Isolasi dan Karakterisasi Fosfolipase A₂ dari Racun Duri *Acanthaster planci* Isolat Perairan Papua

La Goa, Sahlan dan Wijanarko

Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia,
Kampus Baru UI Depok, Depok, 16424, Indonesia

Email: anondho@eng.ui.ac.id; sahlan16@yahoo.com; yushi_hita@yahoo.com

Abstrak

Acanthaster planci (*A.planci*) merupakan pemangsa karang yang sangat berbahaya, yang dapat mengganggu ekosistem terumbu karang jika terjadi peledakan populasi. Oleh karena itu perlu dilakukan pengendalian populasi *A.planci*. Duri *A.planci* menghasilkan racun yang mengandung fosfolipase-A₂ (PLA₂) (Shiomi *et al.*, 1998) yang dapat digunakan sebagai anti bakteri, anti virus, anti koagulan dan membantu metabolisme lipid. Sehingga racun tersebut dapat dimanfaatkan untuk bidang kedokteran dan farmasi. Pemanfaatan racun duri *A.planci* dapat menjadi solusi bagi pengendalian populasinya. Pada penelitian ini isolasi PLA₂ dilakukan sesuai dengan metode Savitri *et al.*, 2011 dan modifikasi metode Savitri *et al.*, 2011 yaitu tanpa teknik pemanasan *crude venom*. Hasil isolasi PLA₂ dari duri *A.planci* yang berasal dari perairan Papua dengan metode Savitri diperoleh aktifitas spesifik PLA₂ menurun karena adanya teknik pemanasan *crude venom*. Hasil isolasi dengan modifikasi metode Savitri diperoleh pada fraksinasi 20% amonium sulfat memiliki aktifitas spesifik 26,67 unit/mg protein dan tingkat kemurnian 37 kali dari aktifitas spesifik *crude venom*. Uji kation sebagai kofaktor terhadap aktifitas spesifik diperoleh PLA₂ yang dihasilkan adalah PLA₂ Ca²⁺ independent.

Abstract

Acanthaster planci is an extremely dangerous corallivores, especially its dramatic outbreak that disrupt the ecosystem of coral reefs. Therefore necessary to control *A.planci* population. *A.planci* spines venom contain phospholipase-A₂ (Shiomi *et al.*, 1998), that can be used as an antibacterial, antiviral, anticoagulant and help lipid metabolism. So that venom can be used for medical and pharmaceutical fields. Utilization of *A.planci* spines venom can be a solution for population control *A.planci*. In this study, the isolation of PLA₂ is in accordance with the method of Savitri *et al.*, 2011 and modification of Savitri method which is without heating of crude venom. Specific activity of PLA₂ from Papua's *A.planci* spines venom which isolation process with heating technique is decrease. Result of isolation PLA₂ with modification of Savitri method obtain in 20% ammonium sulfate fractionation with specific activity 26,67 units/mg of protein and purity factor 37 times of crude venom. Assay of the influence cation as a cofactor againsts specific activity of PLA₂ obtain Ca²⁺ independent characteristic.

Keyword : *Acanthaster planci*, Fosfolipase A₂, Ca²⁺ independent PLA₂

Pendahuluan

Bintang laut *Acanthaster planci* (*A.planci*) atau yang sering dikenal dengan *crown-of-thorns* (COT) adalah pemangsa polip karang. Pada saat terjadi *outbreak* dapat merusak ekosistem karang. Habitat *A. planci* di perairan tropis dan subtropis. Letak Indonesia yang berada didaerah tropis dengan distribusi karang terbesar di dunia yaitu 16.000 km² (10% luas daerah terumbu karang dunia) membuat Indonesia harus dapat

menanggulangi kepadatan *A.planci* dengan baik. *A. planci* ini diketahui memiliki duri beracun dipermukaan tubuhnya. Duri tersebut mengandung racun sehingga jika manusia tertusuk oleh duri *A.planci* akan menyebabkan berbagai gejala patologikal seperti pembengkakan, perih sampai muntah - muntah. hasil ekstrak racun dari duri *A. planci*. Aktifitas biologi itu antara lain : kematian pada tikus, aktifitas hemolitik, aktifitas *myonecrotic*, aktifitas pendarahan, peningkatan aktifitas permeabilitas kapiler, aktifitas edema,

aktifitas fosfolipase-A₂ (PLA₂) (Shiomi *et al.*, 1985), aktifitas pelepasan histamin dari *mast cell* (Shiomi *et al.*, 1989), aktifitas kardiovaskular (Yara *et al.*, 1992; Shiroma *et al.*, 1994) dan aktifitas antikoagulan (Karasudani *et al.*, 1996).

