

Penentuan Kadar Protein Air Liur Lintah (*Hirudo medicinalis L.*) dengan Metode Bradford

Protein Content Leech Saliva (*Hirudo medicinalis L.*) with Bradford Assay

¹Akmal Yuliandi Pratama, ²Anggi Arumsari, ³Hilda Aprilia.

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116

email: ¹takmal.tama@gmail.com, ²anggiarumsari@yahoo.com, ³Hilda.apriliah@gmail.com

Abstract. This research aims to determine the content of protein from leeches' saliva (*Hirudo medicinalis L.*). The leeches were starved for 14 weeks. They were fed a phagostimulatory solution by sucking through parafilm membrane, then forced to regurgitate the solution by soaking them in an ice-container and also squeezing them from posterior to anterior. The content protein was tested by using Bradford assay which produces complex of brilliant blue coomassie dye of G-250 with protein. The complexity was analyzed in colorimetry way by using UV-VIS spectrophotometer at 595 nm wavelength. The result from calculating protein content of the leeches' saliva was 0.038 mg / mL \pm 0.005.

Keywords: Leech (*Hirudo medicinalis L.*), protein, Bradford assay.

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein air liur lintah (*Hirudo medicinalis L.*). Lintah dipuasakan selama 14 minggu. Lintah diberi makan larutan *phagostimulatory* dengan cara menyedot melalui membran parafilm, lalu dipaksa untuk memuntahkan larutan tersebut dengan cara dimasukan ke dalam wadah berisi es dan diperas dari bagian *posterior* menuju bagian *anterior*. Pengujian kadar protein menggunakan metode Bradford yang menghasilkan kompleks antara zat pewarna coomassie brilliant blue G-250 dengan protein, kompleks tersebut dianalisis dengan menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 595 nm. Hasil perhitungan kadar protein dari air liur lintah adalah 0,038 mg/mL \pm 0,005.

Kata Kunci: lintah (*Hirudo medicinalis L.*), protein, metode Bradford.

A. Pendahuluan

Lintah merupakan hewan *invertebrata* yang termasuk dalam filum Annelida dan subkelas Hirudinea yang tersebar di seluruh dunia yang dapat hidup di berbagai habitat seperti air tawar, air laut, gurun, dan oasis (Gouda, 2006). Lintah memiliki kemampuan unik menyedot darah dengan menggunakan alat penghisap mereka untuk menusuk melalui kulit dan secara bersamaan merilis zat anastesi untuk menghilangkan rasa sakit dari gigitan yang ditimbulkan. Komponen *saliva* yang dilepaskan dapat mencegah darah dari pembekuan dan mengeluarkan antikoagulan sebagai zat pengencer darah (Das, 2013).

Ekstrak air liur lintah mengandung senyawa biologis aktif yang sebagian besar merupakan peptida dan protein (Abdualkader, et.al., 2011). Lebih dari 100 zat bioaktif termasuk bakteriostatik, analgesik, anti-edema, meningkatkan aktivitas sistem kekebalan tubuh, menghilangkan gangguan mikrosirkulasi, mengembalikan permeabilitas jaringan dan organ, anti-hipoksia, mendetoksifikasi organ dan anti-koagulan (Glyova, 2005).

Sementara, populasi lintah air tawar di Indonesia sangat melimpah terutama pada sungai yang mempunyai kecepatan air yang cukup lambat dan dangkal (Siahaan, dkk., 2012). Namun penelitian ilmiah tentang lintah di Indonesia sangat minim.

Berdasarkan penjelasan diatas dapat dirumuskan masalah yaitu berapa kadar protein yang terdapat dalam air liur lintah yang berasal dari Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein yang terkandung dalam air liur lintah. Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi tentang kadar protein air liur lintah yang selanjutnya dapat dijadikan sebagai acuan dalam meneliti manfaat lain dari

air liur lintah.

