

**STUDI IN VITRO ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION ALGA
MERAH (*Eucheuma spinosum*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER**



FARDA NURILMI

H031171320



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**STUDI IN VITRO ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION ALGA
MERAH (*Eucheuma spinosum*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER**

**FARDA NURILMI
H031171320**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

**STUDI IN VITRO ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION ALGA
MERAH (*Eucheuma spinosum*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER**

FARDA NURILMI
H031171320

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Kimia

pada

**PROGRAM STUDI KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

STUDI IN VITRO ENZIM L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION ALGA
MERAH (*Eucheuma spinosum*) SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIKANKER

FARDA NURILMI

H031171320

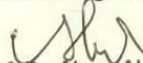
Skripsi

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Sains pada tanggal 04 Juli 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Kimia
Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing utama,



Prof. Dr. Ahyar Ahmad

NIP. 19671231 199103 1 020

Pembimbing Pertama,



Dr. Nur Umriani P., M. Si

NIP. 19730523 199702 1 001

Mengetahui:

Ketua Program Studi,

Dr. St. Fauziah, M. Si

NIP. 19720202 199903 2 002



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi berjudul "**Studi In Vitro Enzim L-asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) sebagai Antibakteri dan Antikanker**" adalah benar karya saya dengan bimbingan dari **Prof. Dr. Ahyar Ahmad** sebagai pembimbing utama dan **Dr. Nur Umrhani Permatasari, M. Si** sebagai pembimbing pertama. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 24 Juni 2024



Farda Nurilmi

H031171320

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim ...

Alhamdulillah. Segala puji bagi Allah 'Azza wa Jalla yang telah memberikan pertolongan pada setiap urusan hamba Nya. Hanya atas rahmah dan hidayah Nya penelitian ini yang berjudul **“Studi In Vitro Enzim L-asparaginase dari Bakteri Symbion Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) sebagai Antibakteri dan Antikanker”** dapat terselesaikan dengan baik dalam bimbingan **Prof. Dr. Ahyar Ahmad** dan **Dr. Nur Umriani Permatasari, M. Si** sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si). Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak dan Ibu Dosen Pembimbing atas kesempatan dan bantuan yang diberikan selama ini. Semoga Allah membalas keduanya dengan kebaikan yang banyak. Penulis menyadari bahwa sejak awal perkuliahan sampai penyusunan tugas akhir ini tidak luput dari motivasi dan dukungan dari banyak pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. St. Fauziah, M.Si selaku Ketua Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah memberikan motivasi yang sangat berarti bagi penulis untuk tetap yakin dalam menyelesaikan penelitian ini.
2. Ibu Dr. Nur Umriani Permatasari, S.Si., M,Si selaku sekretaris Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang selalu ada dan memberikan ruang untuk bertanya bagi penulis.
3. Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc dan Dr. Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si selaku dosen penguji yang memberikan motivasi dan kemudahan bagi penulis.
4. Seluruh dosen dan staf Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
5. Kedua orang tua tercinta Bapak Ir. Kamus Sinrang dan Mama dr. Indra Dewi Puspita serta keluarga yang menjadi tempat untuk pulang dan senantiasa mendukung penulis menjadi lebih baik dalam segala hal.
6. Teman-teman seperjuangan Moelkhaiva, Syam, Fadil, Sumi, Huda, Yuyun, Mona, Wiwi, Fadli, Salim, Ahmad, Aidul, Ana, dan Esse serta teman-teman peneliti S2 & S3 Yura, Eka, Besse, Kak Nita, Kak Intan, Kak Nisa, Aqifa, Kak Asti, Mirna, Uti dan Esri yang telah membantu penulis di Laboratorium Biokimia.
7. Sahabat Shalihahku Tenri dan Safira yang telah memberikan dukungan dan nasihat selama penelitian. Sahabat Pizza Ainun, Fanny, Icha dan lin serta sahabatku Iis, Amel, Nurina, Uni, Lala, Nayya, Yuni dan Izzah yang telah memberikan dukungan dan motivasi selama ini.
8. Teman-teman Kimia 2017 dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan.

Penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis membutuhkan saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat yang luas.

Penulis

Farda Nurilmi

ABSTRAK

FARDA NURILMI. **Studi In Vitro Enzim L-Asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) sebagai Antibakteri dan Antikanker** (dibimbing oleh Ahyar Ahmad dan Nur Umriani Permatasari).

Latar Belakang. Kanker dan resistensi antibiotik menyebabkan peningkatan angka kematian di seluruh dunia. Perlu untuk menemukan molekul bioaktif baru untuk solusi pengobatan. Enzim L-asparaginase menarik perhatian sebagai agen antineoplastik. Isolasi enzim L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah (*Eucheuma spinosum*) berpotensi sebagai sumber baru enzim ini. **Tujuan.** Menguji enzim L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah (*Eucheuma spinosum*) sebagai antikanker dan antibakteri serta mengidentifikasi bakteri simbion yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase. **Metode.** Isolasi enzim dilakukan dengan menumbuhkan bakteri penghasil enzim L-asparaginase lalu mengidentifikasi spesies bakteri menggunakan gen 16S rRNA serta memurnikan enzim dengan cara fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Setelah itu, menentukan potensi aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan aktivitas antikanker dengan uji toksisitas BSLT. **Hasil.** Ekstrak kasar enzim L-asparaginase memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 11.786 U/mg. Enzim L-asparaginase hasil pemurnian, yaitu dialisat 40-60% memiliki aktivitas spesifik tertinggi sebesar 1.115 U/mg dan optimum pada pH 8 suhu 37°C. Enzim L-asparaginase yang didapatkan memiliki sifat toksik dengan nilai LC₅₀ tertinggi sebesar 144.0 ppm. Bakteri simbion isolat FP_{51A} yang menghasilkan enzim L-asparaginase memiliki tingkat kemiripan tinggi dengan spesies *Vibrio alginolyticus* dengan nilai % *identity* sebesar 99.92%. **Kesimpulan.** Enzim L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah (*Eucheuma spinosum*) bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L dan memiliki aktivitas antibakteri yang lemah terhadap *E. coli* dan *S. Aureus*.

