

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, N.A., Amer, S.K., dan Habeeb, M.K., 2013, Production, Purification and Characterization of L-Glutaminase Enzyme from *Streptomyces avermitilis*, *African Journal of Microbiology Research*, **7**,(14); 1184-1190.
- Adawiah, Iskandar, D., & Muawanah, A., 2015. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam, *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, **1**, (2);130-136.
- Alrumman, S.A., Mostafa, Y.S., Al-Irzan, K.A., Alfaihi, M.Y., Taha, T.H., dan Elbehairi, S. E., 2019, Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase From *Bacillus licheniformis* Isolate from The Red Sea, Saudi Arabia, *Scientific Reports*, **9**; 3765.
- Amaranggana L., dan Wathoni N., 2016, Manfaat alga merah sebagai sumber obat dari bahan alam, **6**;1-2.
- Anggadiredja, J. T., Zاتمika A., Purwoto H, dan Istni, S., 2006, *Rumput Laut*, Swadaya, Jakarta.
- Arifin, H., 2009, Glutamin, *Majalah Kedokteran Nusantara*, **42**,(1); 66-71.
- Balasubramaniam, V., Lee, J. C., Noh, M. F. M., Ahmed., Brownlee, I. A., Ismail, A., 2015, Alpha-amylase, Antioxidant and Anti-inflamstory Activities of *Eucheuma denticulatum* (N.L Burman) F.S. Collins and Hervery, *Journal of Applied Phycology*. **6**,(3); 103-106.
- Bulbul, D., dan Karakus. E., 2013, Production and Optimization of L-glutamianse Enzyme from *Hypocrea jecorina* Pure Culture, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **43**; 385-397.
- CLSI, 2017, *M100 Perfomance Standards for Antimicrobia*, 27th edition. West Sacramento.
- Dwijendra, I.M., Mewengkang, D.S., Mehantow F.S., 2014. Aktivitas Antibakteri dan Karakteristik Senyawa Fraksi Spons Lamellodysidea Herbacea

- Yang Diperoleh Dari Teluk Manado. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*, **4**;2302-2493.
- Gani, A., 2007, *Aktifitas antibakteri ekstrak kasar daun cocor bebek (Kalanchoe gastonis-bonnier)*, Skripsi, Institusi Pertanian Bogor, Bogor.
- Ganiswarna, S., 1995, *Farmakologi dan Terapi*, edisi IV, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kasanah N., Triyanto., Seto, D. S, Amelia, W., dan Isnansetyo A., 2015, Antibacterial compounds from red seaweed (Rhodophyta). *Indones. J. Chem*, **15**,(2); 201-203.
- Khalid, A., 2009. *Pengaruh Uji Antimitotik Fraksi N-Heksan dari Hydroid Aglaophennia cupressina Lamoureaux terhadap Pembelahaan Awal Sel Zigot Bulu Babi Tripneustes gratilla Linn*, Skripsi tidak diterbitkan, Makassar, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
- LPPOM MUI, 2013, *Panduan Umum Sistem Jaminan Halal LPPOM-MUI*.
- Mattulada, I. K., Trilaksana, A. C., dan Abduh D. A., 2018, Efektivitas antibakteri ekstrak alga merah (*Euclima spinosum*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*, *Makassar Dent J*, **7**,(1); 41.
- Muhtihah, A., Dharmayanti, N., Nurbani, S. Z., Salampessy, R. B. S., Siregar, A. N., Permadi, A., dan Sipahutar, J., 2017, Antibacterial Potensial of The Symbiont Red Algae *Euclima cottonii* Originated from Banten Bay Waters, Indonesia, *Journal of Research in Ecology*, **5**,(2); 1255-1263.
- Nurhaedar., 2008, Potensi Bakteri Symbiont Spon Class Demospongiae sebagai Sumber Senyawa Antimikroba, *Makalah Poster Seminar Nasional Persatuan Biologi Indonesia Ke-XIX*, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Nuzaha dan Muchtaridi, M., 2017, Review Jurnal: Aktivitas antimikroba dari Senyawa Bioaktif Rumput Laut atau Makroalga, *Farmaka Suplemen*, **15**,(2); 207-217.
- Purwoko, S.T., 2007, *Fisiologi Mikroba*, Bumi Aksara, Jakarta.
- Ramadan., 2021, *Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Symbiont Alga Merah (Euclima spinosum) dan Potensinya*

sebagai Agen Antikanker, Tesis tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.

Reda, F. M., 2014, Purification and Characterization of *Streptomyces canarius* L-Glutaminase and its Anticancer Activity, *Egypt. J. Bot*, **54**,(1); 137-157.

Rumengan, I. F. M., Rumampuk, N. D., Rimper, J., dan Losung, F., 2014, Produksi dan Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Bioaktif yang Diekstrak dari Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Stain Lokal, *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, **1**,(1); 56-70.

Sabdaningsih, A., Budiharjo, A., dan Kusdiyantini, E., 2013, Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Koloni Bakteri Asosiasi Alga Merah (Rhodophyta) dari Perairan Kutuh Bali, *Jurnal Biologi*, **2**,(2); 11-17.

Santoso, J., Fitriani, D., dan Wardianto, Y., 2010, Kandungan Fenol dan Aktivitas Antioksidan Makroalga Bentik *Caulerpa racemosa* (Frosskal) dan Tluk Huruan, *Jurnal Ilmiah Lampung*, **15**,(3). Sabdaningsih, Sartika,

Sajjadi, S.E., Ghanadian, M., Haghghi, M., dan Mouhebat, L., 2015 Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells, *J HerbMed Pharmacol*, **4**(1); 15-19.

Sartika., 2014, *Potensi Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Alga Coklat Sargassum sp. Asal Perairan Pulau Lae-Lae*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.

Scope, R.K., 1982, *Protein Purification*, Spinger Verlag, New York.

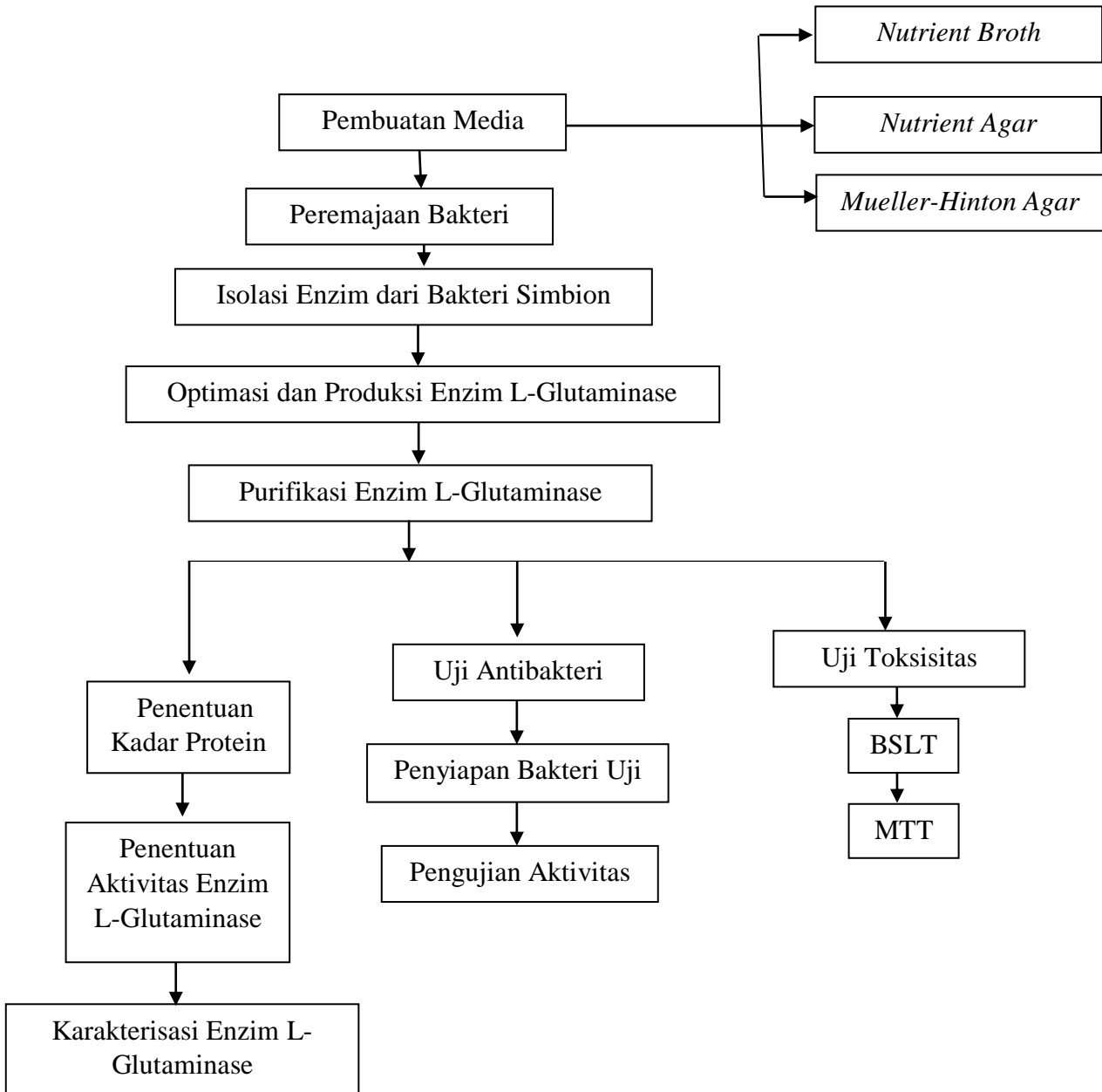
Selvan, B., Priya, S. P., Chandrasekhar, M. dan Vennison, S. J., 2014, Marco Algae *Eucheuma cottonii* and *Sagassum* sp. are Reservoirs of Biodiesel and Bioactive Compounds, *Journal of Chemical and Phamaceutical Science*, **2**; 67-70.