B. Landasan Teori

Lintah

Lintah (*Hirudo medicinalis L.*) adalah binatang melata yang berdasarkan habitatnya hidup di air untuk menjaga kelembaban dan suhu tubuhnya (Rusyana, 2011). Lintah sangat tahan terhadap kelaparan dan memiliki tingkat metabolik yang sangat rendah sehingga dapat bertahan hidup berbulan-bulan tanpa penyerapan makanan. Ketika ada kesempatan lintah mampu menelan sejumlah besar darah, meningkatkan berat badanya hingga 5 kali lipat bahkan lebih (Zebe, *et.al.*, 1985). Morfologi dari *Hirudo medicinalis* yaitu pipih, tidak berambut, pada ujung anterior dan posterior terdapat alat penghisap bagian anterior yang dilengkapi dengan 3 buah rahang (Rusyana, 2011). Masing-masing dari tiga rahang tersebut mempunyai 100 gigi, dengan total 300 gigi (Fort, 2001).

Air Liur Lintah

Air Liur lintah mengandung lebih dari 100 zat bioaktif termasuk bakteriostatik, analgesik, anti-edema, meningkatkan aktivitas sistem kekebalan tubuh, menghilangkan gangguan mikrosirkulasi, mengembalikan permeabilitas jaringan dan organ, anti-hipoksia, mendetoksifikasi organ dan anti-koagulan (Glyova, 2005). Senyawa biologis aktif yang terkandung dalam air liur lintah sebagian besar merupakan peptida dan protein (Abdualkader *et.al.*, 2011).

Protein

Protein merupakan sumber asam amino yang terdiri dari unsur C, H, O, dan N. Protein berfungsi sebagai zat pembangun jaringan-jaringan baru, pengatur proses metabolisme tubuh dan sebagai bahan bakar apabila keperluan energi tubuh tidak terpenuhi oleh lemak dan karbohidrat (Winarno 1986).

Protein tersusun dari berbagai asam amino yang masing-masing dihubungkan dengan ikatan peptida. Peptida adalah jenis ikatan kovalen yang menghubungkan suatu gugus karboksil satu asam amino dengan gugus amino asam amino lainnya sehingga terbentuk suatu polimer asam amino (Toha, 2001).

Analisis Kuantitatif Protein

Analisis protein umumnya bertujuan untuk mengukur kadar protein dalam bahan makanan. Analisis protein dapat dilakukan antara lain dengan metode Kjeldahl, Lowry, Biuret, Bradford, turbidimetri dan titrasi formol (Sudarmadji *dkk.*, 2007).

Metode Bradford digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan. Prinsip metode ini berdasarkan pembentukan kompleks antara *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) dengan larutan protein yang diukur pada panjang gelombang 595 nm. Pembentukan kompleks disebabkan adanya ikatan antara pewarna CBB dengan protein melalui interaksi ionik antara gugus asam sulfonat dengan muatan positif protein yaitu pada gugus amina. Asam amino bebas, peptide dan protein dengan berat molekul kecil tidak menghasilkan warna biru dengan reagen ini. Umumnya berat molekul peptida atau protein harus lebih besar dari 3000 Da untuk menghasilkan warna biru dengan reagen ini. Banyaknya ligan yang berikatan dengan molekul protein sebanding dengan muatan positif protein, sehingga jumlah absorbansi sebanding dengan kadar protein dalam larutan (Pierce, 2005).

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Penyiapan Sampel dari Air Liur Lintah