Kata kunci: antineoplastik; bakteri simbion; dialisis; *Eucheuma spinosum*; *Vibrio alginolyticus*

ABSTRACT

FARDA NURILMI. **In Vitro Study of the L-Asparaginase Enzyme from the Symbiont Bacteria of Red Algae (*Eucheuma spinosum*) as an Antibacterial and Anticancer** (guided by Ahyar Ahmad and Nur Umriani Permatasari).

Background. Cancer and antibiotic resistance are causing increasing death rates worldwide. It is necessary to discover new bioactive molecules to provide treatment solutions. The enzyme L-asparaginase is attracting attention as an antineoplastic agent. Isolating the L-asparaginase enzyme from the symbiont bacteria of red alga (*Eucheuma spinosum*) has the potential to be a new source of the enzyme. **Research Aims.** The aims of this research are to test the L-asparaginase enzyme from the symbiont bacteria of red algae (*Eucheuma spinosum*) for anticancer and antibacterial properties and to identify symbiont bacteria that can produce the L-asparaginase enzyme. **Methods.** Enzyme isolation was carried out by growing bacteria that produce the L-asparaginase enzyme, identifying the bacterial species using the 16S rRNA gene, and purifying the enzyme through ammonium sulfate fractionation and dialysis. The potential antibacterial activity was then determined using the agar diffusion method, and the anticancer activity was determined using the BSLT toxicity test. **Results.** The crude extract of the L-asparaginase enzyme had the highest specific activity of 11,786 U/mg. The purified L-asparaginase enzyme, specifically the 40-60% dialysate, had the highest specific activity of 1,115 U/mg and was optimal at pH 8 and a temperature of 37°C. The L-asparaginase enzyme obtained had toxic properties, with the highest LC₅₀ value of 144.0 ppm. The symbiont bacteria isolate FP51A, which produces the L-asparaginase enzyme, had a high level of similarity to the *Vibrio alginolyticus* species, with a % identity value of 99.92%. **Conclusions.** The L-asparaginase enzyme from the symbiont bacteria of red algae (*Eucheuma spinosum*) is toxic to *Artemia salina* L shrimp larvae and has weak antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*.

Keywords: antineoplastic; dialysis; *Eucheuma spinosum*; symbiont bacteria; *Vibrio alginolyticus*

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	3
BAB II METODE PENELITIAN.....	4
2.1 Bahan Penelitian.....	4
2.2 Alat Penelitian.....	4
2.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
2.4 Prosedur Penelitian.....	4
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	11
3.1 Isolasi Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma Spinosum</i>	11
3.2 Identifikasi Isolat Bakteri Simbion Penghasil Enzim L-Asparaginase.....	12
3.3 Penentuan Waktu Optimum Pertumbuhan Bakteri dalam Produksi Enzim L- asparaginase.....	14
3.4 Produksi dan Pemurnian Enzim L-asparaginase.....	16
3.5 Penentuan Kadar Protein Enzim L-asparaginase.....	17
3.6 Penentuan Aktivitas Enzim L-asparaginase dari Bakteri Simbion FP51A.....	18
3.7 Karakterisasi Enzim L-asparaginase dari Bakteri Simbion FP51A.....	19
3.8 Uji Aktivitas Antibakteri Enzim L-asparaginase.....	21
3.9 Uji Potensi Aktivitas Antikanker melalui Uji Toksisitas dari Fraksi Enzim L- asparaginase.....	22
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN.....	24
4.1 Kesimpulan.....	24
4.2 Saran.....	24
DAFTAR PUSTAKA.....	25
LAMPIRAN.....	30

DAFTAR TABEL

Nomor urut	halaman
1. Hasil Pengukuran Kadar Protein.....	18
2. Hasil Pengukuran Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim.....	18
3. Data Diameter Zona Hambat Enzim L-asparaginase.....	21
4. Data Uji Toksisitas Enzim L-asparaginase dari Bakteri Simbion FP ₅ 1A	22