Setiabudy, R., 2007, Pengantar Antimikroba Farmakologi dan Terapi, Departemen Farmakologi Dan Terepeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

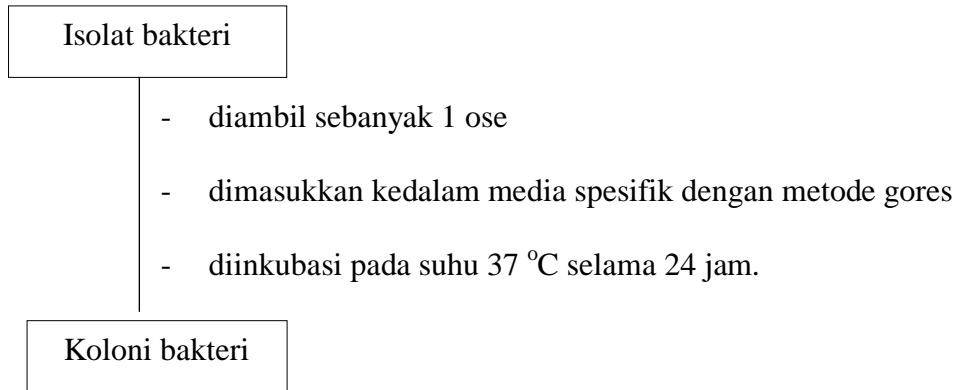
Sidharta, B. R., 2000, Pengantar Mikrobiologi Kelautan, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Yogyakarta.

- Sinha, S., dan Nigam, V. K., 2016, Production and Characterization of L-Glutaminase by *Bacillus* sp., *IJPSR*, **7**,(4); 1620-1626.
- Soediro, I. S., 1999, Produk Alam Hayati Bahari dan Prospek Pemanfaatannya di Bidang Kesehatan dan Kosmetika, Prosidings Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta.
- Srikong W., Mittraparp-arthom P., Rattanaporn O, Bovornreungroj N., Bovornreungroj P., 2015, Antimicrobial activity of seaweed extracts from Pattani, Southeast coast of Thailand. *Food and Applied Bioscience Journal*, **3**,(1); 34-49.
- Suprobo, C.O., Suprihati dan Wuryanti, 2011, Uji Antikanker Isolat Bioaktif L-Asparinase dari Kunyit Putih (*Curcuma mangga Val*) terhadap Sel Kanker Serviks, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasinya*, **14**,(2); 58-63.
- Sulistiyani, T.R., dan Kusumawati, D.I., 2019, Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase, *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, **9**(6); 28-39.
- Sumardjo, D. 2009. Pengantar Kimia. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Susanti, R., dan Febriana, F., *Teknologi Enzim*, Penerbit ANDI, Semarang.
- Waluyo, L., 2004, *Mikrobiologi Umum*, UMM press, Malang.
- Wattimena, G. A. L. W., Gunawan, N., Mattjik, A., Syamsudin, E., Wiendi, N. M. A., dan Ermwati, 1991, *Bioteknologi Tanaman*. PAU Bioteknologi. IPB Bogor.
- Yamaguchi, K., 1997, Instrumental Molecular Structure of the Zwitterionic Form of Phenolsulfonphthalein Achievements, *Journal Anal. Sci*, **13**; 4-5.
- Yulianti, T., Chasanah, E., dan Tambunan, U. S. F., 2012, Penapisan dan Karakterisasi L-Glutaminase yang Diproduksi oleh Bakteri dari Perairan Sangihe Talaud, *Jurna Squalen*, **7**,(3); 115-122.

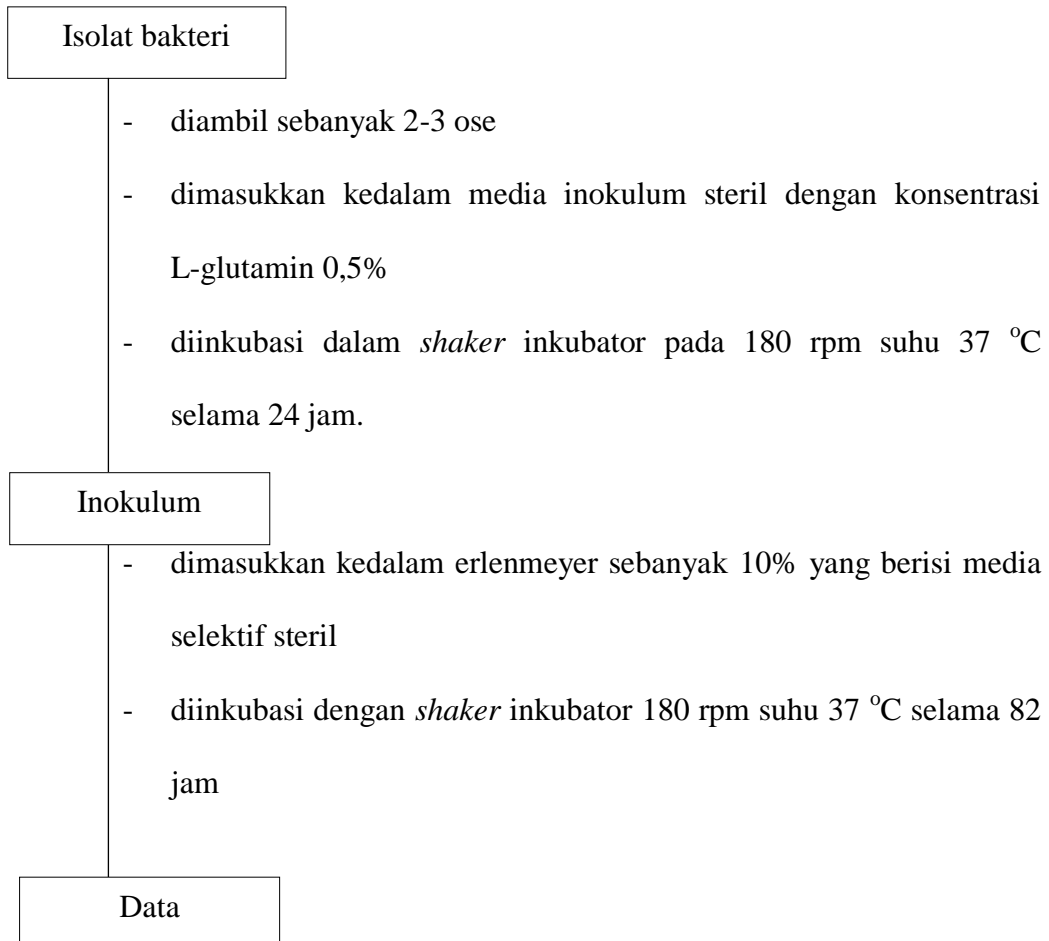
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



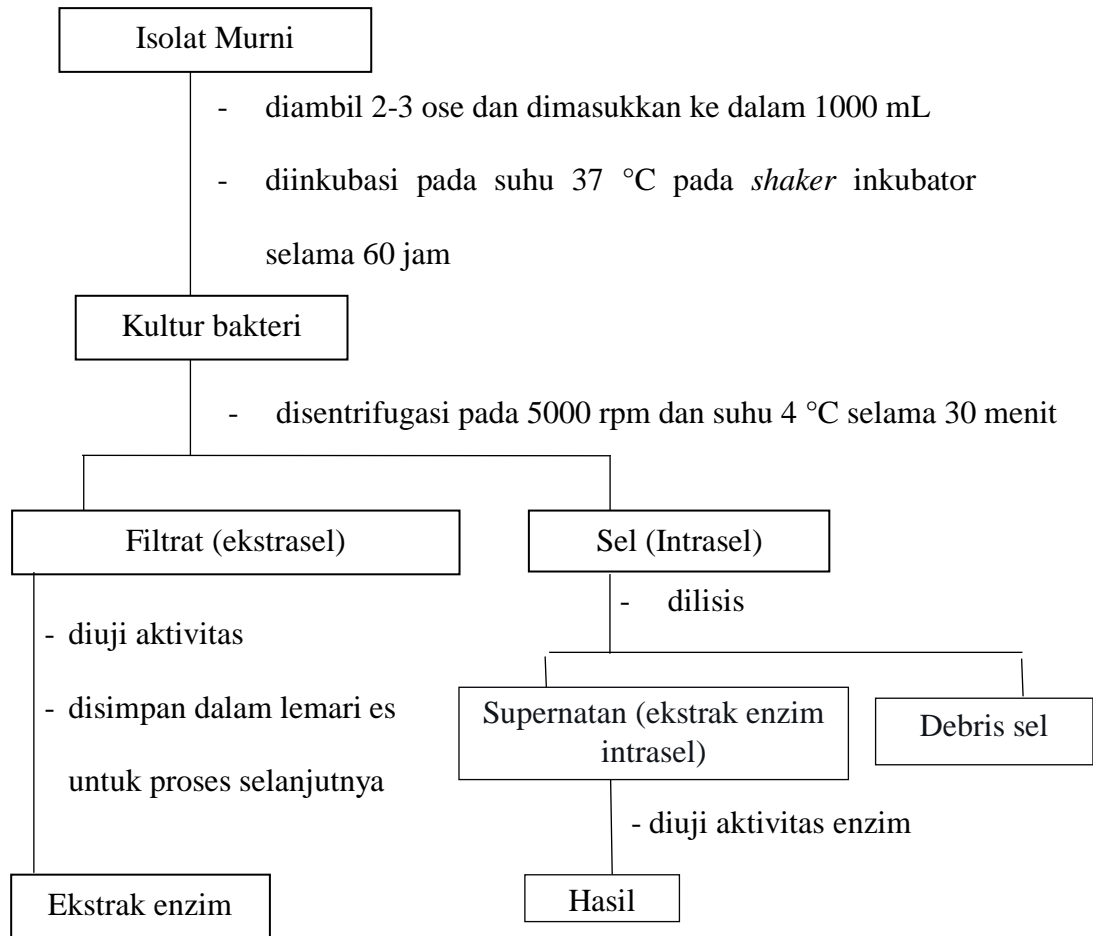
Lampiran 2. Peremejaan Isolat Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*