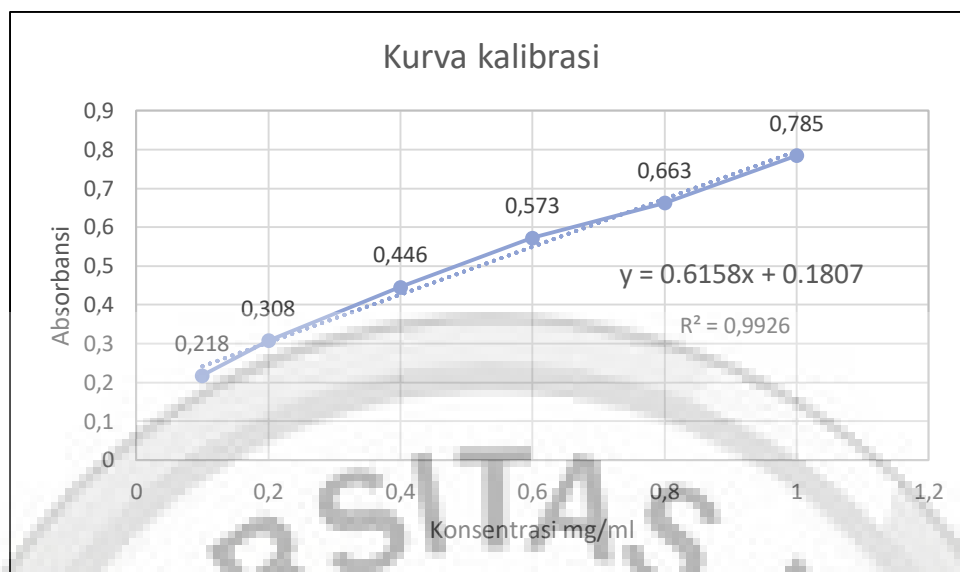
Pada penyiapan sampel pertama yang dilakukan adalah menimbang lintah yang telah dipuasakan dan akan digunakan, lintah yang akan digunakan mempunyai berat 1,257 gram. Kemudian dilakukan pembuatan larutan *phagostimulatory*. Larutan *phagostimulatory* merupakan larutan perangsang makan (Suhas, et al., 2009). Larutan dibuat dengan melarutkan l-arginin 0,001M dalam 0,15M NaCl, kemudian ditutupi membran film dan panaskan hingga mencapai suhu 37⁰C bertujuan untuk menyerupai kondisi sensitivitas biologis hewan serta karena NaCl dan l-arginin merupakan bahan kimia komponen dari sekresi kulit hewan (Hildebrandt, 2011).

Lintah yang telah dilaparkan diberi makan larutan *phagostimulatory* dengan cara menyedot larutan melalui parafilm. Setelah lintah memakan larutan *phagostimulatory* selama 15 menit 23 detik, maka berat lintah menjadi 6,823 gram. Selanjutnya lintah dimasukan kedalam wadah yang berisi es selama 15-20 menit bertujuan untuk membuat lintah menjadi lumpuh dan memuntahkan larutan yang telah dimakan (Abdualkader, et al., 2011). Kemudian lintah diperas dengan cara memeras dari bagian *posterior* menuju bagian *anterior* hingga lintah tidak mengeluarkan air liur. Air liur yang terkumpul setelah pemerasan sebanyak 2,7 mL. Selanjutnya air liur disaring, penyaringan bertujuan untuk memisahkan antara air liur dan lendir lintah, kemudian air liur hasil penyaringan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4⁰C dan supernatan hasil sentrifugasi dijadikan sampel air liur lintah.

Penentuan Kadar Protein

Pada penentuan kadar protein digunakan metode Bradford untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan. Metode ini dipilih untuk mengkonfirmasi terjadinya hidrolisis protein menjadi asam amino, karena pada metode ini asam amino tidak mampu membentuk kompleks dengan CBB (*Coomassie Brilliant Blue*) sehingga tidak menghasilkan warna biru (Pierce, 2005). CBB akan berikatan dengan peptida pada sampel dalam suasana asam. Gugus sulfonat pada CBB dijadikan gugus pelarut zat warna karena didalam air gugus sulfonat tersebut akan mengion sehingga terbentuk anion zat warna yang selanjutnya memudahkan terbentuknya ikatan dengan protein (Rahmawati, 2013). *Bovine serum albumin* (BSA) sering digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar protein terlarut menggunakan metode Bradford karena tingkat kemurniannya tinggi dan harganya relatif murah (Khee, 2001).