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	halaman
1. Isolat bakteri endofit FP ₅ ; B. Isolat bakteri endofit FP ₆ ; C. Isolat bakteri endofit FP ₅ 1A dengan metode kuadran; D. Isolat bakteri FP ₅ 1A dalam media spesifik M9	11
2. Visualisasi amplikon gen 16S rRNA Isolat Bakteri Simbion FP51A	12
3. Hasil <i>nucleotide</i> BLAST Gen 16S rRNA Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> kode FP ₅ 1A	13
4. Analisis filogenetik Gen 16S rRNA dari Isolat Bakteri Simbion Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> FP ₅ 1A	14
5. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Simbion FP51A.....	15
6. Pengaruh fraksinasi Amonium sulfat bertingkat dan dialisis terhadap enzim L Asparaginase dari bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	43
7. Pengaruh pH terhadap aktivitas Enzim L-asparaginase	20
8. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim L-asparaginase	20
9. Aktivitas Antibakteri Enzim L-asparaginase terhadap bakteri uji berikut; A. <i>E. coli</i> dengan Metode Sumuran, B. <i>S. aureus</i> dengan Metode Sumuran, dan C. <i>S. aureus</i> dengan Metode Kertas Cakram	21

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	halaman
1. Bagan Alir Penelitian.....	30
2. Lokasi Pengambilan Sampel Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	31
3. Hasil Uji Identifikasi Spesies Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	32
4. Bagan Kerja Penelitian	33
5. Pembuatan Reagen Lowry	42
6. Pembuatan Reagen Uji.....	43
7. Data Hasil Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri Symbion...	44
8. Penentuan Kurva Standar.....	45
9. Perhitungan Jumlah Penambahan Amonium Sulfat pada Fraksinasi	47
10. Tabel Tingkat Kejenuhan Amonium Sulfat.....	48
11. Hasil Perhitungan Pengukuran Kadar Protein Dialisat Enzim	49
12. Perhitungan Pengukuran Aktivitas Dialisat Enzim L-asparaginase.....	50
13. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-asparaginase dari Bakteri Symbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> kode FP51A	51
14. Tabel Harga Probit.....	52
15. Data Hasil Uji Toksisitas Dialisat Enzim L-asparaginase dengan Metode BSLT	53
16. Perhitungan LC ₅₀ Hasil Uji Toksisitas Enzim L-asparaginase dengan Metode BSLT	54
17. Dokumentasi Penelitian	55

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
EC	<i>Enzyme Code</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
OD	<i>Optical Density</i>
MHA	<i>Mueller-Hinton Agar</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
BSLT	<i>Brine Shrip Lethality Test</i>
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration</i>
NCBI	<i>National Library of Medicine</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Sequence Tool</i>
ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
BHIB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kanker menjadi salah satu penyakit yang menjadi beban kesehatan di seluruh dunia. Badan kesehatan dunia, *World Health Organization* (WHO) menyatakan kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia. Data dari *Global Burden of Cancer* (GLOBOCAN) yang dirilis oleh WHO menyatakan bahwa jumlah kasus dan kematian akibat kanker sebesar 18,1 juta kasus dan 9,6 juta kematian pada tahun 2018, serta 10 juta kematian pada tahun 2020 (WHO, 2022). Angka kematian diperkirakan akan meningkat hingga lebih dari 13,1 juta pada tahun 2030. Angka kejadian penyakit kanker di Indonesia berada pada urutan 8 di Asia Tenggara dan urutan ke 23 di Asia (Pangribowo, 2019).

Kanker terdiri dari beberapa jenis, tergantung dari organ tubuh yang menjadi tempat pertumbuhan sel dan jaringan kanker tersebut. Salah satunya adalah kanker darah (leukemia). Data dari Rumah Sakit Kanker Dharmas pada tahun 2018 menunjukkan angka kasus kanker leukemia sebesar 4,44%. (Pangribowo, 2019). Kebanyakan protokol pengobatan kanker bergantung pada kemoterapi. Akan tetapi, kemoterapi kurang selektif terhadap tumor yang dapat mempengaruhi sel-sel normal dan juga dapat menyebabkan *multidrug resistance*. Hal tersebut dapat mengakibatkan efek samping yang serius, seperti hilangnya fungsi kekebalan tubuh dan hasil kemoterapi yang buruk. Oleh karena itu, pencarian obat baru masih menjadi tujuan prioritas terapi kanker (Prabhu, 2017). Selain penyakit kanker, masalah penyakit infeksi juga menjadi beban kesehatan dunia.

Menurut *Centers for Disease Control and Prevention*, pada tahun 2013 kurang lebih terjadi 700.000 kematian di seluruh dunia akibat resistensi antibiotika. Pada tahun 2050 diperkirakan terjadi 10 juta kematian akibat resistensi antimikroba dengan 4,7 juta di antaranya merupakan penduduk Asia (Dirga et al., 2021). Intensitas penggunaan dan peresepan antibiotik di Indonesia yang relatif tinggi dan kurang bijak berpotensi menjadi ancaman global bagi kesehatan, terutama peningkatan kejadian resistensi bakteri terhadap antibiotik.

Resistensi antibiotik menyebabkan biaya pengobatan yang lebih tinggi, rawat inap yang berkepanjangan, dan peningkatan angka kematian (WHO, 2020). Hasil penelitian *antimicrobial resistant in Indonesia* (AMRIN Study) membuktikan bahwa dari 2.494 orang, 43% *Escherichia coli* resisten terhadap berbagai jenis antibiotika, seperti ampicilin (24%), kotrimoksazol (29%), dan kloramfenikol (25%) (Sosialine et al., 2013). Oleh karena itu, penemuan molekul bioaktif baru dibutuhkan sebagai upaya menangani permasalahan tersebut (Asmi, 2021).

