α)piren.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-Oktober 2018, di Laboratorium Biomolekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Analisis profil protein plasma darah mencit dengan metode Elektroforesis SDS-PAGE dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Balai Veteriner Lampung dan Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain bak plastik dengan penutup kayu dan kawat kasa (sebagai tempat pemeliharaan mencit), wadah pakan dan minum mencit, Haemositometer (untuk menghitung jumlah eritrosit dan leukosit), serta seperangkat alat Elektroforesis SDS-PAGE (Bio-Rad). Sedangkan bahan yang digunakan yaitu hewan uji mencit jantan (*Mus musculus*) galur *ddy* berumur 2 bulan yang diperoleh dari Balai Veteriner Lampung, karsinogenik benzo(α)piren, 3 bahan uji yaitu Makroalga Merah (*Eucheuma cottonii*) dosis 14,7 mg/bb, Gambir Laut (*Clerodendrum inerme*) dosis 10,5 mg/bb, dan Taurin dengan dosis 15,6 mg/bb, Vacutainer tube EDTA untuk mengumpulkan darah mencit dan bahan Elektroforesis SDS-PAGE Invitrogen berupa TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit 12%, APS, TEMED, Precision Plus Protein™ Standards, Laemmli Buffer Sample dan β -Mercaptoethanol, 10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis Buffer, *Commasie blue*, serta larutan destainer).

Persiapan Bahan Uji (Proses Ekstraksi)

Proses ekstraksi daun gambir laut dan makroalga merah dimulai dengan sortasi bahan, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Daun gambir laut dan makroalga merah dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 35-40°C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan penggilingan hingga di dapat bubuk kering daun gambir laut maupun makroalga merah.

Proses maserasi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut Metanol *For Analysis* selama 1 x 24 jam dengan perbandingan 1 : 10 (1 liter metanol digunakan untuk merendam 100 g bubuk kering), hingga diperoleh maserat. Selanjutnya maserat disaring menggunakan corong *buchner*. Filtrat dari maserat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu sesuai dengan titik didih metanol yaitu 54,6°C hingga didapat ekstrak kental. Terakhir, ekstrak kental dimasukkan

ke dalam oven hingga diperoleh ekstrak dalam bentuk pasta yang siap untuk dilakukan perhitungan dosis.

Persiapan Hewan Uji dan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap menggunakan 25 ekor mencit yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan. Tahapan penelitian ini yaitu aklimatisasi mencit di laboratorium selama 7 hari, penginduksian karsinogenik benzo(α)piren dosis 0,3 mg/bb dengan pelarut 0,2 ml minyak jagung secara sub kutan pada bagian tengkuk mencit, selama 10 hari. Selanjutnya pemberian bahan uji ekstrak metanol Makroalga Merah (*Euclima cottonii*) dosis 14,7 mg/bb, Gambir Laut (*Clerodendrum inerme*) dosis 10,5 mg/bb, dan Taurin dengan dosis 15,6 mg/bb secara peroral selama 15 hari. Berikut ini merupakan pembagian kelompok perlakuan :

1. K1 :Normal
2. K2 :Diinduksi Benzo(α)piren tanpa pemberian bahan uji
3. K3 :Diinduksi Benzo(α)piren dan diberikan taurin
4. K4 :Diinduksi Benzo(α)piren dan diberikan ekstrak makroalga merah (*Euclima cottonii*)
5. K5 :Diinduksi Benzo(α)piren dan diberikan gambir laut (*Clerodendrum inerme*)

Mencit yang diinduksi benzo(α)piren menunjukkan munculnya pembengkakan (edema) yang membentuk nodul pada bagian tengkuk, dan berisi cairan berwarna kekuningan. Pada akhir penelitian, dilakukan pembusuan pada mencit secara inhalasi menggunakan kloroform yang ditetesi pada kapas dan dimasukkan dalam toples kaca. Selanjutnya darah mencit diambil secara *cardiac puncture* dan dimasukkan dalam vacutainer tube EDTA. Cairan nodul yang terdapat pada tengkuk mencit diambil dan dimasukkan dalam tube. Sampel darah dan cairan nodul disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C .

Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun gambir laut dan makroalga merah. Uji pendahuluan ini merupakan uji fitokimia yang meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin.

a. Pemeriksaan alkaloid

Senyawa alkaloid dalam sampel dapat diketahui keberadaannya dengan cara menambahkan 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer ke dalam 0,5 mL sampel. Terbentuknya endapan putih menunjukkan adanya alkaloid. Pereaksi Mayer terbuat dari satu gram KI yang dilarutkan dengan 20 mL akuades. Kemudian ke dalam larutan KI tersebut ditambahkan 0,271 gram HgCl_2 lalu didiamkan beberapa saat hingga semua HgCl_2 larut (Darwis, 2000).

b. Pemeriksaan flavonoid

Pemeriksaan senyawa flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 gram serbuk Mg dan 5 mL HCL pekat secara perlahan ke dalam 0,5 mL sampel yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah tua (magenta) atau kuning dalam waktu 3 menit (Sangi et al., 2008).

c. Steroid dan Terpenoid

Pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara menambahkan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL H_2SO_4 pekat (Lieberman-Burchard) ke dalam 1 mL sampel. Jika warna berubah menjadi biru/ungu menandakan adanya senyawa steroid. Sedangkan jika berubah menjadi merah atau kuning menandakan adanya senyawa terpenoid (Kadarisman, 2000).

d. Pemeriksaan saponin

Pemeriksaan senyawa saponin menggunakan metode Forth dilakukan dengan cara memasukkan 0,5 mL sampel kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL akuades lalu dikocok selama 30 detik. Apabila terbentuk busa (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin (Darwis, 2000).

Pengamatan Profil Protein Darah Mencit menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE

Darah mencit disentrifuge dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil plasmanya (supernatan). Plasma dipipet sebanyak 1 μl , diencerkan dengan NaCl fisiologis sebanyak

50 μ l (pengenceran 50x). Selanjutnya, 10 μ l plasma ditambahkan *loading buffer* sebanyak 10 μ l (Laemmli Buffer Sample dan β -Mercaptoethanol 19:1).

Pembuatan gel elektroforesis 12% dilakukan dengan mencampurkan TGX Stain-Free™ Fast-Cast™ Acrylamide Kit 12% (yang terdiri atas *resolver* atau gel pemisah dan *stacker* atau gel penahan), APS 10% dan TEMED, yang diisikan ke dalam plat kaca elektroforesis. Selanjutnya, sisir pembentuk sumuran dipasang dan ditunggu 30 menit hingga gel memadat.

Sebelum memasukkan sampel plasma darah mencit ke dalam sumuran, ada baiknya mengestimasi protein untuk mengukur konsentrasi volume protein sampel yang akan dimasukkan ke dalam sumuran. Pembuatan larutan standar BSA 0 mg/ml; 0,5 mg/ml (diambil dari larutan standar 1 mg/ml sebanyak 100 μ l BSA + 100 μ l H₂O); 0,75 mg/ml (diambil dari larutan standar 1,5 mg/ml sebanyak 100 μ l BSA + 100 μ l H₂O); 1 mg/ml (100 μ l BSA + 100 μ l H₂O) ; 1,25 mg/ml. Selanjutnya mempersiapkan 190 μ l *bradford reagent* dicampurkan (alat *vortex*) dengan 10 μ l sampel. Larutan standar dan larutan *bradford* + sampel yang telah dibuat dimasukkan ke dalam *plate* (duplo) sebesar 80 μ l. Plate yang telah terisi dimasukkan ke dalam alat ELISA readers Bio-Rad dengan panjang gelombang 595 nm.