Aktifitas biologi racun dari *A.planci* dapat berkontribusi bagi dunia kedokteran dan farmasi. Untuk PLA₂ sudah banyak penelitian dilakukan terutama pada PLA₂ yang diisolasi dari racun ular. Penggunaan PLA₂ diantaranya sebagai antibakteri *Burkholderia pseudomallei* (Samy R. P., *et al.*, 2006). PLA₂ dari racun lebah dan ular dapat digunakan sebagai inhibitor bagi HIV (Fernard D., *et al.*, 1999).

Maka dari itu penelitian ini bertujuan untuk mengantisipasi peledakan populasi *A. planci* dengan mengisolasi PLA₂ dari racun dari *A.planci* untuk kepentingan di bidang farmasi. Proses isolasi PLA₂ (Savitri *et al.*, 2011) yaitu dengan memadukan proses sonikasi, pemanasan dan fraksinasi garam amonium sulfat. Sonikasi adalah proses yang sangat efektif untuk menghancurkan membran sel tumbuhan maupun hewan. Prinsip dasar dari sonikasi adalah adanya getaran yang disebabkan oleh frekuensi gelombang ultrasonik pada resonansi 15 – 25 kHz. Gelombang ultrasonik akan menyebabkan terjadi kavitasi yang dapat merusak dinding sel. Pemurnian protein menggunakan ammonium sulfat adalah metode yang sering digunakan karena memiliki daya larut tinggi di dalam air, relatif murah dan menstabilkan protein.

Indonesia merupakan negara yang termasuk dalam persebaran terumbu karang Indo-Pasific dengan spesies hewan laut yang beragam. Pada penelitian sebelumnya dilaporkan terdapat empat spesies *A.planci* (Vogler *et al.*, 2008).

Berdasarkan warna *A.planci* terdapat perbedaan anatomi *A.planci* dari perairan Papua dengan perairan Maluku. Sehingga pada penelitian ini PLA₂ dari racun *A.planci* dari perairan Papua disolasi dengan menggunakan metode Savitri *et al.*, 2011 dan modifikasi metode Savitri *et al.*, 2011 yaitu tanpa teknik pemanasan. Dan kemudian dikarakterisasi kation terhadap aktifitas spesifik PLA₂.

Metode Penelitian

2.1 Bintang Laut

Spesimen *A.planci* diambil dari Tanjung Kasuari, Sorong-Papua Barat pada bulan April 2011. *A.planci* kemudian disimpan dalam lemari es pada temperatur -20°C sampai akan digunakan.

2.2 Prosedur Isolasi

Duri dari *A. planci* digunting dan dikumpulkan sebanyak 50 gr. Lalu direndam dalam bufer fosfat 0.01 M, pH 7.0 sebanyak 100 ml dan 10 ml CaCl 0,1 M lalu dihomogenisasi dengan cara sonikasi. Proses sonikasi dilakukan selama 8 menit. Setelah itu duri dan larutan yang mengandung racun dipisahkan sehingga diperoleh *crude venom*. *Crude venom* selanjutnya di refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 30 menit untuk dipisahkan pengotornya. Supernatannya digunakan untuk fraksinasi ammonium sulfat.

2.3 Pengendapan Fraksinasi Ammonium Sulfat

Supernatan hasil isolasi mulai diendapkan protein enzimnya dengan garam ammonium sulfat secara bertahap (fraksinasi) 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menurut derajat kelarutannya. Setiap pengendapan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dan wadah sampel direndam dalam es supaya terjaga suhunya 0°C. Pemisahan endapan dilakukan dengan refrigerasi sentrifuse 15.000g selama 30 menit. Endapan hasil sentrifuse masing-masing fraksi dilarutkan dalam bufer fosfat 0,01 M, pH 7.0, sebanyak 1,5 ml

2.4 Uji Antikoagulan

Uji antikoagulan dimaksudkan untuk membuktikan keberhasilan proses sonikasi mengekstrak racun dari *A.planci*. Antikoagulan merupakan ciri khas racun dari *A. planci* yang ditandai dengan larutnya koagulan darah. *Crude venom* dimasukkan ke dalam substrat darah manusia untuk diamati aktivitas antikoagulan.