Keanekaragaman hayati di Indonesia berpotensi besar dalam menghasilkan kandidat antikanker dan antibakteri. Biosfer laut menempati 75% permukaan bumi dan menampung berbagai bentuk organisme yang beragam (alga, bakteri, jamur, spons, dll.) sebagai sumber molekul bioaktif alami yang baik, senyawa terapeutik baru dan sumber enzim. Metabolit sekunder bioaktif atau agen antikanker yang berasal dari habitat laut telah dieksplorasi dari beragam kelas organisme dan

berkontribusi dalam proporsi variabel alga-mikroalga (9%), bakteri (18%), dan spons (37%) (Parte, 2017). Eksplorasi rumput laut atau alga dapat dilakukan (Ramadan, 2021). Brooks (2021) dalam *The Australia-Indonesia Centre* menyatakan bahwa Sulawesi Selatan menghasilkan lebih dari sepertiga pasokan rumput laut Indonesia dan 11% dari pasokan global.

Alga merah menempati urutan terbanyak yang tumbuh di perairan laut Indonesia (Pakidi & Suwono, 2016). Alga merah memiliki kandungan kadar protein berkisar 30 s.d 40% dari berat kering. Nilai ini cukup tinggi jika dibandingkan dengan alga cokelat yang hanya memiliki kandungan protein 5 s.d 11% dan alga hijau sebesar 20% dari berat kering (Putri, 2019). Beberapa alga merah telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antibakteri maupun antikanker. Aktivitas antibakteri ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan daya hambat pada konsentrasi 80 mg/mL secara berturut-turut sebesar 4 mm dan 3 mm (Hanapi et al., 2013).

Menurut Nisar (2017) bahwa ekstrak alga merah *Euchemum spinosum* berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan mikroba uji *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Vibrio cholera*. Zona bening yang paling tinggi terbentuk pada konsentrasi 1000 ppm pada bakteri *Shigella dysenteriae* dengan zona bening 1,3 mm dalam skala jangka sorong, sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* zona bening yang terbentuk ialah 1,2 mm pada konsentrasi 1000 ppm. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak alga merah *Eucheuma spinosum*, semakin besar pula zona hambat yang terbentuk di sekitaran *paper disk*. Selain itu, hasil uji sitotoksik dari protein bioaktif alga merah *Eucheuma spinosum* memperlihatkan bahwa fraksi protein dengan kejenuhan 20-40% (F2) menunjukkan adanya respon toksik pada *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 8,65 mg/L yang berpotensi dikembangkan sebagai agen antikanker (Ramadan et al., 2019).

Alga dapat hidup berasosiasi dengan bakteri. Interaksi spesifik termasuk transfer prekursor nutrisi antara bakteri simbiosis dengan inangnya, dalam hal ini alga merah, memberi peluang adanya kesamaan metabolit yang dihasilkan (Asmi, 2021). Pada penelitian yang dilakukan Sugrani et al. (2019) diperoleh data protein eksternal bakteri endofit ES25 yang berasosiasi dengan alga merah *Eucheuma spinosum*, yaitu protein eksternal PE36 bersifat sangat toksik dengan nilai LC_{50} 1.596 $\mu\text{g/mL}$. Diketahui bahwa semakin kecil nilai toksisitas maka semakin toksik suatu senyawa uji. Pada penelitian yang dilakukan Mardiana (2019) isolat bakteri EC_A 3(1) yang diketahui sebagai bakteri gram negatif memiliki nilai toksisitas LC_{50} sebesar 31.167 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, penelitian yang dilakukan Alfaifi et al. (2019) isolat bakteri KKU-KH14 yang diidentifikasi 16 S rRNA sebagai *Bacillus licheniformis*, memiliki aktivitas sitotoksik yang baik terhadap sel kanker hati HepG-2 dengan nilai IC_{50} sebesar 11.66 $\mu\text{g/mL}$. Alga memiliki jalur metabolisme yang menarik terkait dengan siklus biogeokimia nitrogen, fosfor dan karbon yang dapat berfungsi sebagai sumber enzim dengan aplikasi bioremediasi. Alga adalah kelompok organisme polifiletik yang hidup di lingkungan yang ekstrim. Karakteristik dan adaptasi metabolisme menjadikan alga sebagai sumber ideal untuk enzim baru (Hernandez et al., 2017). Salah satu enzim yang berpotensi untuk dihasilkan ialah enzim L-asparaginase.

Enzim L-asparaginase menarik perhatian peneliti karena kemampuannya sebagai salah satu agen antineoplastik yang digunakan dalam kemoterapi *Acute Lymphoblastic Leukemia* (ALL) (Batool et al., 2016). Enzim L-asparaginase dapat menghidrolisis L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. Sel leukemia memerlukan sejumlah besar L-asparagin untuk pertumbuhan ganasnya yang cepat (Verma et al., 2007). Kemoterapi dengan enzim L-asparaginase secara intravena menyebabkan sel maligna gagal menyelesaikan sintesis proteinnya karena konsentrasi L-asparagin dalam darah berkurang dan mengakibatkan kehancuran sel kanker (Fauziah, 2012; Papich, 2016).

Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan biota laut seperti alga laut dan uji aktivitas enzimatisnya perlu dilakukan agar manfaat alga dapat diambil dari bakteri yang berasosiasi dengannya (Jannah et al., 2021). Proses isolasi enzim dari bakteri cenderung lebih mudah dilakukan karena bakteri dapat dikultur di laboratorium. Bakteri-bakteri laut banyak yang hidup bersimbion pada alga merah *Eucheuma spinosum*, sehingga bakteri simbion berpotensi memiliki kandungan bioaktif yang hampir sama dengan inangnya. Berdasarkan latar belakang tersebut, dilakukan rencana penelitian studi *in vitro* enzim L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai kandidat antikanker dan antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. apa jenis spesies bakteri simbion dari alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase?
2. bagaimana karakteristik aktivitas enzim L-asparaginase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?
3. bagaimana aktivitas antibakteri dan antikanker enzim L-asparaginase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk menentukan karakteristik aktivitas enzim L-asparaginase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* serta menentukan bioaktivitasnya sebagai antibakteri dan sifat toksisitas sebagai kandidat antikanker.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. mengidentifikasi bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* yang mampu menghasilkan enzim L-asparaginase.
2. mengarakterisasi aktivitas enzim L-asparaginase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*.
3. menentukan aktivitas antibakteri enzim L-asparaginase terhadap bakteri uji & sifat sitotoksik enzim L-asparaginase dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri simbiosis alga merah *Eucheuma spinosum*, *Artemia salina* L., biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, *brain heart infusion broth* (BHIB), media *Mueller-Hinton agar* (MHA), *bovine serum albumin* (BSA), substrat L-asparagin, agar, indikator fenol merah, K_2HPO_4 , *beef extract*, Tris (*hidroksimetil*) amino metana, HCl (Merck), NaCl (Merck), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, *Folin-Ciocalteu*, Na_2CO_3 , NaOH (Merck), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, Natrium K-tartrat, reagen *Nessler*, asam trikloroasetat, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , $BaCl_2 \cdot 2H_2O$, siprofloksasin, membran selofan, indikator pH universal, kertas cakram kosong (*paper disc*), akuades, akuabides, alkohol, kertas saring, kapas, kasa, spiritus, es batu, aluminium foil, *cling wrap* dan *tissue roll*.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mortar, neraca analitik Ohaus, *magnetic stirrer*, *spectronic 20D+*, *sentrifuge* TOMY MX-305, inkubator *Memmerth*, *autoclave* Napco, *shaker inkubator* Labo WBS-18, oven Genlab LTD, enkas, mikropipet, tip, pinset, tabung falkon, pH meter, lemari pendingin, *hot plate*, vial, cawan petri, jarum ose, bunsen, sonikator, vorteks, labu semprot, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Januari 2024 s.d Juni 2024 di Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Pembuatan Media

Media *Luria-Bertani* Agar. Media *Luria-Bertani* padat dibuat dengan melarutkan 0,5 % *yeast extract*, 1% pepton, 1% NaCl dan 2% bakto agar. Setelah itu, dilarutkan dengan akuades 100 mL di dalam gelas kimia. Media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama \pm 15 menit lalu dituangkan ke dalam cawan petri steril.

Media *Luria-Bertani* Broth. Media *Luria-Bertani* cair dibuat dengan melarutkan 0,5% *yeast extract*, 1% pepton, dan 1% NaCl, kemudian dilarutkan dengan akuades 100 mL di dalam gelas kimia. Media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama \pm 15 menit.

Media Padat Spesifik L-asparaginase. Media selektif L-asparaginase dibuat dengan komposisi sebanyak 0,6% *beef extract*, 1% pepton; 0,33% K_2HPO_4 ; 1% substrat L-asparagin; 2% agar, dan 0,2% mL indikator fenol merah 2,5% dilarutkan dengan akuades 50 mL di dalam gelas kimia, lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer 50 mL. Setelah itu, media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C, tekanan 2

atm selama ± 15 menit, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril (Alfaifi et al., 2019). Medium digunakan untuk peremajaan bakteri.

Media Inokulum L-asparaginase. Media inokulum dibuat dengan komposisi 0,6% *beef extract*; 1% pepton; 0,33% K_2HPO_4 ; 1% dan substrat L-asparagin dilarutkan dengan akuades 50 mL di dalam gelas kimia, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 50 mL. Setelah itu, media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama ± 15 menit (Alfaifi et al., 2019).

Media Fermentasi L-asparaginase. Media produksi dibuat dengan komposisi 0,6% *beef extract*; 1% pepton; 0,33% K_2HPO_4 ; 1% dan substrat L-asparagin dilarutkan dengan akuades di dalam gelas kimia lalu masukkan ke dalam Erlenmeyer 1000 mL dan ditambahkan akuades sebanyak 1000 mL. Setelah itu, media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama waktu ± 15 menit (Alfaifi et al., 2019).

2.4.2 Preparasi Sampel

Sampel alga merah (*Euclidean Spinosum*) diambil, dibersihkan dari kotoran dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer steril beserta dengan air laut lalu disimpan ke dalam *cool box* untuk dibawa ke laboratorium biokimia. Setelah itu, sampel alga ditimbang sebanyak 5 gram, kemudian sampel dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 45 mL air laut steril (1:9). Sampel diinkubasi dalam shaker selama 2 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, sampel disiapkan dalam tahap penyegaran sampel pada media LB cair.