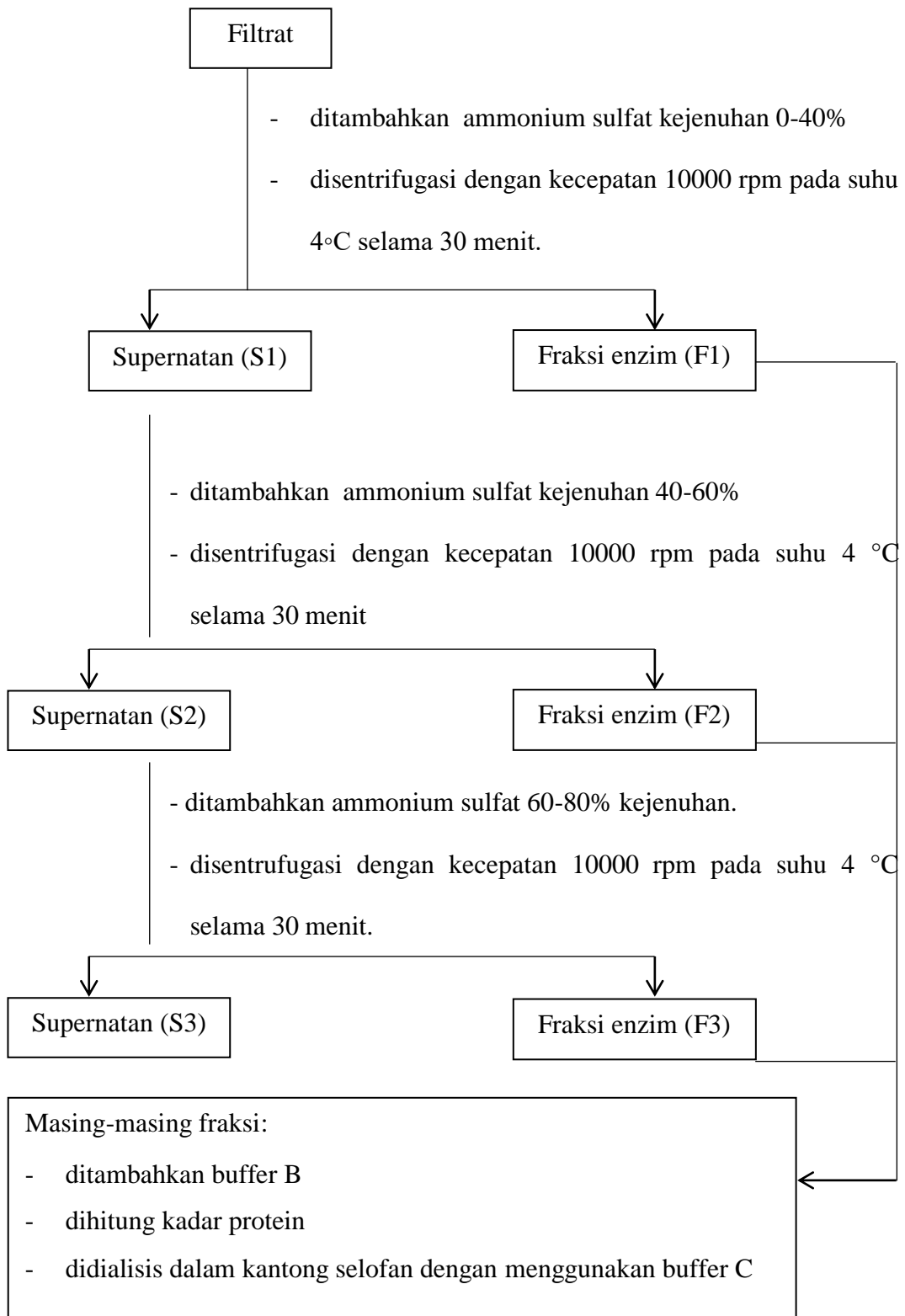
Lampiran 3. Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma spinosum*



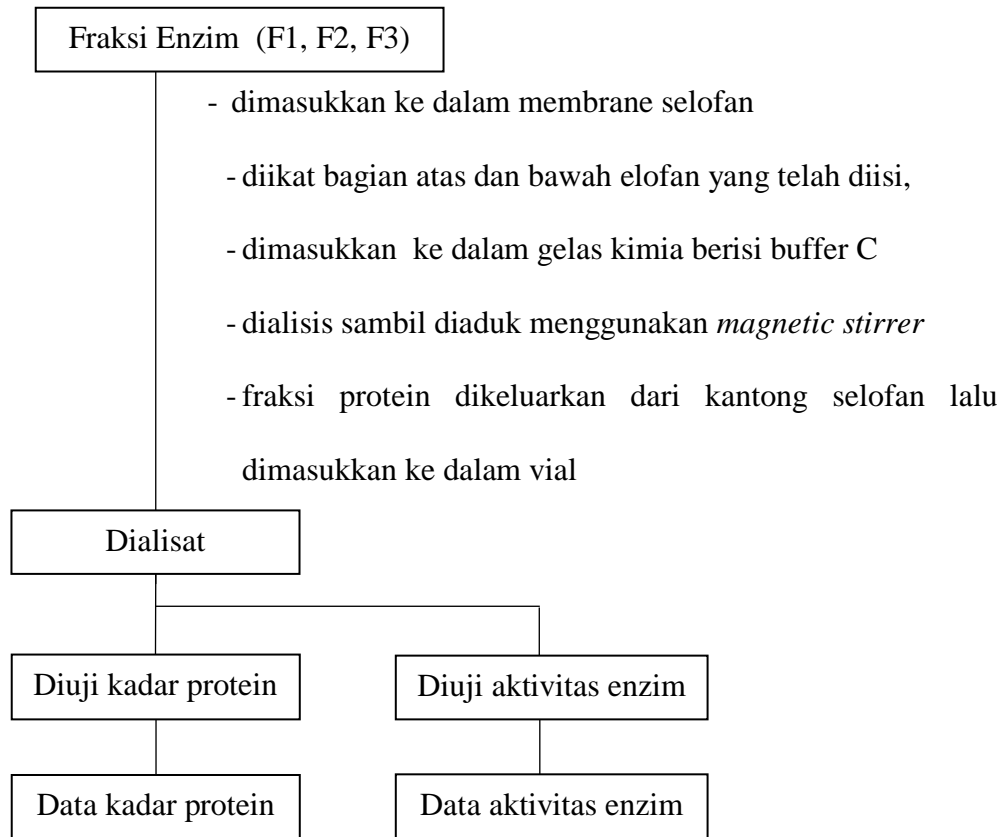
Lampiran 4. Bagan Kerja Produksi Enzim L-Glutaminase



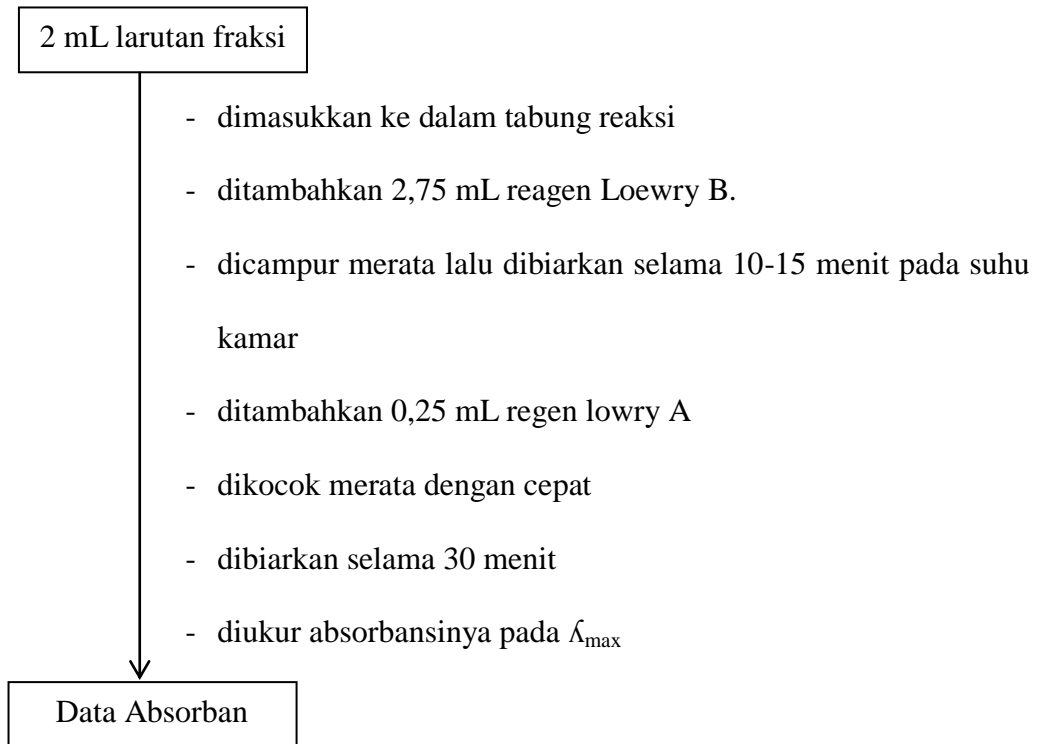
Lampiran 5. Bagan Kerja Fraksinasi Enzim L-Glutaminase dengan Amonium Sulfat