2.5 Uji Aktivitas PLA₂

Uji aktivitas PLA₂ menggunakan metode Marinetti, 1965. Kuning telur sebanyak 0,2 gr dilarutkan dalam labu ukur 100 ml yang berisi bufer Tris-HCl 0,1 M, pH 8.0. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 900 nm selama 5 menit menggunakan spektrofotometer. Sebanyak 0,2 ml sampel enzim dimasukkan 3 ml substrat kuning telur, di-vortex lalu diukur pengurangan absorbansinya selama 5 menit. Blanko substrat diukur tanpa menggunakan sampel enzim. Pengujian aktivitas juga dilakukan dengan melihat pengaruh kation sebagai kofaktor. Setiap 0,2 ml sampel *crude venom* ditambahkan 32 µl larutan kation 1 M. Sehingga didapatkan konsentrasi akhir kation adalah 10mM.

2.6 Penentuan Kadar Protein Lowry

Penentuan kadar protein dilakukan menggunakan metode Lowry *et al.*, 1951 dengan kurva standar menggunakan bovine serum albumin (BSA) 200µg/ml. Prinsip dasar dari metode ini adalah dengan adanya protein akan terjadi perubahan warna karena adanya reaksi antara protein dengan ion tembaga dari larutan Biuret (1 ml larutan CuSO₄ 1% dan larutan 1 ml NaK-Tartrat 1% dimasukkan ke dalam 100 ml larutan Na₂CO₃ 2%) dan reaksi oksidasi ion tembaga dengan reagen Folin Fenol Ciocalteu 1N. Waktu inkubasi larutan biuret adalah 30 menit dan waktu inkubasi larutan reagen Folin adalah 10 menit. Serapan masing-masing larutan diukur tepat pada menit ke-12 yang ditetapkan pada panjang gelombang 750 nm.

Hasil dan Pembahasan

3.1 Uji Antikoagulan

Homogenisasi sangat penting pada penelitian ini. Tujuan dari homogenisasi untuk mendapatkan racun kasar (*crude venom*) terlarut dalam larutan bufer fosfat. Teknik homogenisasi penelitian ini adalah dengan menggunakan sonikasi. Untuk membuktikan racun kasar telah keluar dilakukan tes antikoagulan. Antikoagulan sebagai efek dari racun dari *A. planci* dimasukkan ke dalam darah manusia. Hasil pengamatannya diperlihatkan pada Gambar 1.

Gambar 1. Hasil Pengamatan Aktivitas Antikoagulan, (1)darah dengan racun (2)darah dengan bufer fosfat (3) darah

Pengamatan dilakukan pada 3 substrat darah, yaitu: darah dengan *crude venom* (cawan 1), darah dengan bufer fosfat pH 7.0 (cawan 2), dan darah sebagai kontrol (cawan 3). Pada cawan 3, darah tidak mengental setelah dibiarkan 15 menit. Pada cawan 2, terlihat ada cairan disekitar plasma darah. Namun jika dilihat dengan baik terlihat perbedaan warna cairan serum antara cawan 1 dan cawan 2. Dimana pada cawan 1 cairan darah disekitar gumpalan darah lebih pekat, hal ini terjadi karena sel darah merah (eritrosit) hancur karena adanya antikoagulan pada *crude venom*. Sedangkan pada cawan 2, hanya serumnya saja yang terlarut. Dari hasil uji antikoagulan membuktikan bahwa *crude venom* yang didapat dari hasil sonikasi lalu

2.7. Penentuan Massa Molekul

Penentuan massa molekul menggunakan *sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Dengan gel resolving 15%. Sampel bufer mengandung 3,55 ml dH₂O, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH. 6,8, gliserol 2,5 ml, 2 ml SDS 10%, 0,2 ml 0,5% bromofenol blue dan 50 µl β-mercaptoetanol. Sampel enzim dicampur dengan sampel bufer dengan perbandingan 1:2 kemudian dipanaskan pada temperatur 95°C selama 5 menit untuk mendenaturasi protein.

disentrifuse dengan kecepatan 15.000g pada suhu 4°C selama 30 menit, menghasilkan antikoagulan. Dengan kata lain proses sonifikasi dapat digunakan untuk mengeluarkan racun *A.planci*.

3.2 Penentuan Kadar Protein

Setiap endapan hasil fraksinasi 20-100% amonium sulfat diuji kadar proteinnya dengan menggunakan Metode Lowry dengan BSA 200µg/ml sebagai standarnya, kurva standar dapat dilihat pada Gambar 2. Pada tabel 1 dapat dilihat kadar protein fosfolipase-A₂ dengan proses isolasi tanpa pemanasan (modifikasi metode Savitri *et al.*, 2011).