2.4.3 Penyegaran Sampel dalam Media *Luria-Bertani Broth*

Bagian Permukaan Alga Merah (*Euclidean spinosum*). Sampel air laut hasil preparasi diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media LB cair steril sebanyak 45 mL (1:9). Setelah itu, campuran dikocok dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37 °C.

Bagian Dalam Alga Merah (*Euclidean spinosum*). Sampel alga merah hasil preparasi diambil dan dihaluskan dengan mortar, kemudian disaring dengan air laut steril sebanyak 45 mL. filtrat diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media LB cair steril sebanyak 45 mL (1:9). Selanjutnya campuran dikocok dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37 °C.

2.4.4 Isolasi Bakteri Simbion Alga Merah (*Euclidean spinosum*)

Sampel bagian permukaan alga dan bagian dalam alga hasil preparasi diencerkan menggunakan metode pengenceran bertingkat yaitu pengenceran 10^{-1} hingga 10^{-6} . Setelah itu, sampel disebar (*spreading*) pada permukaan media LB padat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam di dalam inkubator. Koloni bakteri yang tumbuh diamati warna, ukuran dan bentuknya lalu dipisahkan dengan ose bulat dan diinokulasikan pada permukaan media LB padat menggunakan metode kuadran dan diinkubasi selama 2 x 24 jam. Beberapa koloni tunggal diinokulasikan pada permukaan media padat spesifik L-asparaginase dengan metode gores dan diinkubasi selama 2 x 24 jam. Media yang telah diinkubasi, diamati pertumbuhan koloni,

perubahan warna dan diisolasi untuk diseleksi kemampuannya dalam menghasilkan enzim L-asparaginase dengan penentuan kadar protein dan aktivitas enzim serta identifikasi 16S rRNA untuk menentukan spesies bakteri simbiosis alga merah.

2.4.5 Peremajaan Isolat Bakteri Simbiosis Alga Merah *Eucaema spinosum*

Peremajaan isolat bakteri simbiosis dilakukan dengan cara diambil isolat murni sebanyak 1 ose dengan ose bulat lalu diinokulasikan ke dalam media LB cair dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, sampel disebar (*spreading*) pada permukaan media LB padat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 x 24 jam di dalam inkubator. Setelah itu, diambil isolat sebanyak 1 ose dengan ose bulat lalu digores ke atas permukaan media spesifik alga merah (media selektif) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

2.4.6 Identifikasi Bakteri Simbiosis Alga Merah *Eucaema spinosum* Penghasil Enzim L-asparaginase.

Isolat bakteri terpilih yang memiliki aktivitas L-asparaginase tertinggi diidentifikasi secara molekuler menggunakan gen 16S rRNA (Permatasari, 2019). Prosedur dimulai dengan Isolasi DNA genom bakteri. Isolasi DNA dilakukan dengan memasukkan 1 ose biakan bakteri ke medium LB cair, ditambahkan 20 µL proteinase K dan dihomogenkan dengan vorteks, lalu tabung diinkubasi pada suhu 56 °C selama 1-3 jam menggunakan penangas air. Setelah itu, ditambahkan 200 µL dapar GB ke dalam sampel dan dihomogenkan, lalu diinkubasi pada suhu 70 °C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 200 µL etanol 96% ke dalam sampel dan dihomogenkan dengan cara disentrifugasi selama 15 detik. Campuran dipindahkan ke dalam kolom CB 3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian cairan yang terkumpul pada kolom penampung di bawah kolom CB 3 dibuang.

Larutan dapar GB ditambahkan sebanyak 500 µL ke dalam kolom spin CB 3 dan disentrifugasi kembali pada 12.000 rpm selama 30 detik. Cairan pada kolom penampung CB 3 hasil sentrifugasi dibuang dan ditempatkan kembali kolom spin ke dalam kolom CB 3. Selanjutnya ditambahkan 600 µL dapar PW ke dalam kolom spin CB 3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, lalu buang semua cairan pada kolom penampung dan menempatkan kembali kolom spin ke dalam kolom CB 3 (diulang 2 kali) dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit hingga membran kering sempurna. Kolom spin CB 3 ditempatkan pada tabung mikrotube steril 1,5 mL dan ditambahkan 50-200 µL dapar TE, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Larutan DNA yang tertampung pada tabung mikrotube disimpan pada suhu 4 °C dan siap untuk diamplifikasi dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Fragmen DNA gen 16S rRNA diamplifikasi menggunakan teknik PCR dengan menambahkan pereaksi (Volume total 25 µL); 1,5 µL DNA hasil isolasi, 12,5 µL 2x Taq Plus Mix PCR, 1 µL primer maju 63F, 1 µL primer mundur 1387R, dan 9 µL *Nuclease Free Water*, lalu disekuensing untuk memperoleh urutan basa gen 16S rRNA. Urutan basa hasil sekuensing disatukan (*contig*) menggunakan software DNA Baser versi 4. Hasil *contig* kemudian dianalisis dengan bantuan BLAST (*Basic*

Local Alignment Sequence Tool) untuk mengetahui kedekatannya dengan gen 16S rRNA yang telah tersedia di *GenBank*. Urutan basa gen 16S rRNA disejajarkan (*alignment*) kembali menggunakan program Clustal W kemudian dibuat pohon filogenetiknya dengan bantuan software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versi 6 (Permatasari, 2019).