Gel yang telah siap digunakan, dirangkai dengan alat elektroforesis, dimasukkan dalam *electrophoresis chamber* dan ditambahkan buffer elektroforesis (10x Tris/Glycine/SDS Electrophoresis Buffer) hingga mencapai garis batas buffer. Selanjutnya sumuran diisi dengan *marker protein* sebanyak 10 μ l (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Standards dengan berat molekul 10 kDa sampai dengan 250 kDa), dan seluruh sampel masing-masing sebanyak 20 μ l. *Running* elektroforesis dilakukan dengan arus listrik 100 Volt dan dihentikan saat warna biru (buffer sampel) telah menyentuh dasar gel.

Gel dilepaskan dari plat kaca dan dimasukkan ke dalam larutan pewarna *commasie blue*, diletakkan pada Ultra Rocker Bio-Rad dengan kecepatan goyangan 40 rpm selama 1 jam. Selanjutnya, dilakukan *destainer* untuk melunturkan pewarna *commasie blue* yang melekat pada gel dengan larutan *destainer* konsentrasi tinggi dan konsentrasi rendah secara bertahap hingga pita-pita protein terlihat dengan jelas. Gel hasil elektroforesis dapat disimpan dalam larutan akuades dan diletakkan dalam *refrigerator*. Pita protein yang telah terlihat, diamati dan dihitung nilai Rf (*Retention factor*).

Analisis Berat Molekul Pita Protein Profil Plasma Darah Mencit

Berat molekul pita protein dihitung menggunakan BioMed MW Converter®- Molecular Weight Conversion Tool (*copyright* - Didik T. Subekti 2018). Kurva standar dibuat dengan menghitung nilai Rf (*Retention factor*) dari pita marker, yaitu jarak pita dari sumuran dibagi dengan jarak total migrasi sampel sebagai sumbu x (absis) dan berat molekul pita marker sebagai sumbu y (ordinat). Nilai absis dan ordinat yang diperoleh, dibuat suatu kurva standar dengan metode Regresi Power ($y = ax^b$). Selanjutnya, berat molekul pita protein profil plasma darah mencit ditentukan dengan persamaan tersebut.

Data profil protein yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan mengamati komposisi protein penyusun plasma darah mencit, meliputi ada atau tidaknya pita protein, serta tebal atau tipisnya pita protein yang muncul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Fitokimia

Table 1. Hasil uji fitokimia ekstrak daun gambir laut dan makroalga merah

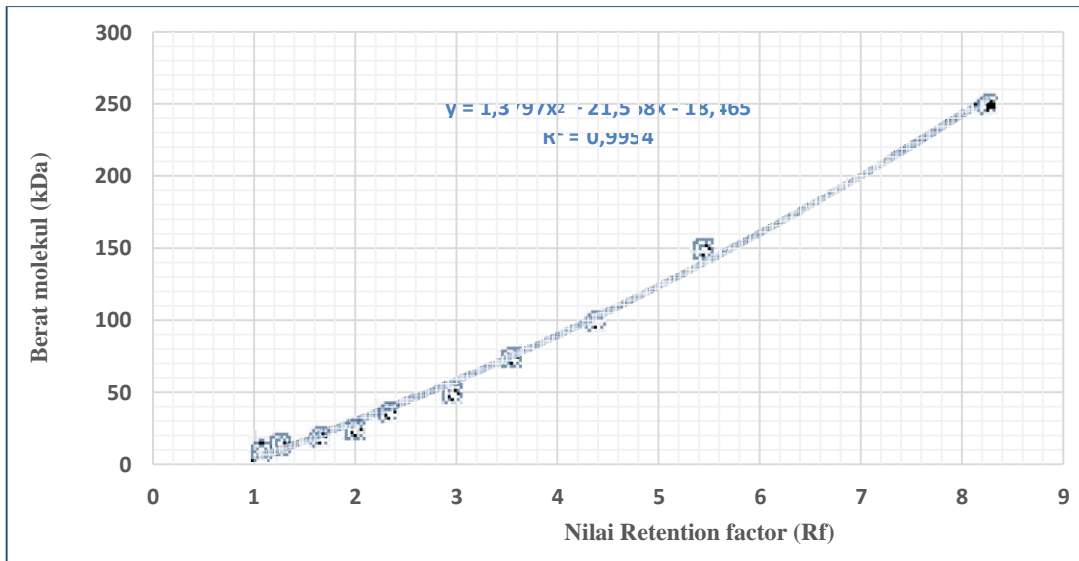
Uji Fitokimia	Gambir Laut	Makroalga merah
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Streroid	-	-
Terpenoid	+	+
Tanin	+	+
Alkaloid	-	-