Gambar 2. Kurva Standar Protein BSA

Dari kurva standar ini diperoleh persamaan linear hubungan massa BSA dan absorbansi $y = 0,0016x + 0,0306$. Dengan y adalah absorbansi pada panjang gelombang 750 nm. Dari persamaan kurva standar ini dapat dihitung kadar protein dari sampel enzim. Sampel enzim yang ditambahkan 20 µl setiap pengukuran protein Lowry.

Tabel 1. Kadar Protein Sampel Enzim

Keterangan	Absorbansi aktual	kandungan protein (mg)/20ml	kadar protein (mg/mL)
CV	0,1415	38.6875	1.9344
F20%	0,0875	4.9375	0.2469
F40%	0,1965	73.0625	3.6531
F60%	0,7185	399.3125	19.9656
F80%	0,6945	384.3125	19.2156
F100%	0,3535	163.6875	8.1844

Ket : CV : *crude venom*

3.3 Hasil Uji Aktivitas PLA₂

Hasil isolasi enzim PLA₂ kemudian di uji aktifitasnya dengan kuning telur untuk melihat pengurangan konsentrasi fosfatidilkolin yang dihidrolisis oleh fosfolipase-A₂ (PLA₂) (Marinetti, 1965). Kuning telur mengandung fosfatidilkolin dihidrolisis dengan PLA₂ membentuk 1-asil-gliserofosfokolin dan asam karboksilat. Sehingga dengan penambahan enzim fosfolipase-A₂ fosfatidilkolin terhidrolisis yang menyebabkan suspensi kuning telur menjadi lebih jernih karena 1-asil-gliserofosfokolin akan lebih larut di dalam buffer dan serapan panjang gelombang 900 nm yang mendeteksi keberadaan suspensi fosfatidilkolin yang semakin berkurang karena terlarut dalam larutan sampel uji.

Pada gambar 3 dapat dilihat bahwa laju pengurangan konsentrasi fosfatidilkolin pada *crude venom* tidak terlalu cepat. Hal ini dikarenakan konsentrasi PLA₂ masih sangat kecil karena PLA₂ pada *crude venom* merupakan fasa supernatan dari hasil sentrifugasi. Sedangkan untuk PLA₂ hasil fraksionasi 20-100% yang diambil adalah endapan hasil sentrifugasi yang kemudian di resuspensi ke dalam 1,5 ml buffer fosfat 0,01 M pH 7. Dari gambar 4.6 untuk PLA₂ hasil fraksionasi 20% amonium sulfat penurunan absorbansi akibat 1-

asil-gliserofosfokolin terlarut dalam sampel sangat sedikit karena PLA₂ yang teraggregasi masih sangat sedikit. Namun untuk hasil fraksionasi 40-100% penurunannya sangat cepat karena PLA₂ lebih cenderung terkonsentrat karena jumlah garam amonium sulfat yang ditambahkan.

Dengan hasil perhitungan aktivitas spesifik seperti pada tabel berikut :

Tabel 2. Aktivitas spesifik PLA₂ Hasil Isolasi tanpa Pemanasan Crude Venom

Sampel	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	Purification factor
CV	0,74	1
f20%	27,67	37,29
f40%	4,49	6,05
f60%	1,12	1,51
f80%	1,19	1,61
f100%	2,65	3,58

Tabel 3. Aktivitas spesifik PLA₂ Hasil Isolasi dengan Pemanasan Crude Venom

Sampel	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	Purification factor
CV	24,14	1
PV	20,77	0,86

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa terjadi penurunan aktifitas spesifik PLA₂ sehingga proses isolasi dengan adanya teknik pemanasan tidak dapat digunakan pada proses isolasi *A.planci* dari perairan Papua.