Lampiran 6. Bagan Kerja Dialisis



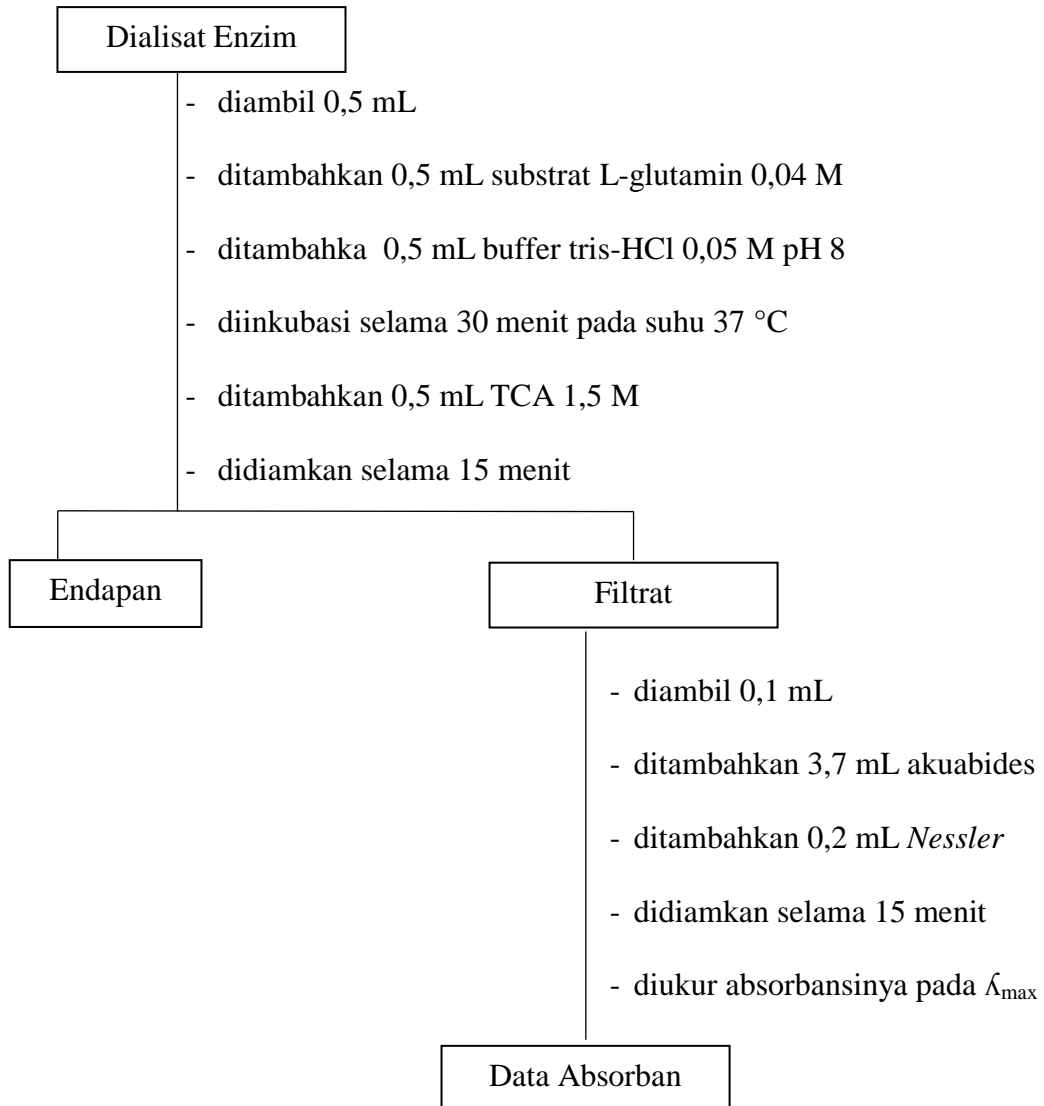
Lampiran 7. Prosedur penentuan kadar protein sampel dengan metode lowry



Ket:

- Perlakuan yang sama dilakukan untuk larutan blanko dan standar BSA
- Ditentukan kadar protein dari absorbansio yang didapatkan

Lampiran 8. Penentuan Aktivitas Enzim L-glutaminase dengan Metode *Nessler*

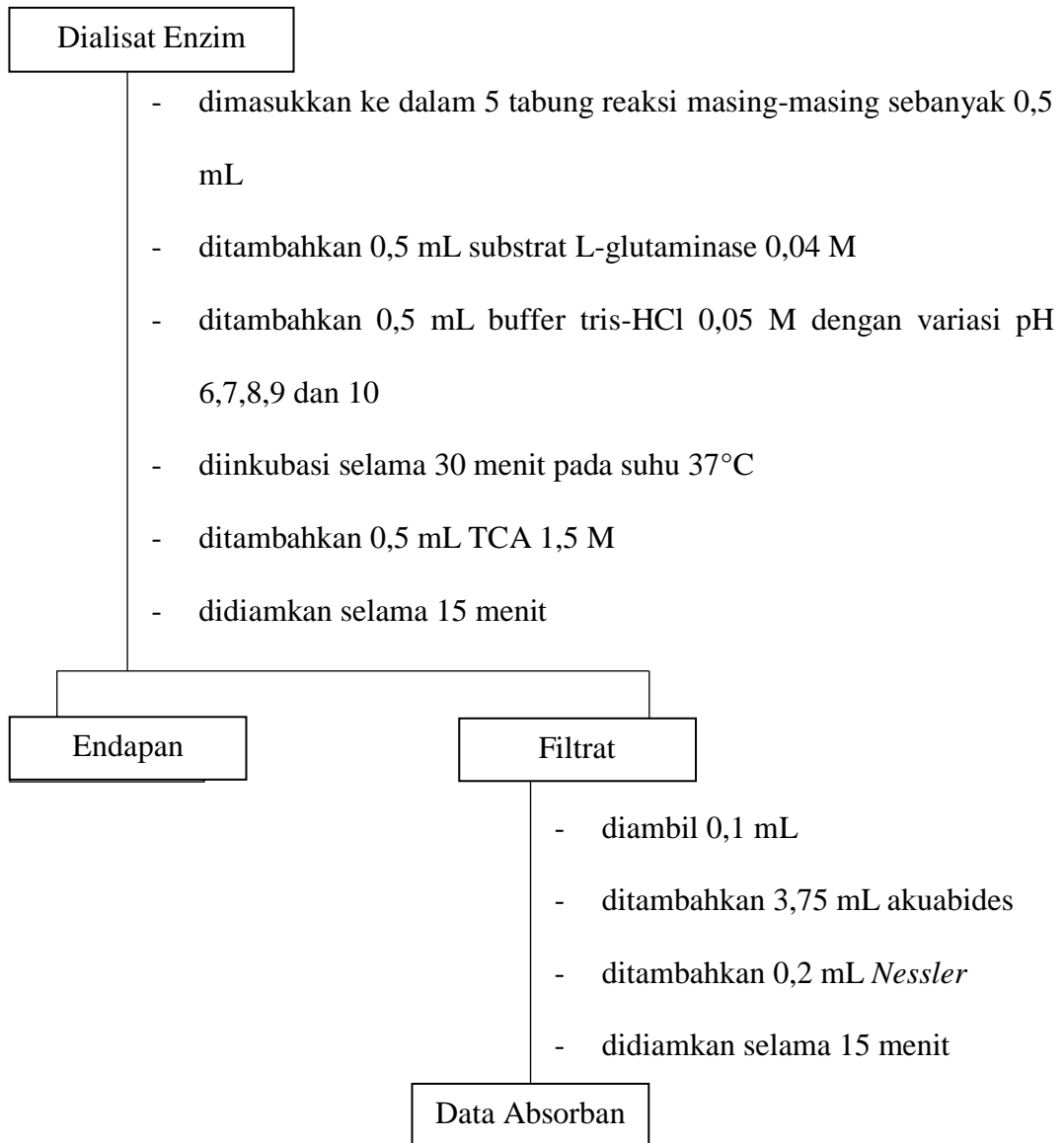


Ket:

- Dilakukan cara yang sama menggunakan standar NH_4Cl 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12 mg/L dimulai dari tahap perlakuan filtrate
- Dihitung aktivitas enzim L-glutaminase dari data absorbansi yang didapatkan

Lampiran 9. Skema Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase

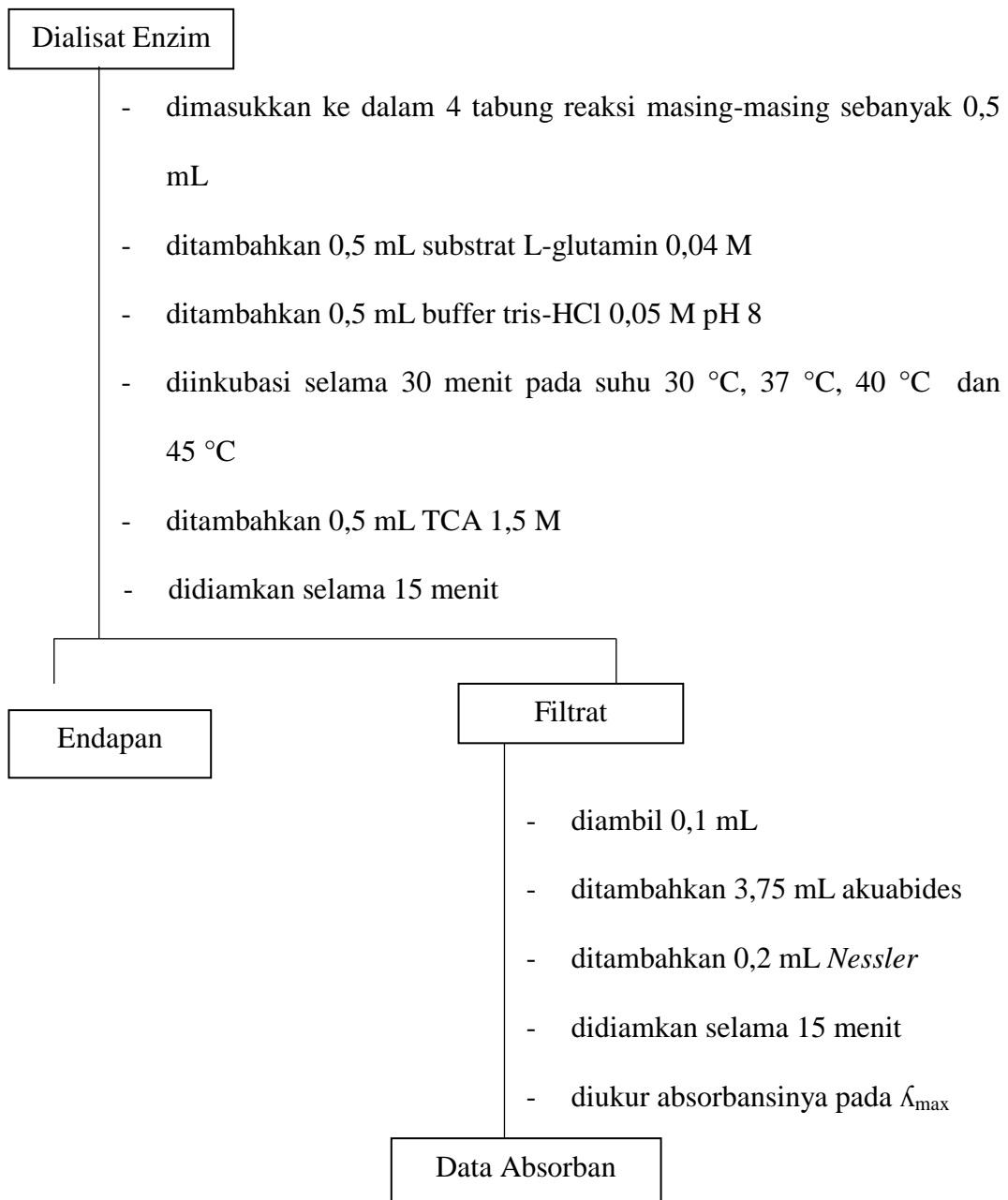
a. Karakterisasi Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim L-Glutaminase