Pada penelitian ini digunakan standar BSA dengan konsentrasi 0,1-1 mg/mL. Persamaan yang diperoleh dari kurva standar BSA, dapat digunakan untuk menghitung kadar protein dalam larutan sampel. Berikut ini kurva kalibrasi yang dibuat dengan konsentrasi 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 dan 1 mg/mL.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi BSA

Dari hasil gambar kurva kalibrasi diatas, didapat persamaan regresi linier adalah $y = 0,6158 x + 0,1807$ dengan koefisien korelasinya (r) yaitu 0.992. Kemudian Pada penelitian ini kadar protein terlarut diukur sebanyak tiga kali pengukuran.

Tabel 1. Kadar Protein Air Liur Lintah

Sampel	Absorbansi	Kadar(mg/mL)	\bar{x}	s_x
1	0,204	0,038		
2	0,201	0,033	0,038	0,005
3	0,207	0,043		

Dari hasil perhitungan, bahwa kadar protein dari air liur lintah adalah $0,038 \text{ mg/mL} \pm 0,005$.

D. Kesimpulan

Dari hasil pembahasan penetapan kadar protein air liur lintah (*Hirudo medicinalis L.*), maka dapat diambil kesimpulan bahwa kadar protein rata-rata dari air liur lintah (*Hirudo medicinalis L.*) adalah $0,038 \text{ mg/mL} \pm 0,005$.

E. Saran

Perlu dilakukan studi lanjut terhadap metode analisis lain untuk penentuan kadar protein dari air liur lintah (*Hirudo medicinalis L.*).

Daftar Pustaka

- Abdualkader, A.M., Merzouk, A., Ghawi, A.M., Alaama, M. (2011). Some Biological Activities of Malaysian Leech Saliva Extract, *IJUM Engineering Journal*, Vol. 12, No. 4.
- Das, B.K. (2013). An Overview on Hirudotherapy/Leech therapy, *India Research Journal of Pharmacy and Science*, 1st December.
- Fort, C.W. (2001). *Leech Therapy: Current Uses for an Old Treatment*, Delaware Nurse Association (DNA), 26: 16-17.
- Glyova, O. (2005). *Modern Hirudotherapy-A* [abstract], (Biotherapeutics, Education and Research Foundation). The (BeTER) LeTTER ; 2:1-3.
- Gouda, H.A. (2006). The Effect of Peritrich Ciliates on Some Freshwater Leeches from Assiut, Egypt. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 143-149.
- Hildebrandt, J.P., Lemke, S. (2011). *Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, Hirudo medicinalis* [abstract], Germany Greifswald 17489.
- Khee, C. R. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Son 5, Inc.
- Pierce. (2005). *Protein Assay Technical Handbook*. (www.piercenet.com/path95n), diunduh pada 15 januari 2013.
- Rahmawati, N. (2013). *Kandungan Protein Terlarut Daging Ikan Patin (Pangasius djambal) Akibat Variasi Pakan [Skripsi]*, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.
- Rusyana, A., (2011). *Zoologi Invertebrata (Teori dan Praktik)*, Alfabeta press. Hal 14-15. Bandung.
- Sudarmadji, Slamet. (1996). *Teknik Analisa Biokimiawi*, Liberty, Yogyakarta.
- Siahaan, R., Indrawan, A., Soedharma, D., Prasetyo, L.B. (2012). *Keanekaragaman Makrozoobentos sebagai Indikator Kualitas Air Sungai Cisadane, Jawa Barat-Banten*. Institut Pertanian Bogor.
- Suhas Y, JB Gopali, Patil and S Lingappa. (2009). *Effect of different adjuvants in enhancing the BV efficacy of HaNPV against Helicoverpa armigera (Hubner) in pigeonpea*. Karnataka Journal of Agricultural Science 22 (3), 502-503.
- Toha, A.H. (2001). *Biokimia: Metabolisme Biomolekul*. Alfabeta, Bandung.
- Winarno, F.G. (1986). *Kimia Pangan dan Gizi I*. PT.Gramedia, Jakarta.
- Zebe E, Roters FJ, Kaiping B. (1985). Metabolic Changes In The Medical Leech *Hirudo medicinalis* Following Feeding, Zoologisch Institut, *Journal Lehrstuhl fur Zoophysiologie*, 22th August, Vol. 84A, No.1.