Gambar 3. Penurunan Absorbansi Fosfatidilkolin terhadap Waktu tanpa Pemanasan

Kation dalam enzim berfungsi sebagai koenzim yaitu zat yang dapat mengaktifasi enzim tersebut. Pada penelitian sebelumnya dikatakan Ca^{2+} meningkatkan aktifitas PLA_2 I dan PLA_2 II 180% tetapi ion Cu^{2+} dan Zn^{2+} menghambat aktifitas PLA_2 sampai 10-20% jika keduanya dibandingkan terhadap aktifitas PLA_2 tanpa ada penambahan kation (Shiomi *et al.*,1997). Pada penelitian lain tentang PLA_2 dari racun ular *E. Ocellatus* diperoleh Ca^{2+} meningkatkan aktifitas PLA_2 sedangkan ion Mg^{2+} dan Co^{2+} merupakan inhibitor yang sangat kuat. Ion Cu^{2+} dikatakan cukup menghambat kerja enzim PLA_2 (Sallau *et al.*,2008). Dengan kata lain bisa dikatakan ion Ca^{2+} merupakan kation *dependent* terhadap aktifitas PLA_2 .

Namun dari hasil uji pengaruh kation terhadap *crude venom A. planci* yang berasal dari perairan Papua diperoleh hal yang sebaliknya. Dimana ion Ca^{2+} dan Zn^{2+} cukup menghambat aktifitas PLA_2 yang ada di *crude venom*. Ion Mn^{2+} bersifat inhibitor kuat yang menghambat aktifitas PLA_2 di *crude venom*. Sedangkan *crude venom* yang tidak diberi tambahan kation sama sekali mempunyai aktifitas yang baik. Hasil uji aktifitas dengan penambahan kation dapat dilihat pada gambar 4.

Perhitungan kadar protein pada uji pengaruh kofaktor dilakukan pada *crude venom* yang diencerkan dengan buffer fosfat sebanyak 8 μl untuk tiap 20 μl *crude venom*. Dari hasil

perhitungan kadar protein pada *crude venom* diperoleh kadar protein 0,8563 mg/ml. Dari hasil uji aktifitas *crude venom* dengan penambahan larutan garam klorida dan hasil uji Lowry maka dapat diperoleh perhitungan aktifitas spesifik yang ditampilkan pada dibawah ini.

Tabel 4. Aktivitas spesifik PLA_2 pada *Crude Venom* terhadap pengaruh Kation

Sampel	Aktivitas Spesifik (unit/mg)	Purification factor
CV(kontrol)	68,5	1
Ca^{2+}	2,94	0,04
Co^{2+}	6,57	0,1
Cu^{2+}	73,43	1,07
Fe^{2+}	65,07	0,95
Mg^{2+}	27,49	0,40

Dari perhitungan aktifitas spesifik ini dapat dihitung persentase kofaktor dan inhibitor. Dimana *crude venom* dari *A.planci* dari perairan Papua aktifitasnya meningkat 107% dengan penambahan Cu^{2+} dan 95% dengan penambahan Fe^{2+} . Ion Ca^{2+} hanya meningkatkan aktifitas PLA_2 sebesar 4 %.

Gambar 4. Penurunan Absorbansi Fosfatidilkolin pada Variasi Kation terhadap waktu

3.4. Uji SDS-PAGE

SDS-PAGE menggunakan *cross-linked* gel poliakrilamid sebagai matriks inert di mana

protein akan bermigrasi. Gel biasanya disiapkan sebelum dipergunakan. Ukuran pori gel dapat

disesuaikan sehingga cukup kecil untuk memperlambat migrasi molekul protein yang polipeptida yang panjang. Molekul protein individu dilepaskan dari asosiasinya dengan protein lain dan lipid, serta bebas terlarut pada larutan deterjen.

Dari hasil SDS-PAGE dapat dilihat *crude venom* mempunyai band sekitar 7 kDa, 15 kDa, 27 kDa, 28 kDa dan 2 band lagi disekitar 58 kDa. Seperti pada penelitian sebelumnya yang mengatakan PLA₂ mempunyai berat molekul 15 kDa dengan uji SDS-PAGE (Shiommi *et al.*, 1998)

dikehendaki. Deterjen tersebut mengikat daerah hidrofobik molekul protein terurai menjadi rantai maka disimpulkan pada *crude venom* mengandung PLA₂. Namun hasil SDS-PAGE *crude venom* yang telah difraksinasi dengan ammonium sulfat 20% terlihat 2 band yaitu pada 7 kDa dan 27 kDa. Namun jika kita lihat dari hasil uji aktifitas *crude venom* yang telah difraksinasi juga terdapat aktifitas PLA₂. Dengan demikian dapat disimpulkan PLA₂ yang dihasilkan *A.planci* dari perairan Papua merupakan PLA₂ jenis baru.