Ket:

- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan

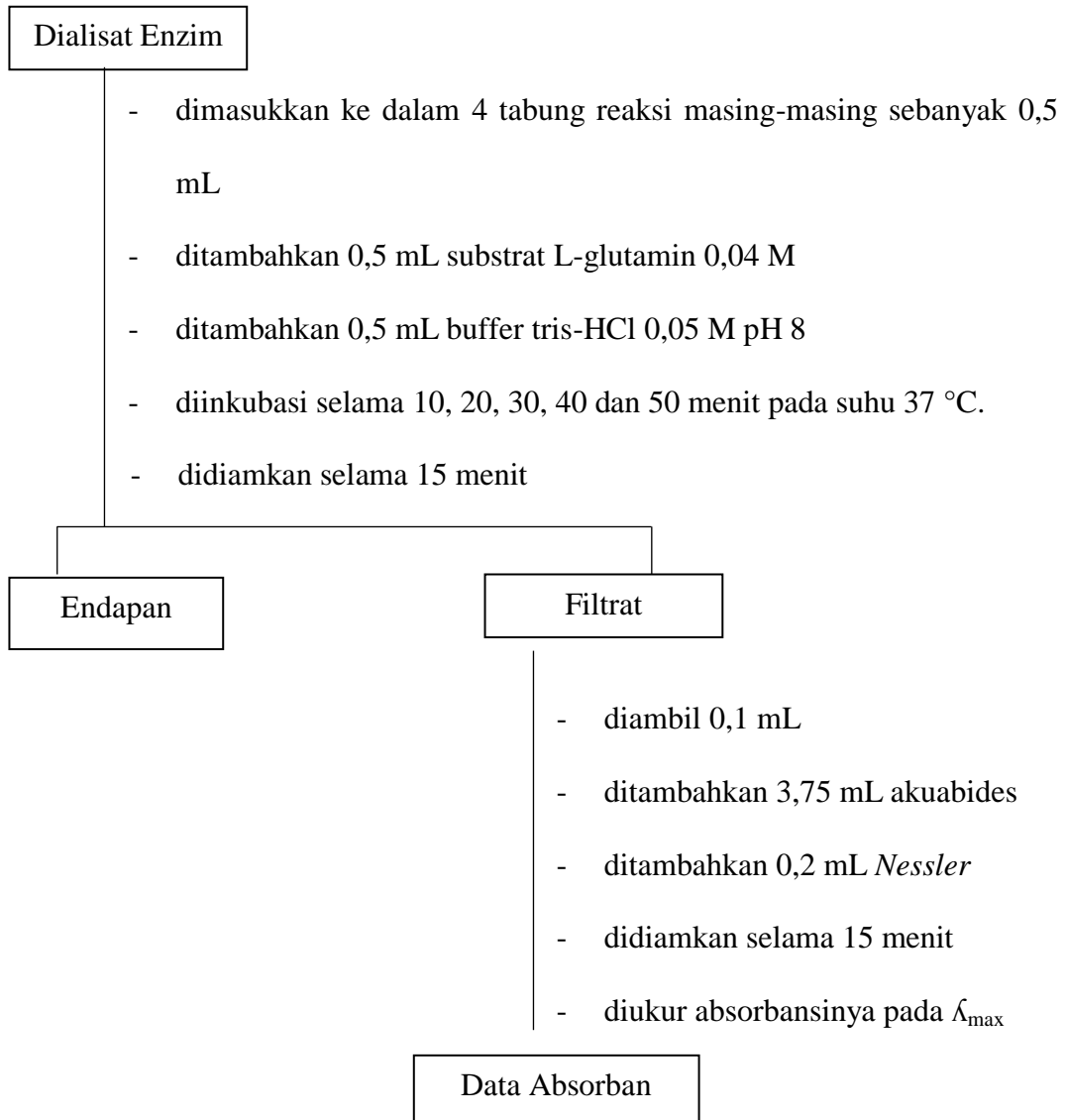
b. Karakterisasi Pengaruh suhu terhadap Aktivitas Enzim L-Glutaminase



Ket:

- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan

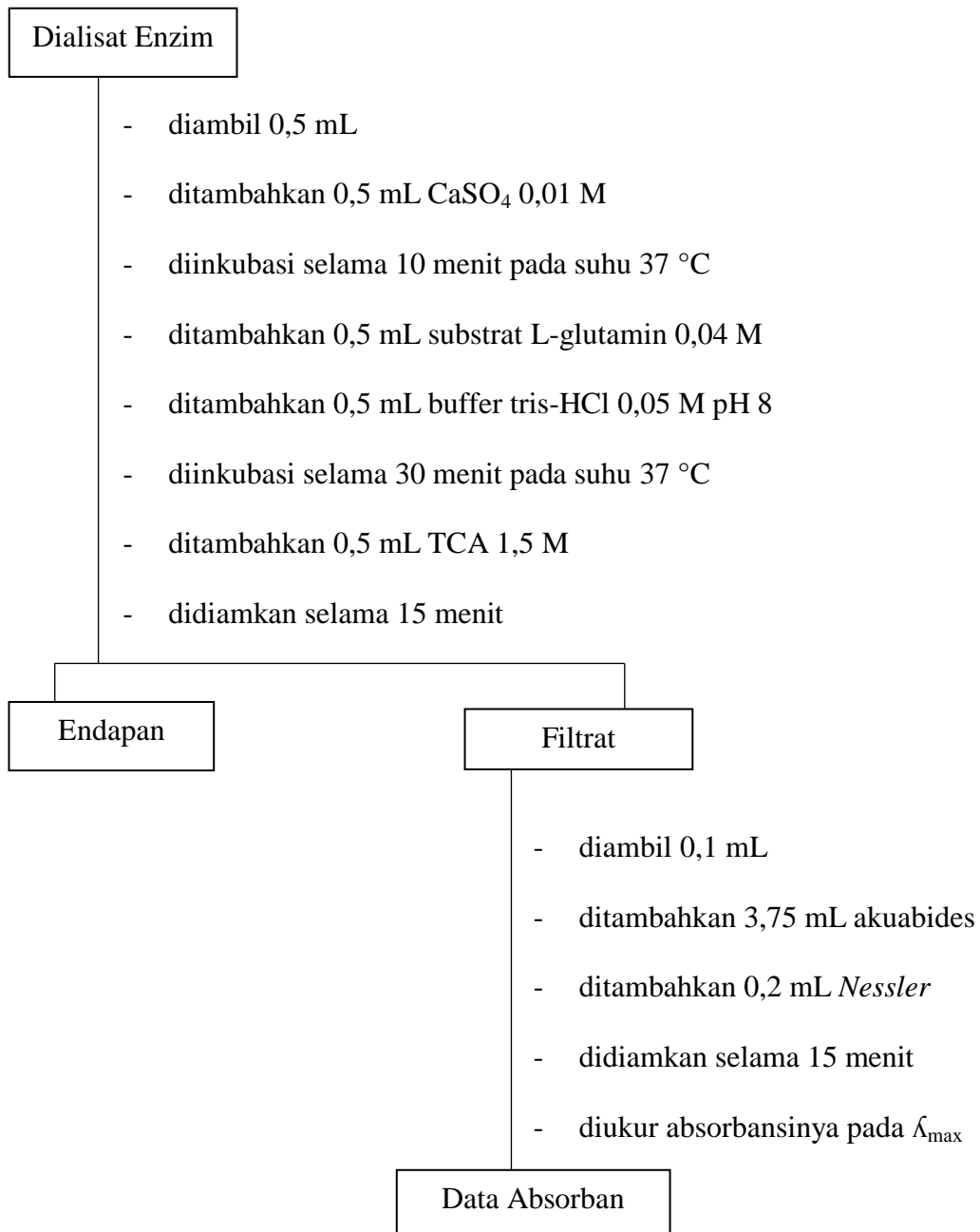
c. Karakterisasi Pengaruh waktu terhadap Aktivitas Enzim L-Glutaminase



Ket:

- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan

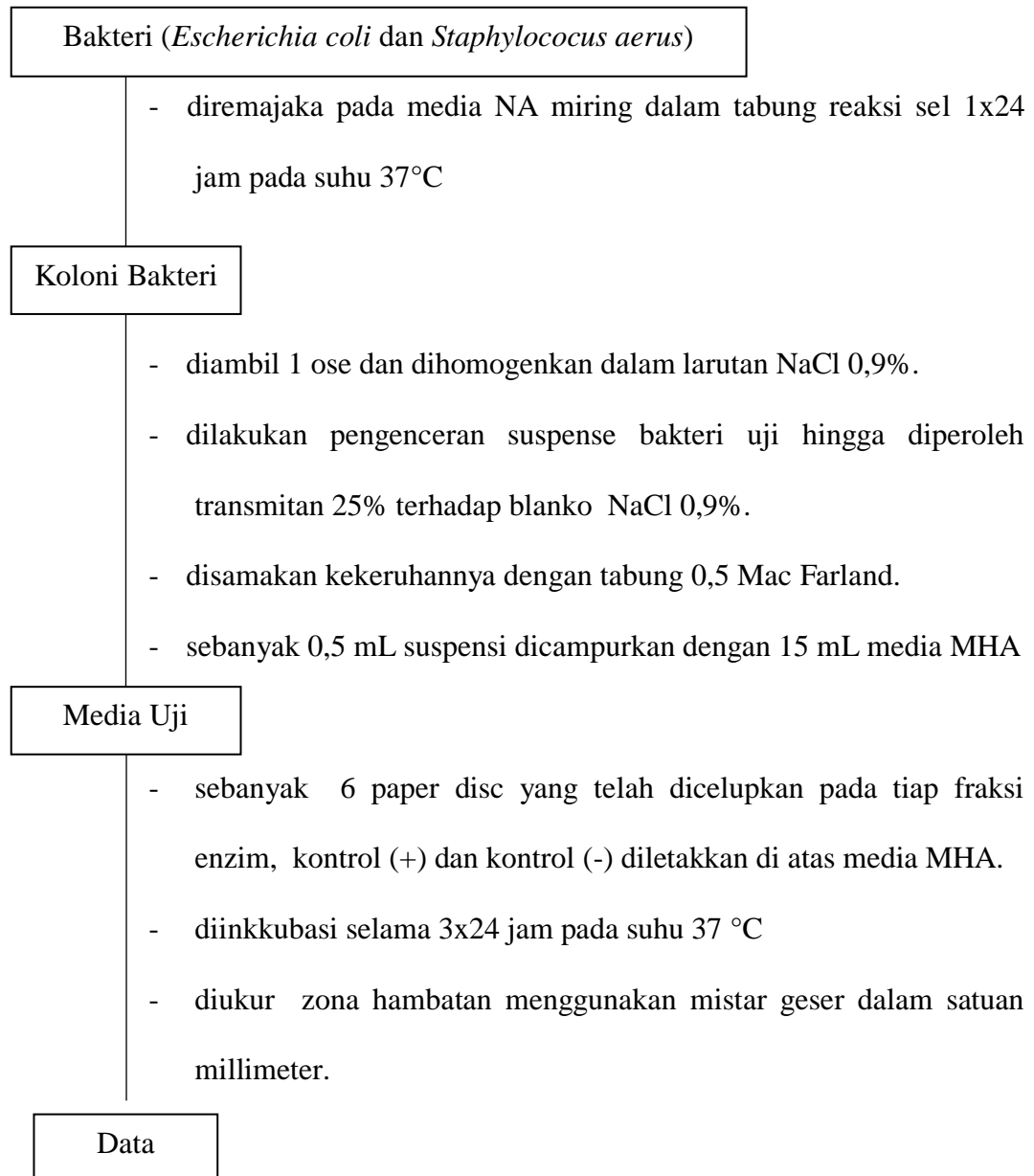
d. Karakterisasi pengaruh penambahan logam terhadap Aktivitas Enzim L-Glutaminase