Keterangan : (+) = mengandung senyawa uji
(-) = tidak mengandung senyawa uji

Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak daun gambir laut (*Clerodendrum inerme*) dan makroalga merah (*Eucheuma cottonii*) positif mengandung senyawa flavonoid, saponin, terpenoid, dan tanin.

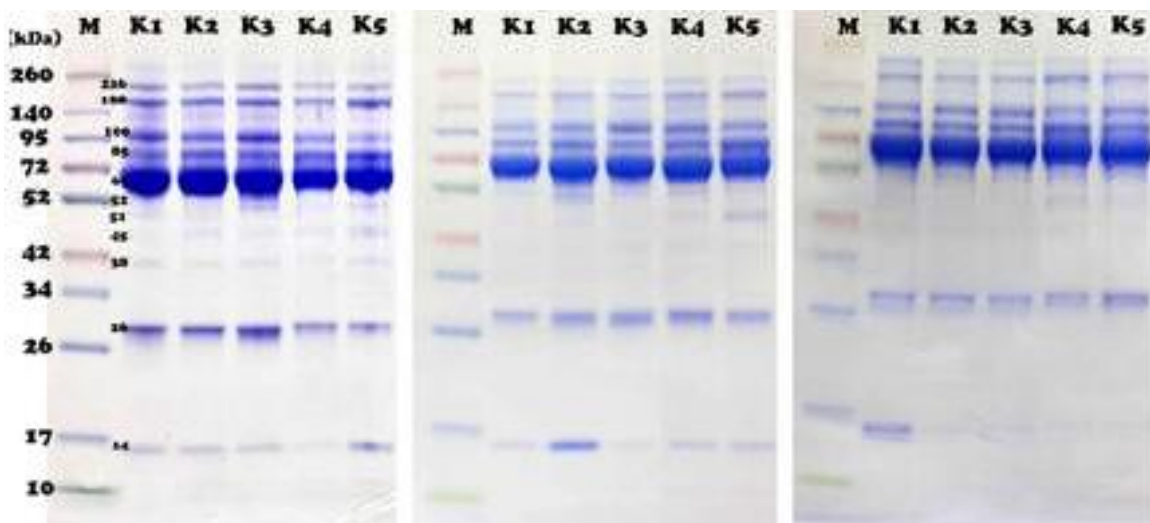
Analisis Profil Protein

Berikut ini merupakan kurva standar protein marker dengan persamaan regresi parabola kuadrat $y = 1,3797x^2 + 21,568x - 18,465$



Gambar 1. Kurva standar protein marker

Berdasarkan persamaan di atas, dapat ditentukan berat molekul protein plasma darah mencit. Berat molekul dihitung dengan mencari nilai x (Rf) dari masing-masing pita protein, kemudian disubstitusikan kedalam rumus regresi parabola kuadrat di atas.



Gambar 2. Profil protein plasma darah mencit pada gel SDS-Page

Berdasarkan hasil penelitian, secara umum terdapat 11 pita protein yang muncul pada seluruh kelompok perlakuan (K1, K2, K3, K4, dan K5), yaitu protein dengan berat molekul masing-masing 14 kDa, 26 kDa, 38 kDa, 45 kDa, 51 kDa, 52 kDa, 67 kDa, 85 kDa, 100 kDa, 168 kDa, 226 kDa.