2.4.7 Penentuan Waktu Produksi Optimum Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosium*

Optimasi pertumbuhan isolat bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan cara isolat bakteri simbion murni diambil 1-2 ose dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 50 mL media inokulum steril dengan konsentrasi substrat L-asparagin 1%. Setelah itu, media inokulum diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya, sebanyak 10% inokulum aktif dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 500 mL media fermentasi steril. Media yang berisi isolat bakteri dimasukkan dalam *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm, pada suhu 37 °C selama ± 3 hari dan dilakukan sampling setiap 6 jam untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dengan mengukur OD (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm (Asmi, 2021) Setelah itu, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm dan suhu 4 °C selama 30 menit untuk memperoleh filtrat yang merupakan ekstrak kasar protein ekstraseluler. Filtrat yang diperoleh, ditentukan kadar proteinnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Mardiana, 2019).

2.4.8 Produksi Enzim L-asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosium*

Isolat bakteri hasil peremajaan diambil 2-3 ose, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media inokulum steril, lalu diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya, diinokulasikan kultur bakteri sebanyak 10% ke dalam 1000 mL media produksi steril, kemudian dikocok dalam *shaker incubator* pada kecepatan 150 rpm dan suhu 37 °C selama waktu produksi optimum. Setelah itu, media produksi yang mengandung kultur dipisahkan dengan disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm dan suhu 4 °C selama 30 menit. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar enzim ekstraseluler disimpan di dalam lemari es untuk proses selanjutnya (Asmi, 2021).

2.4.9 Pemurnian Enzim L-asparaginase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosium*

Fraksinasi dengan Amonium Sulfat. Filtrat yang diperoleh difraksinasi menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing 0-40% (F1), 40-60% (F2), dan 60-80% (F3). Filtrat ekstrak kasar enzim ditambahkan amonium sulfat sedikit demi sedikit sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga kejenuhan F1 serta larut sempurna, lalu didiamkan selama 24 jam pada suhu 4 °C. Endapan yang terbentuk dipisahkan dari filtratnya melalui sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dan suhu 4 °C selama 30 menit. Setelah itu, endapan yang

diperoleh dilarutkan dengan buffer B. Filtrat hasil sentrifugasi pertama ditambahkan lagi dengan amonium sulfat hingga kejenuhan F2. Setelah itu, dilakukan cara yang sama untuk memperoleh kejenuhan F3 hingga terdapat 3 fraksi amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan yang berbeda. Larutan fraksi-fraksi tersebut ditentukan kadar protein dan aktivitas enzim lalu dilanjutkan ke proses dialisis (Mardiana, 2019).

Dialisis dalam Membran Selofan. Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah buffer B, kemudian didialisis dalam sejumlah buffer C. Masing-masing fraksi enzim dimasukkan ke dalam membran selofan dan dipastikan bahwa membran selofan yang digunakan tidak bocor atau rusak. Membran yang telah diisi dengan fraksi enzim dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C, lalu diaduk dengan *magnetic stirrer*. Larutan Buffer C diganti setiap 2 jam sekali. Setelah itu, larutan buffer C diuji dengan BaCl_2 1% untuk mengetahui apakah masih terdapat garam. Dialisis dihentikan bila tidak terdapat endapan putih. Setelah itu, ditentukan kadar protein dan aktivitas enzim dari fraksi enzim hasil dialisis (Sartika, 2014).

2.4.10 Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein setiap fraksi diukur dengan metode *Lowry* menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan standar dan akuades sebagai larutan blanko. Larutan standar BSA konsentrasi 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 mg/mL dimasukkan ke dalam deret tabung reaksi dengan volume masing-masing sebanyak 2 mL. Setelah itu, ditambahkan 2,75 mL reagen Lowry B dan dihomogenkan, lalu biarkan selama 15 menit pada suhu kamar. Setelah itu, ditambahkan 0,25 mL Lowry A, dihomogenkan dengan cepat dan dibiarkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk. Diukur absorbansinya pada λ_{max} , yaitu 733 nm menggunakan spektrofotometer Uv-Vis. Perhitungan kadar protein enzim dilakukan dengan mensubstitusikan nilai absorbansi larutan yang diperoleh dari hasil pengukuran spektrometri ke dalam persamaan kurva regresi larutan standar protein. Kadar protein dihitung menggunakan persamaan (1) & (2).

$$y = ax + b \quad (1)$$

$$x = \frac{y - b}{a} \quad fp \quad (2)$$

Keterangan:

a = *slope*

b = *intersept*

y = absorbansi

x = kadar protein (mg/mL)

fp = faktor pengenceran.

2.4.11 Penentuan Aktivitas dan Aktivitas Spesifik Enzim L-asparaginase dari Isolat Bakteri Symbion Alga Merah *Eucheuma spinosium*.