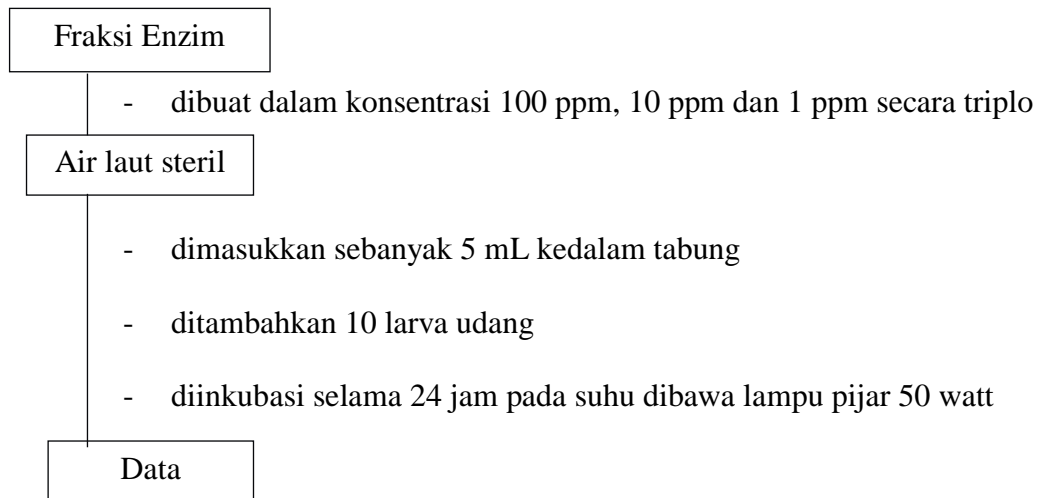
Ket:

- Perlakuan yang sama dilakukan untuk larutan blanko dan larutan control
- Perlakuan yang sama dilakukan pada penambahan NaCl, MgSO₄, ZnSO₄, KCl, CuSO₄, CoSO₄ dan MnSO₄ 0,01 M
- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan

Lampiran 10. Bagan Kerja Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar



Lampiran 11. Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)



Lampiran 12. Uji Sitotoksitas Enzim L-Glutaminase terhadap Sel Kanker MCF-7 (Haryanti dan Widiyastuti, 2017)

Sel MCF-7 dengan kepadatan 8000 sel/sumuran

- didistribusikan ke dalam sel 96 *well plate*
- diinkubasi selama 48 jam dalam media kultur EMEM
- ditambahkan enzim L-glutaminase dengan konsentrasi 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{g/mL}$
- diinkubasi selama 48 jam
- ditambahkan 100 μL media EMEM yang mengandung MTT 5 mg/mL
- diinkubasi selama 3 jam pada 37 °C
- dilarutkan dengan penambahan reagen *stopper sodium dodecyl sulfate* (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N
- dibiarkan ditempat gelap selama semalam
- diukur absorbansinya dengan ELISA *reader*

Data

Lampiran 12. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Pereaksi:

1. Pereaksi Lowry A

Pada pembuatan Lowry A yakni dengan pencampuran antara follin ciocalteus dan akuades dengan perbandingan 1:1 dan dibuat sebanyak 100 mL.

2. Pereaksi Lowry B

Pada pembuatan Lowry B yakni dengan pencampuran antara Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N, Na-K-Tartat 2%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%. Dengan perbandingan 100:1:1, dimana diambil larutan Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N sebanyak 100 mL, Na-K-Tartat 2% sebanyak 1 mL, dan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%. Kemudian dihomogenkan.

Larutan Contoh:

- Dipipet 2 mL larutan sampel dan ditambahkan 2,75 mL Lowry B, dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit.
- Ditambahkan 0,25 mL Lowry A dan segera dikocok.
- Disimpan pada suhu kamar selama 30 menit, lalu diukur absorbannya pada panjang gelombang maksimum.

Larutan Baku:

- Ditimbang dengan teliti BSA untuk membuat sedian 1 mg/mL dan diencerkan dengan variasi konsentrasi 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 dan 0,32 mg/mL.
- Perlakuan larutan standar tersebut seperti pada larutan contoh.

Lampiran 13. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl

A. Pembuatan larutan buffer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; NaCl 2 M; CaCl₂ 0,01 M, β-merkaptoetanol 1%, Triton X-100 0,5%)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 6,05 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana 0,4 M ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya sampai mencapai 8,3.
3. Lalu ditambahkan NaCl sebanyak 58,5 g dan 0,555 g CaCl₂, 2,5 mL larutan triton X-100 dan 5 mL β-merkaptoetanol dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.

B. Pembuatan larutan buffer B (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 6,05 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana 0,4 M ditambahkan HCl 0,2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya sampai mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl₂ dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.

C. Pembuatan Larutan Buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M)

Prosedur Pembuatan Larutan:

1. Ditimbang 0,605 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana 0,4 M ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya sampai mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g dan 0,555 g CaCl₂ dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.

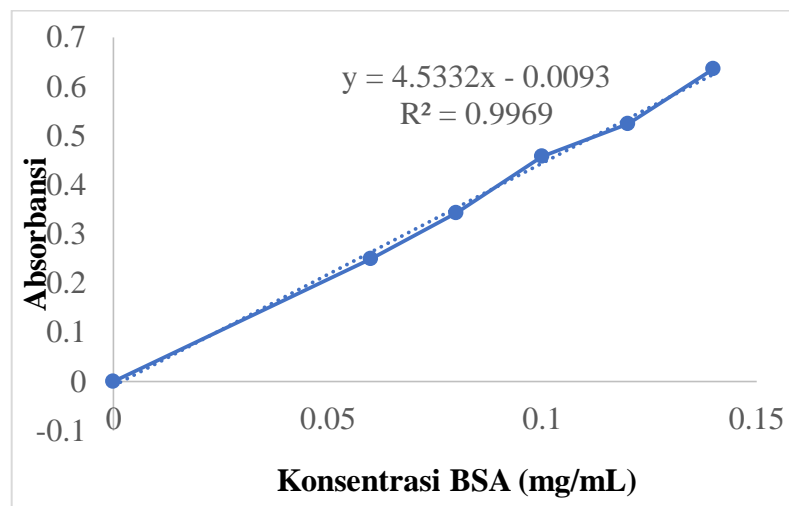
Lampiran 14. Pembuatan Reagen *Nessler*

Pembuatan Larutan *Nessler* dilakukan dengan cara berikut:

1. Ditimbang NaOH sebanyak 16 g kemudian dilarutkan dengan akuades hingga larut lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL
2. Dilarutkan 7 g KI dalam akuades
3. Dilarutkan 10 g HgCl₂ dalam akuades
4. Dimasukkan campuran KI dan HgCl₂ ke dalam larutan NaOH dalam labu ukur 100mL
5. Ditambahkan akuades hingga garis batass kalibrasi
6. Dihomogenkan dan disimpan dalam botol reagen berwarna gelap

Lampiran 15. Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* pada λ 630 nm

No	Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi (λ 630 nm)
1	0	0
2	0,06	0,25
3	0,08	0,343
4	0,1	0,458
5	0,12	0,524
6	0,14	0,636



Lampiran 16. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein dari Bakteri Symbion dan *Optical Density* (OD)

No	Waktu Fermentasi (jam)	OD (λ 630 nm)	Absorbansi (λ 630 nm)	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0,197	0,266	6,072
2	6	0,564	0,271	6,183
3	12	0,810	0,272	6,205
4	18	1,140	0,283	6,448
5	24	1,045	0,300	6,822
6	30	1,310	0,309	7,021
7	36	1,160	0,313	7,109
8	42	1,400	0,321	7,286
9	48	1,500	0,327	7,418
10	54	1,640	0,336	7,617
11	60	1,600	0,325	7,374
12	66	1,560	0,323	7,330
13	72	1,520	0,312	7,087
14	78	1,420	0,308	6,999

Lampiran 17. Perhitungan Penambahan Ammonium Sulfat pada Tahap Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

Fraksi Enzim	Fraksi (%)	Volume Filtrat (mL)	Bobot Ammonium Sulfat (g)
F0	Ekstrak Kasar	800	0
F1	0-40%	800	180.8
F2	40-60%	800	96
F3	60-80%	770	99.33

Penambahan Ammonium Sulfat:

- a. 0-40% = $226 \text{ g} \times 800 \text{ mL} / 1000 \text{ mL} = 180.8 \text{ g}$
- b. 40-60% = $120 \text{ g} \times 800 \text{ mL} / 1000 \text{ mL} = 96 \text{ g}$
- c. 60-80% = $129 \text{ g} \times 770 \text{ mL} / 1000 \text{ mL} = 99.33 \text{ g}$

Lampiran 18. Tabel Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat

S2		Garam amonium sulfat yang ditambahkan (gram)															
S1	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25	0	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30	0	0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	533
35	0	0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	498	543
40	0	0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	463	508	553
45	0	0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	468	513	558
50	0	0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	468	513	558
55	0	0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	468	513	558
60	0	0	31	62	95	129	164	210	239	279	313	353	398	448	503	563	628
65	0	0	31	63	97	132	168	205	244	288	337	391	450	514	583	657	736
70	0	0	31	63	97	132	168	205	244	288	337	391	450	514	583	657	736
75	0	0	32	65	99	134	171	209	250	295	345	399	458	522	591	665	744
80	0	0	32	65	99	134	171	209	250	295	345	399	458	522	591	665	744
85	0	0	32	66	101	137	174	215	255	300	350	404	463	527	596	670	749
90	0	0	33	67	103	139	179	220	260	305	355	409	468	532	601	675	754
95	0	0	34	68	105	141	181	222	262	307	357	411	470	534	603	677	756
100	0	0	35	69	107	143	183	224	264	309	359	413	472	536	605	679	758

Lampiran 19. Pengukuran Kadar Protein Dialisat Enzim L-Glutaminase

Fraksi Protein	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)	Faktor Pengenceran	Kadar Protein Sebenarnya (mg/mL)
EK	0,987	0,219	100	21,977
F1	0,440	0,099	100	9,911
F2	0,052	0,013	100	1,352
F3	0,086	0,021	100	2,102

Dari hasil regresi kurva larutan standar diperoleh persamaan garis $y = 4,5332x - 0,0093$. Maka data pada tabel di atas di peroleh dengan cara:

$$X_{EK} = \frac{y - 0,0093}{4,5332} = \frac{0,987 - 0,0093}{4,5332} = 0,219 \text{ mg/mL}$$

$$X_1 = \frac{y - 0,0093}{4,5332} = \frac{0,440 - 0,0093}{4,5332} = 0,099 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,0093}{4,5332} = \frac{0,052 - 0,0093}{4,5332} = 0,013 \text{ mg/mL}$$

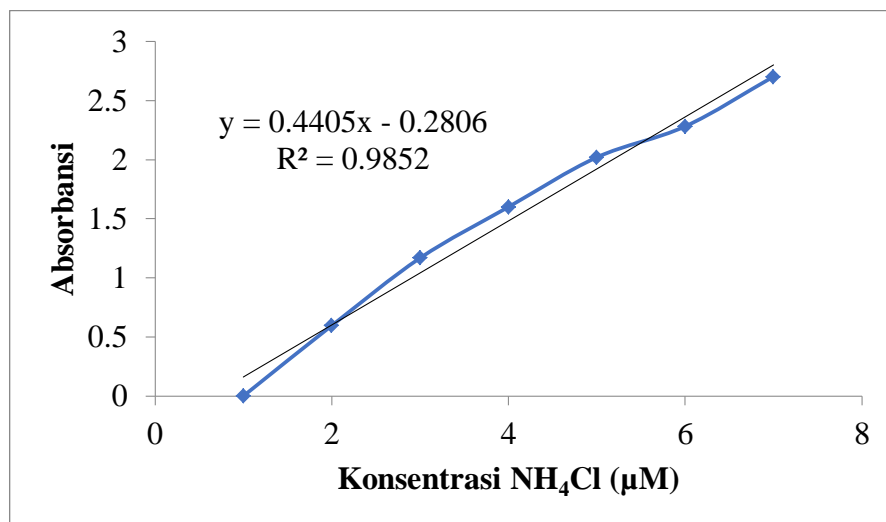
$$X_3 = \frac{y - 0,0093}{4,5332} = \frac{0,086 - 0,0093}{4,5332} = 0,021 \text{ mg/mL}$$

Selanjutnya dikalikan dengan faktor pengenceran ($fp = 100$), sehingga:

$$\begin{aligned} x &= 0,021 \text{ mg/mL} \times 100 \\ &= 2,102 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Lampiran 20. Kurva Standar NH₄Cl pada λ 390 nm

No	Konsentrasi NH ₄ Cl (mg/mL)	Konsentrasi NH ₄ Cl (μM)	Absorbansi
1	0	0	0
2	0,02	0,374	0,596
3	0,04	0,748	1,168
4	0,06	1,121	1,6
5	0,08	1,495	2,02
6	0,1	1,869	2,282
7	0,12	2,243	2,703



Lampiran 21. Tabel Aktivitas Enzim L-Glutaminase

Fraksi Enzim	Aktivitas L-Glutaminase (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
EK	11,0833	21,977	0,5043
F1	19,0539	9,911	1,9225
F2	15,1323	1,352	11,1925
F3	27,8775	2,102	13,2624

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y-b}{a} \times \frac{V \text{ total}}{V \text{ analisis}} \times \frac{1}{V \text{ enzim} \times t \text{ inkubasi}}$$

Data absorbansi yang diperoleh, disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 0,4405x - 0,2806$, dimana y adalah absorbansi aktivitas enzim

$$X_{EK} = \frac{1,087 - 0,2806}{0,4405} \times \frac{2}{0,1} \times \frac{1}{0,5 \times 30} = 11,0833 \text{ U/mL}$$

$$X_1 = \frac{1,9 + 0,2806}{0,4405} \times \frac{2}{0,1} \times \frac{1}{0,5 \times 30} = 19,0539 \text{ U/mL}$$

$$X_2 = \frac{1,5 + 0,2806}{0,4405} \times \frac{2}{0,1} \times \frac{1}{0,5 \times 30} = 15,1323 \text{ U/mL}$$

$$X_3 = \frac{2,8 + 0,2806}{0,4405} \times \frac{2}{0,1} \times \frac{1}{0,5 \times 30} = 27,8775 \text{ U/mL}$$

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

$$= \frac{27,8775}{2.102} \text{ U/mg}$$

$$= 13,2624 \text{ U/mg protein}$$

Lampiran 22. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase

A. Aktivitas Enzim L-Glutaminase terhadap Pengaruh Variasi pH

No	pH	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	6	0.086	1,2696
2.	7	0.120	1,6029
3.	8	0.180	2,1911
4.	9	0.012	0,5441
5.	10	0.009	0,5147

B. Aktivitas Enzim L-Glutaminase terhadap Pengaruh Variasi Suhu

No	Suhu (°C)	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	30	0.035	0,5221
2.	35	0.060	0,9147
3.	40	0.050	0,7166
4.	45	0.015	0,5735

C. Aktivitas Enzim L-Glutaminase terhadap Pengaruh Variasi Waktu Inkubasi

No	Waktu (menit)	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	10	0.005	0,4754
2.	20	0.025	0,6715
3.	30	0.055	0,9656
4.	40	0.040	0,7225
5.	50	0.010	0,5245

D. Aktivitas Enzim L-Glutaminase terhadap Pengaruh Penambahan Variasi Logam

No	Logam	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	Kontrol	0.09	1,3088
2.	Ca ²⁺	0,021	0,6323
3.	Na ²⁺	0,012	0,5441
4.	Mg ²⁺	0,095	1,3578
5.	Zn ²⁺	0,05	0,9167
6.	K ²⁺	0,035	0,7670
7.	Cu ²⁺	0,030	0,7205
8.	Co ²⁺	0,130	1,7009
9.	Mn ²⁺	0,135	1,7500

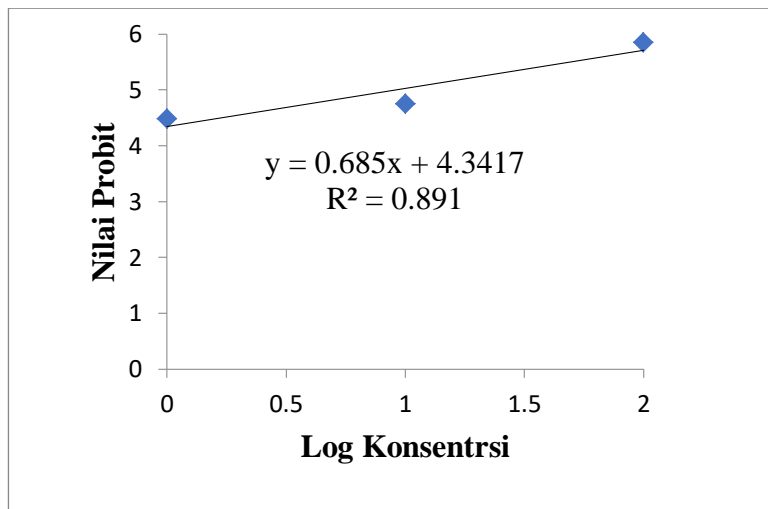
Lampiran 23. Tabel Harga Probit

Persenta se	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,93	3,95	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,17	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,55	7,66	7,75	7,88	8,09