Pada kelompok gel ke-2 di atas terlihat adanya pita protein dengan berat molekul 14 kDa yang terekspresi lebih tebal daripada kelompok K2 di kelompok gel ke-1 dan ke-3. K2 merupakan kelompok perlakuan yang hanya diinduksi benzo(α)piren. Penginduksian benzo(α)piren terlihat memiliki dampak pada ekspresi pita protein yang muncul pada profil plasma darah mencit. Adanya maupun tebal-tipisnya ekspresi pita protein yang tampak kemungkinan dikarenakan penginduksian zat karsinogen tersebut.

Tingkat ketebalan pita protein yang divisualisasi pada hasil elektroforesis SDS-PAGE menggambarkan tinggi rendahnya konsentrasi protein yang terdapat di dalam plasma darah (Gunanti *et al.*, 2010). Pada penelitian ini pita protein yang terekspresi paling tebal dalam profil plasma darah mencit memiliki kisaran berat molekul 67 kDa, yaitu albumin. Albumin merupakan protein plasma terbanyak dalam tubuh (sekitar 55-60%), yang berfungsi sebagai penjaga tekanan osmotik dalam darah (Nicholson, *et al.*, 2000). Pita protein albumin pada serum darah beberapa rodensia terlihat sangat tebal dan terletak pada kisaran berat molekul 60-69 kDa (Colak *et al.*, 2002 dan Kreyling, *et al.* 2014).

Visualisasi profil protein plasma darah mencit di atas belum memberikan hasil yang bermakna terhadap kelompok mencit yang diberikan ekstrak daun gambir laut, makroalga merah dan taurin serta induksi karsinogenik benzo(α)piren. Hal ini disebabkan oleh respon fisiologis setiap individu berbeda-beda. Hal tersebut berkaitan dengan kemampuan depurasi makhluk hidup berbeda-beda, tergantung dari daya tahan tubuh, jenis, ukuran, berapa banyak polutan yang masuk, dan berapa lama makhluk hidup terpapar polutan.

Pada organisme, invertebrate kurang efektif dalam proses metabolisme PAH dibandingkan ikan. Douben (2003) menjelaskan pada ikan teleostei, proses biotransformasi PAH lebih cepat dibandingkan invertebrate yang hidup di air. Biotransformasi merupakan teknik metabolisme yang memanfaatkan kerja enzim untuk mengubah suatu senyawa kimia menjadi bentuk lain yang lebih berguna bagi tubuh. Hal tersebut menyebabkan invertebrata lebih mudah terpapar PAH dibandingkan ikan teleostei. Meskipun demikian, sistem metabolisme invertebrate tersebut berbeda satu dengan yang lain.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak metanol makroalga merah (*Eucheuma cottonii*) dan gambir laut (*Clerodendrum inerme*) serta taurin belum memberikan hasil yang bermakna terhadap profil protein plasma darah mencit jantan (*Mus musculus* L.) yang diinduksi senyawa karsinogenik benzo(α)piren dikarenakan respon fisiologis setiap individu berbeda-beda.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan uji lanjutan immunoblotting untuk mengetahui protein spesifik apa yang terkandung dalam plasma darah mencit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Tim Pasca Sarjana 2017/2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, W. H., C. S. Foote, B. L. Iverson, dan E. V. Anslyn. 2009. Organic chemistry. USA, Brooks/Cole Cengage Learning.
- Casarett, L.J., dan Doull, J. (2008). *Toxicology the Basic Science of Poisons*.
Editor: Curtis D. Klaassen. Edisi Ketujuh. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.

Halaman 28, 31, 32.