Penentuan Aktivitas Enzim L-asparaginase. Pengukuran aktivitas enzim dengan metode *Nessler* menggunakan amonium klorida (NH_4Cl) sebagai larutan

standar dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan reagen *Nessler*. Pembuatan deret standar NH_4Cl 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 dan 0,16 mg/mL dilakukan dengan cara memipet larutan induk NH_4Cl sebanyak 1 mg/mL ke dalam tabung reaksi masing-masing secara berurutan sebanyak 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; dan 0,16 mL, kemudian ditambahkan akuades hingga volume total 1 mL. Campuran reaksi untuk mengukur aktivitas enzim L-asparaginase terdiri atas 0,5 mL fraksi enzim, 0,5 mL substrat L-asparagin 0,04 M, dan 0,5 mL buffer tris-HCl 0,05 M pada pH 8, lalu diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL TCA 1,5 M, lalu campuran didiamkan selama 15 menit. Setelah itu, diambil sebanyak 0,5 mL campuran tersebut dan ditambahkan akuades 4 mL dan 0,5 mL reagen *Nessler*. Aktivitas enzim ditentukan menggunakan standar NH_4Cl pada λ_{max} , yaitu 401 nm.

Perhitungan aktivitas enzim dapat dihitung menggunakan rumus pada persamaan (3). Aktivitas enzim L-asparaginase dapat diperoleh dalam satuan U/mL. Satu unit aktivitas enzim L-asparaginase diartikan sebagai banyaknya enzim yang dapat melepas μmol amonia per menit pada kondisi tertentu (Imada et al., 1973).

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y-b}{a} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{hidrolisat}}} \times \frac{1}{V_{\text{enzim}} \times t_{\text{inkubasi}}} \times \frac{1}{\text{BM}} \times 1000 \quad (3)$$

Keterangan:

V total	= Volume enzim + substrat + buffer + TCA
V analisis	= Volume total yang dianalisis
V enzim	= Volume enzim yang dianalisis
t inkubasi	= Waktu inkubasi
y	= Absorbansi
a	= Slope
b	= Intersept

Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim L-asparaginase. Kadar protein enzim yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas spesifik enzim menggunakan rumus pada persamaan (4).

$$\text{Aktivitas spesifik} = \frac{\text{aktivitas enzim L-asparaginase (U/mL)}}{\text{kadar protein dalam sampel (mg/mL)}} \quad (4)$$

Karakterisasi Aktivitas Enzim L-asparaginase dari Isolat Bakteri Symbion Alga Merah *Eucheuma spinosium*. Karakterisasi aktivitas enzim L-asparaginase dari isolat bakteri symbion alga merah *Eucheuma spinosum* dilakukan terhadap dua variabel, yaitu variasi pH dan suhu inkubasi.

Karakterisasi Variasi pH. Aktivitas enzim L-asparaginase diuji dengan variasi pH pada suhu optimum. Fraksi enzim diukur dengan penambahan buffer Tris-HCl pada pH 6-10.

Karakterisasi Variasi Suhu. Aktivitas L-asparaginase diuji dengan variasi suhu pada pH optimum. Fraksi enzim diinkubasi pada rentang suhu 27; 37; 47; dan 57 °C, sehingga didapatkan suhu optimum.

2.4.12 Uji Aktivitas Antibakteri Enzim L-asparaginase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji. Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan selama 18-24 jam, masing-masing diambil 1 ose lalu disuspensikan ke larutan NaCl fisiologis 0,9% steril dan dilakukan pengenceran suspensi bakteri uji hingga diperoleh transmittan 25% (standar *Mac-Farland*) terhadap blanko larutan NaCl 0,9% steril (Sartika, 2014).

Pembuatan Larutan Kontrol. Larutan kontrol positif yang digunakan adalah larutan siprofloksasin yang dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 0,03 gram siprofloksasin dan dilarutkan dalam 100 mL akuabides, kemudian dihomogenkan. Setelah itu, dipipet sebanyak 1 mL lalu ditambahkan akuabides hingga volume 10 mL. Kertas cakram direndam dalam larutan siprofloksasin selama 15 menit. Setelah direndam, kertas cakram diangkat dan didiamkan selama 15 menit. Selain itu, kontrol negatif yang digunakan adalah akuabides.

Uji Daya Hambat Enzim dengan Metode Difusi Agar. Pengujian daya hambat enzim L-asparaginase terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan Kertas cakram dengan diameter 6 mm. Media MHA steril sebanyak 15 mL dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan dimasukkan suspensi bakteri uji sebanyak 0,5 mL. Setelah itu, 6 buah kertas cakram masing-masing dicelupkan pada setiap fraksi enzim dan larutan kontrol positif (+), kemudian diletakkan secara aseptis dengan menggunakan pinset steril pada permukaan media. Cawan petri diberi label untuk membedakan sampel uji. Setelah itu, media uji diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C lalu diamati dan diukur zona hambatannya (Sartika, 2014).

2.4.13 Uji Sifat Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT dilakukan dengan cara dibuat fraksi enzim dalam konsentrasi 500, 100, dan 10 ppm secara triplo. Air laut steril yang didalamnya terdapat 10 larva udang ditambahkan ke dalam tabung hingga volume akhir menjadi 5 mL dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan di bawah lampu pijar 50 watt. Setelah itu, jumlah larva yang mati dan yang hidup dihitung dengan bantuan kaca pembesar serta ditentukan nilai LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) dengan program *Bliss Method*. Jumlah larva yang mati pada sampel uji dan kontrol dihitung kemudian ditentukan % kematiannya menggunakan rumus pada persamaan (5).

$$\% \text{ kematian} = \frac{\sum \text{larva uji yang mati} - \sum \text{larva kontrol yang mati}}{\sum \text{larva uji}} \times 100\% \quad (5)$$