Lampiran 24. Perhitungan LC₅₀

A. Perhitungan LC₅₀ pada Fraksi Ekstrak Kasar

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	30	4,48
1	40	4,75
2	80	5,85



$$y = 0,685x + 4,3417$$

$$x = \frac{y - 4,3417}{0,685}$$

Untuk memperoleh kematian 50% maka nilai probitnya (Y) = 5

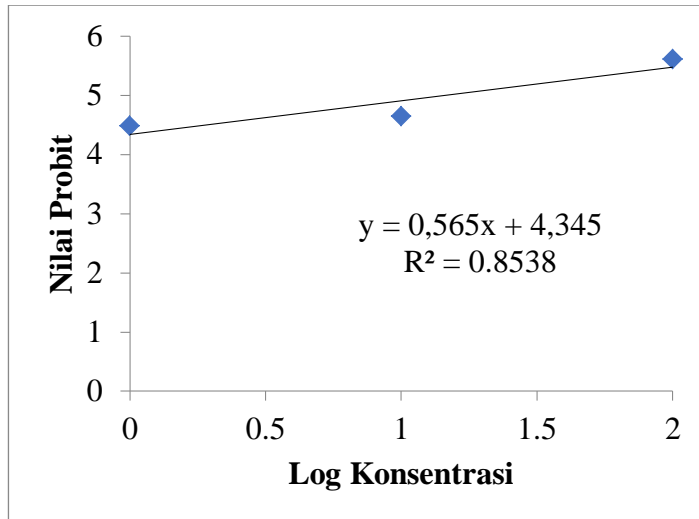
$$x = \frac{5 - 3,468}{1,415}$$

$$x = 1,000455927 = \text{Log LC}_{50}$$

sehingga $\text{LC}_{50} = 10,010 \text{ ppm}$

B. Perhitungan LC₅₀ pada Fraksi 0-40%

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	30	4,48
1	36	4,64
2	73	5,61



$$y = 0,565x + 4,345$$

$$x = \frac{y - 4,345}{0,565}$$

Untuk memperoleh kematian 50% maka nilai probitnya (Y) = 5

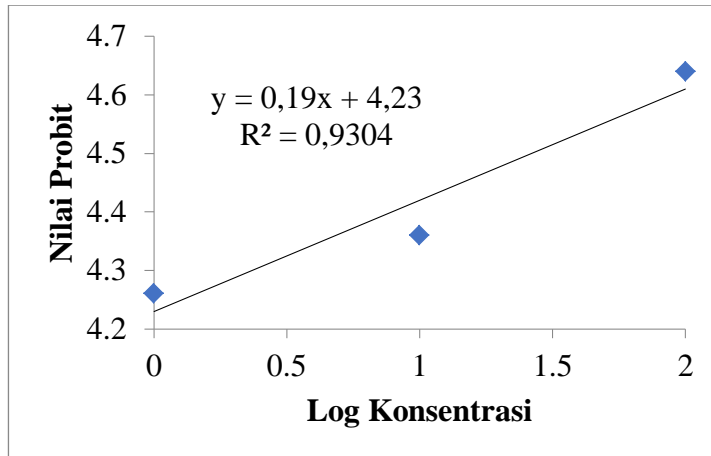
$$x = \frac{5 - 4,345}{0,565}$$

$$x = 1,159292 = \text{Log LC}_{50}$$

sehingga LC₅₀ = 14,43085 ppm

C. Perhitungan LC₅₀ pada Fraksi 40-60%

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	23	4,26
1	26	4,36
2	36	4,64



$$y = 0,19x + 4,23$$

$$x = \frac{y - 4,23}{0,19}$$

Untuk memperoleh kematian 50% maka nilai probitnya (Y) = 5

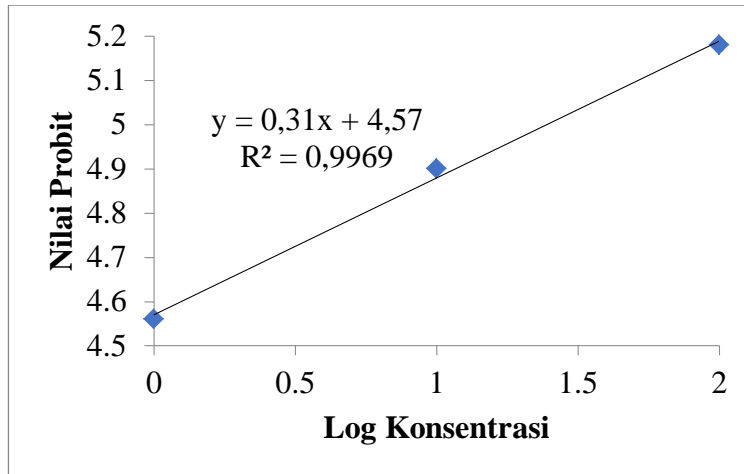
$$x = \frac{5 - 4,23}{0,19}$$

$$x = 4,052632 = \text{Log LC}_{50}$$

sehingga LC₅₀ = 11288 ppm

D. Perhitungan LC₅₀ pada Fraksi 60-80%

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	33	4,56
1	46	4,9
2	57	5,18



$$y = 0,31x + 4,57$$

$$x = \frac{y - 4,57}{0,31}$$

Untuk memperoleh kematian 50% maka nilai probitnya (Y) = 5

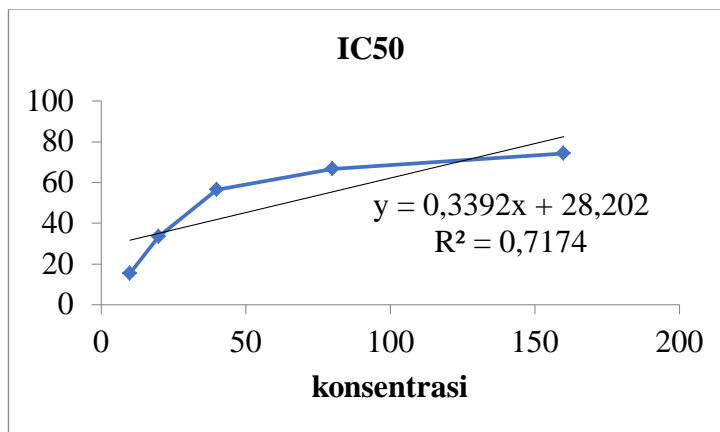
$$x = \frac{5 - 4,57}{0,31}$$

$$x = 1,589615 = \text{Log LC}_{50}$$

sehingga LC₅₀ = 38,87008 ppm

Lampiran 25. Perhitungan IC₅₀

Konsentrasi	Viabilitas Sel %	% Aktivitas
10	84,62	15,38
20	66,67	33,33
40	43,59	56,41
80	33,33	66,67
160	25,64	74,36



$$y = 0,3392x + 28,202$$

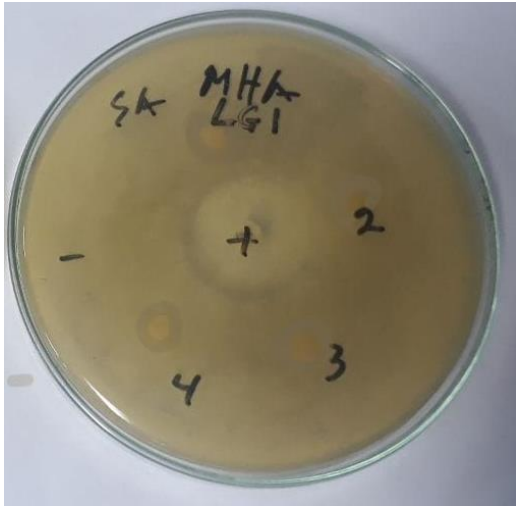
$$x = \frac{y - 28,202}{0,3392}$$

Untuk memperoleh nilai hambat 50% maka nilai (Y) = 50

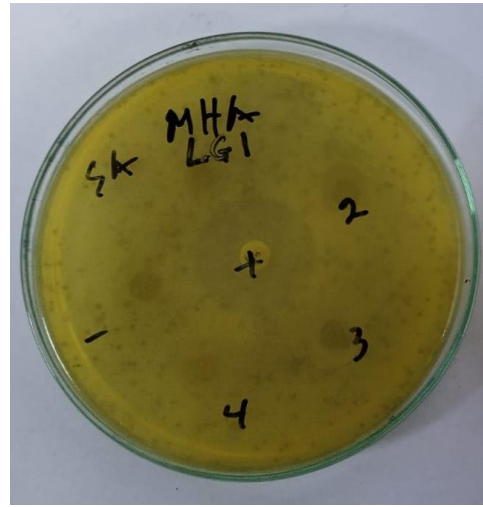
$$x = \frac{50 - 28,202}{0,3392}$$

$$x = 64,2629 \text{ jadi IC}_{50} = 64,2629 \text{ ppm}$$

Lampiran 25. Hasil Pengamatan Uji Antibakteri Enzim L-Glutaminase



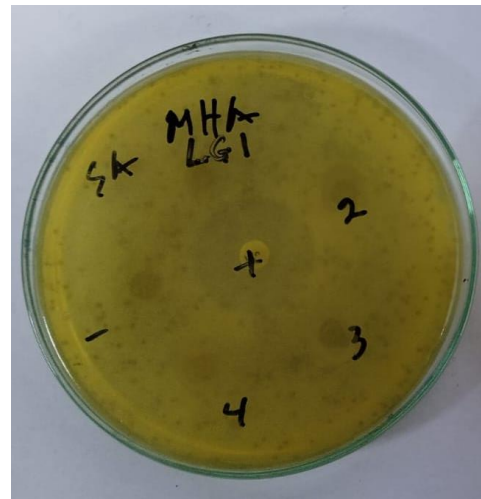
S. aureus (24 jam)



S. aureus (48 jam)



E. coli (24 jam)



E. coli (48 jam)

Diameter zona hambatan fraksi enzim L-glutaminase terhadap pertumbuhan *S. aureus* (I) dan *E. coli* (II) pada masa inkubasi 24 jam dan 48 jam

Keterangan: B1 : Fraksi enzim L-glutaminase F1
B2 : Fraksi enzim L-glutaminase F2
B3 : Fraksi enzim L-glutaminase F3
B4 : Ekstrak kasar enzim L-glutaminase

Lampiran 26. Dokumentasi



Larutan Standar NH₄Cl



Sonikator



Sentrifugasi hasil Shaker



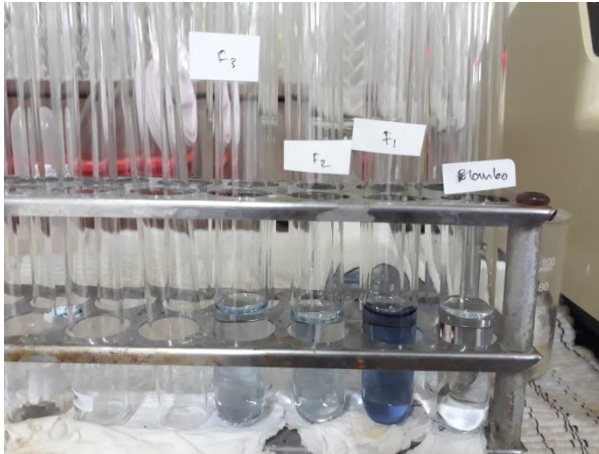
Uji aktivitas enzim hasil dialisis



Hasil Dialisis



Proses Dialisis



Pengukuran kadar protein hasil dialisis



Pengujian toksisitas fraksi enzim L-glutaminase