- Colak, R., N. Yigit, E. Colak. SDS-PAGE Patterns of Blood Serum Proteins in some Species of the Genus *Meriones* (Mammalia: Rodentia). *Turk J Zool.* 26: 177-181.
- Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati. Workshop Pengembangan Sumberdaya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati : FMIPA Universitas Andalas Padang.
- Delaware Health and Social Services. 2009. Benzo[a]pyrene. <http://www.dhss.delaware.gov/dhss/dph/files/benzopyrenefaq.pdf>.
- Douben, P. E. T. 2003. PAHs : *an ecotoxicological perspective*. England, John Wiley & Sons, Ltd.
- Faust, R. A., dan P. Reno. 1994. Toxicity summary for benzo[a]pyrene. Tennessee, Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program.
- Franca, R.T., M.M. Costa, D.B. Martins, M. Pagnoncelli, M.L. Leal, C.M. Mazzanti, H.E. Palma. C.P. Kunert, F.C. Paim, dan S.T.A. Lopes. 2011. Protein profile of buffaloes of different ages. *Acta Scientiae Veterinariae* 39(4): 995-1000.
- Gudbjarnason, S. 1999. Bioactive Marine Natural Products. *Rit fiskideiddal.* 16:107–110.
- Gunanti, M., Ulia, F., Sri, D. (2010). Karakterisasi protein *Larnea cyprinacea* dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan.* 2(1): 61-66.
- Irfan, I.Z., Esfandiari A., dan Choliq C. 2014. Profil Protein Total, Albumin, Globulin dan Rasio Albumin dan Globulin Sapi Pejantan Bibit. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19(2): 123-129.
- Ismail, A.I., Ahmad, A., Seniwati. 2012. Isolasi dan Identifikasi Protein Bioaktif dari Alga Merah *Euclima cottonii* serta Potensinya Sebagai Antikanker. *Repository Universitas Hasanudin.* Makassar.
- Kadarisman I. 2000. Isolasi dan Identifikasi Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar*). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kreyling, W. G., S. Fertsch-Gapp, M. Schäffler, B. D. Johnston, N. Haber, C. Pfeiffer, J. D. A. Schleh, S. Hirn, M. Semmler-Behnke, M. Epple dan W. J. Parak. 2014. In vitro and in vivo interactions of selected nanoparticles with rodent serum proteins and their consequences in biokinetics. *Beilstein J. Nanotechnol.* 5:1699–1711.
- Manoharan, S., Kavitha K., Senthil N., Renju G.L. 2006. Evaluation of Anticarcinogenic Effects of *Clerodendron inerme* on 7,12-Dimethylbenz(a) Anthracene-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *Singapore Med J,* 47(12), pp. 1038–1043.
- Murray, R.W. 1996. *Biokimia Kedokteran Harper, Edisi 24*, Penerbit Buku Kedokteran EG. Jakarta.
- Nicholson, J.P., M.R. Wolmaran, dan G. R. Park. 2000. The Role Of Albumin In Critical Illness. *British Journal of Anaesthesia.* 85 (4): 599-610.
- Murray R. K. and Granner D. K., *Biokimia Harper*, Jakarta: EGC, 2003.
- Redmon, H., P. Stapleton, and David. 1983. Immunonutrition. *The role of Taurine. Nutrition* 14. 559-604.
- Renju, G.L., Manojaran S., Balakrishnan S., Senthil N. 2007. *Chemopreventive and Antilipidperoxidative Potential of Clerodendron inerme (L) Gaertn in 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice.* *Pak J Biol Sci,* 10(9), pp.1465–1470.
- Sangi, M., M.R.J. Runtuwene, H.E.J. Runtuwene, H.E.I Simbala dan V.M.A Makang, 2008. Analisa Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Jurnal Chemical Program* 1(1) 47-53 Manado.
- Sa'adah, N. N., A. P. D. Nurhayati dan M. Shovitri. 2016. The Anticancer Activity of the Marine Sponge *Aaptos suberitoides* to Protein Profile of Fibrosarcoma Mice (*Mus musculus*). *IPTEK, The Journal for Technology and Science* 27(3):53-58.
- Terzi, G., T. H. Çelik, dan C. Nisbet. 2008. Determination of benzo[a]pyrene in Turkish döner kebab samples cooked with charcoal or gas fire. *Irish Journal of Agricultural and Food Research,* (47) : 187–193.
- Tewari, A. K., A. Popova-Butler, M. A. El-Mahdy, dan J. L. Zweier. 2011. Identification of Differentially Expressed Proteins in Blood Plasma of Control and Cigarette Smoke-Exposed Mice by 2-D DIGE/MS. *Proteomics* 11(10): 2051–62.