Gambar 5 Hasil Uji SDS-PAGE
Lane F20, PLA₂ hasil fraksinasi 20% amonium sulfat ;
Lane CV, *crude venom*; Lane S, protein standar

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa PLA₂ yang terdapat pada *crude venom* tidak rentan terhadap temperatur tinggi. Pada proses isolasi PLA₂ dengan modifikasi metode Savitri *et al.*, 2011 yaitu tanpa pemanasan *crude venom* diperoleh aktifitas spesifik terbesar pada hasil fraksinasi 20% amonium sulfat yaitu 27,67 unit/mg protein. Dengan tingkat kemurniaan fraksinasi 20% amonium sulfat adalah 37,29 kali terhadap *crude venom*. Dari data pengaruh kation terhadap aktifitas PLA₂ dapat disimpulkan bahwa aktifitas PLA₂ hasil isolasi racun *A.planci* dari perairan Tanjung Kasuari, Sorong- Papua Barat merupakan PLA₂ Ca²⁺ independent.

Referensi

Albert P. R., Morris, S. J. 1994. *Antisense oligonucleotides: Molecular scapels for dissection of signal transduction pathways. Trends Pharmacol Sci*15:250–254

Arni, R. K., Ward, J., 1996. *Phospholipase A₂: a structural review. Toxicon* 34, 827-841

Baine, M. S. P. 2006. *A major outbreak of crown-of-thorn starfish in Bootless Bay, Central Province, Papua New Guinea. Coral Reefs* 25 : 607

Balsinde, J., Perez, R., Balboa, M. A. 2006. *Calcium-independent phospholipase A₂ and apoptosis. Biochimia et Biophysica Acta* 1761: 1344-1350

Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C. dan Nystrom, M. 2004. *Confronting the coral reef crisis. Nature* 429, 827-833

Benzie, John A.H. 1999. *Major Genetic Differences between Crown-of-Thorns Starfish (Acanthaster planci) Populations in the Indian and Pacific Oceans. Evolution.* 53(6). pp. 1782-1795

Bevers, E.M., H.H. Wang, J.A.F. Op den Kamp and L.L.M.van Deenen. 1979. *On the Interaction Between Intrinsic Proteins and*

- Phosphatidylglycerol in the membrane of Acholeplasma laidlawii*. Arch. Biochem. Biophys. 193., 502.
- Birkeland C., Lucas J.S. 1950. *A.planci* : Major Manajemen Problem of Coral Reefs. Florida :CRC. Press
- Capper EA, Marshall LA. 2001. *Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis*. Prog Lipid Res 40:167–197
- CRC (2003) *Crown-of-thorns starfish in the Great Barrier Reefs: Current State of Knowledge*. Cooperative Research Centers (CRC) Reef Research Center. Townsville, Australia
- Cummings BS, McHowat J, Schnellmann RG. 2000. *Phospholipase A(2)s in cell injury and death*. J Pharmacol Exp Ther 294:793– 799
- Deutscher, Murray. 1990. *Guide to Protein Purification*. Farmington : University of Connecticut Health Center.
- Fenard, D., Lambeau G., Valentin, E., Jean-Claude Lefebvre, Lazdunski, M., Doglio, A., 1999. *Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells*. NCBI
- Hobbs, J. P. A. dan Salmond, J.K. 2008. *Cohabitation of India and Pacific Ocean species at Christmas and Cocos Islands*. Coral Reefs 27 : 933
- Karasudani, I., Koyama, T., Nakandakari, S. and Aniya, Y. 1996. *Purification of anticoagulant factor from the spine venom of the crown-of-thorns starfish Acanthaster planci*. Toxicon 34, 871-879.
- Kerns, R.T., Kini, R.M., Stefansson, S., and Evans, H.J. 1999. *Targeting of Venom Phospholipases: The Strongly Anticoagulant Phospholipase A2 from Naja nigricollis Venom Binds to Coagulation Factor Xa to Inhibit the Prothrombinase Complex*, Biochim. Biophys. 369: 107-113
- Koelman J, Roehm KH, Color Atlas Biochemistry. 2nd ed. Marburg: Thieme, 2005.
- Koyama, T., Noguchi, K., Aniya, Y., and Sakanashi, M. 1998. *Analysis for Sites of Anticoagulant Action of Plancinin, a New Anticoagulant Peptide Isolated from the Starfish Acanthaster planci, in the Blood Coagulation Cascade*, Gen. Pharmac. Vol. 31, No. 2, pp. 277–282.
- Madl, P., 2002. *Acanthaster planci*. Marine Boilogy I
- Marinetti, G. V. 1965. *The action of phospholipase A on lipoproteins*. Biochim. Biophys. Acta 98, 554±565.
- Moran PJ (1990) *planci (L.): biographical data*. Coral Reefs 9:95-96
- Mounier, C.M., Bon, C., and Kini, R.M. 2001. *Anticoagulant Venom and Mammalian Secreted Phospholipases A2: Protein- versus Phospholipid-Dependent Mechanism of Action*, Haemostasis. 31: 279-287
- Mounier, C.M., Franken, P.A., Verheij, H.M., and Bon, C. 1996. *The Anticoagulant Effect of the Human Secretory Phospholipase A2 on Blood Plasma and on a Cell-free System is Due to a Phospholipid-independent Mechanism of Action Involving the Inhibition of Factor Va*, Eur J. Biochem. 237: 778-785
- Mounier, C.M., Luchetta, P., Lecut, C., Koduri, R.S., Faure, G., Lambeau, G., Valentin, M., Singer, A., Ghomashchi, F., Suzette, B., Gelb, M.H., and Bon, C. 2000. *Basic Residues of Human Group IIA Phospholipase A2 Are Important for Binding to Factor Xa and Prothrombinase Inhibition*, Eur J. Biochem. 267: 4960-4969
- Mundy, C., Babcock, R., Asworth, I., Small, J., 1994. *A portable, discrete-sampling submersible plankton pump and its use in sampling starfish egg*. Biological Buletin Marine Biological Laboratory, Woods hole 186, pp. 168-171
- Nevalainen, T.J., Haapamäki, M.M., Gronroos, J.M. 2000. *Roles of secretory phospholipases A2 in inflammatory diseases and trauma*. Biochim. Biophys. Acta 1488: 83- 90.
- Noble, J. E., Knight, A. E., Reason, A. J., Di Matola, A., and Bailey, M. J. 2007. *A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications*. Mol. Biotechnol. 37, 99–111.
- Pearson, R. 1981. *Recovery and Recolonisation of Coral Reefs Marine Ecology*. Progress Series 4 : 105:122
- Porter, J.W. 1972. *Predation by Acanthaster and its Effect on Coral Species Diversity*. The American Naturalist. 106(950): 487-492.
- Pratchet, M. S., 2001. *Influence of Coral Symbiont on Feeding of Crown-of-Thorns Starfish*

- planci* in Western Pasific. Mal Ecol Prog Series :214:111-119
- Sahlan, Muhamad. 2002. *Eksplorasi Enzim Fibrinolitik dari Cacing Tanah Pheretima sp. Galur Lokal*. Skripsi. Institut Teknologi Bandung.
- Sallau, A.B., Ibrahim, M. A., Salihu, A. Patrick, F. U. 2008. *Characterization of Phospholipase A₂ (PLA₂) from Echis ocellatus Venom*. African Journal of Biochemistry Research Vol. 2 (4) : 098-101
- Samy, R. P., Pachiappan, A., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Hian, Y. E., Chow, V. T. 2006. *In Vitro Antimicrobial Activity of Natural Toxins and Animal Venoms*. BMC Infectious Diseases. 6.100.
- Saito, K., and Hanahan, D. 1962. [A Study of the Purification and Properties of the Phospholipase A of Crotalus adamanteus](#), *Biochem J* 1, 521.
- Satwika, Respatiphala A. 2010. *Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Ammonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Fosfolipase-A2 dari Acanthaster planci*. Skripsi. Universitas Indonesia
- Savitri I.K.E., Ibrahim, F., Sahlan, M., Wijanarko, A. 2011. *Rapid and Efficient Purification Method of Phospholipase A2 from Acanthaster planci*. International Journal of Pharma and Bio Sciences Vol. 2,
- Scope, R. K.,. 1993. *Protein Purification, Principles, and Practice, 3rd Edition*. Springer Veriag Newyork. Page : 15 - 21, 44 - 48, and 71 - 92.
- Scope, R. K.,. 1993. *Protein Purification, Principles, and Practice, 3rd Edition*. Springer Veriag Newyork. Page : 15 - 21, 44 - 48, and 71 - 92.
- Shiomi, K., Itoh, K., Yamanaka, H., Kikuchi, T. 1985. *Biological Activity of Crude Venom from the Crown-of-Thorn starfish Acanthaster planci*. Nippon Suisan Gakkaishi 51 : 1151-1154
- Shiomi, K., yamamoto, S., Yamanaka, H., Kikuchi, T. 1988. *Purification and Characterization of Lethal Factor in Venom from Crown-of-Thorn starfish Acanthaster planci*. Toxicon 26, 1077-1083.
- Shiomi, K., Kazama, A., Yamanaka, H., Kikuchi, T. 1989. *Inhibitory Effect of Antiinflammatory Agent on Cutaneous Capillary Leakage Induced by Sea Marine Venom*. Nippon Suisan Gakkaishi 55: 131-134.
- Shiomi, K., Kazama, A., Shimakura, K., Nagashima, Y. P. 1997. *Purification and Properties of Phospholipases A2 From the Crown-of-Thorns Starfish (Acanthaster planci) venom*. Toxicon Vol. 36, No. 4, pp. 589±599.
- Shiomi, K., Midorikawa, S., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y. P. 2004. *Plancitoxins, Lethal Factor from the Crown-of-Thorns Acanthaster planci, are deoxyribonucleases II*. Toxicon Vol. 44 pp. 499-566
- Shuler, M. L., Fikret, K. 2002. *Bioprocess Engineering 2nd Edition*. Prentice Hall International
- Shier, W.T., D. Eaker and T. Wadstrom. 1981. *Natural Toxin Stimulates Endogenous Phospholipase A2 Activity and Prostaglandin Synthesis in Fibroblast*, Biochim. Biophys. Acta. 663., 467.
- Sindurmata, Mulyawati. 1989. *Isolasi dan Beberapa Sifat Fosfolipase A2 dari Bisa Calloselasma rhodostoma (Boei)*. Desertasi. Institut Teknologi Bandung
- Sweatman, H. *Commercial fishes as Predators of Adult Acanthaster planci*. 1997. Proc 8th Int Coral Reef Sym 1:617-620.
- Taketo MM, Sonoshita M. 2002. *Phospholipase A2 and apoptosis*. Biochim Biophys Acta 1585:72-76
- Teruya, T., Suenaga, K., Koyama, T., Nakano, Y., and Uemura, T. 2001. *Arachidonic Acid and α -linolenic Acid, Feeding Attractants for the Crown-of-Thorns Sea Star Acanthaster planci, from the Sea Urchin Toxopneustes pileolus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 266. 123-134.
- Thomas, S.W. 1982. *Cytolytic Mechanism: Self-destruction of mammalian Cells by Activation of Endogenous Hydrolytic Enzymes*, J. Toxicol. Toxin Rev. 1.No. 1, , 1.
- Tu, A. T. 1977. *in Venoms: Chemistry and Molecular Biology* (Tu, A. T., ed.), pp. 23-63, John Wiley and Sons, New York
- Tyastuti, Erma M. 2006. *Efek Imunostimulator Propolis terhadap Proliferasi Limfosit T dan Viabilitas Sel Tumor Mammary Mice secara in Vitro*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret

- Uthe, J., and Magee, W. 1971. *Phospholipase A2: Action as Affected by Deoxycholate and Divalent Cations*, Can J Biochem 49, 776.
- Van Zoelen, E.J.J., B. de Kruijff and L.L.M. van Deenen. 1978. *Protein Mediated Transbilayer Movement of Lysophosphatidylcholine in Glycophorin Containing Vesicles*, Biochim. Biophys. Acta. 508., 97.
- Wang, S. 2006. *Enzyme Purification By Salt (Ammonium Sulfate) Precipitation.* <http://www.glue.umd.edu.htm>.
- Yamaguchi M (1986) *planci infestations of reefs and coral assemblages in Japan: a retrospective analysis of control efforts*. Coral Reefs 5:23-30
- Yamaguchi M. 1986. *planci infestations of reefs and coral assemblages in Japan: a retrospective analysis of control efforts*. Coral Reefs 5:23-30.
- Yara A. 1992. *Cardiopvascular effects of Acanthaster planci venom in rat*. Toxicon. Vol 30, No 1281-1289
- Yusuf S. 2008. *Fenomena Ledakan Populasi Acanthaster planci dan Pola Pemangsaan Pada Karang Keras di Pulau Kapoposang, Sulawesi Selatan*. Simposium Terumbu Karang Nasional, Jakarta 18-20 N.
- Zwall, R.F.A., B. Roelofsen, P. Comfurius and L.L.M. van Deenen. 1975. *Organization of Phospholipids in the Human red Blood Cell Membrane as Detected by Action of Various Purified Phospholipases*, Biochim. Biophys. Acta. 406., 83.