DAFTAR PUSTAKA

Abu-Tahon, M.A dan Isaac, G.S., 2016, Purifcation and characterization of new alkaline L-methioninase from Aspergillus ustus AUMC 1051 grown under solid-state fermentation conditions, *Egypt J Bot*, **56**:785–798

Ahmad, A., Patta, A.M., dan Natsir, H., 2013, Immobilization and Characterization of L-Asparaginase from The Thermophilic Bacteria *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a, Internation Jorunal of Pharma and Bio Sciences, **4**: 155-162.

Alrumman, S.A., Mostafa, Y.S., Al-izran, K.A., Alfaifi, M.Y., Taha, T.H., dan Elbehairi, S.E., 2019, Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia, *Scientific Reports*, **9**(3756): 1-14.

Alshehri, W.A., 2020, Bacterium *Hafnia alvei* secretes L-methioninase enzyme: Optimization of the Enzyme secretion conditions, *Saudi Journal Biology Science*, 27: 1222-1227.

Alzahrani, Z., 2009, *Salting Out and Dialysis of Proteins*, Departement of Biochemistry of Science KSU.

American Cancer Society, American Cancer Society, American Cancer Society, Georgia, (online), 2015, (www.cancer.org diakses pada 24 Juni 2022)

Anggadiredja, J.T., Zatnika, A., Purwoto, H., dan Istini, S., 2009, *Rumput Laut*, Penebar Swadaya, Jakarta.

Anggraini, R., Aliza, D., dan Melissa, S., 2016, Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan Uji Mikrobiologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Dibudidayakan di Kecamatan Baitussalam Kabupaten Aceh Besar, *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikanan Unsyiah*, **1**(2): 270-28.

Anggraini, M., Swantara, I.M.D., dan Sukadana, I.M., 2021, Toksisitas Ekstrak dan Isolat Rumput Laut *Eucheuma Spinosum*, *Cakra Kimia (Indonesian E-journal of Applied Chemistry)*, **9**(1): 35-41.

Antriana, N., 2014, Isolasi bakteri asal saluran pencernaan rayap pekerja (*Macrotermes* sp.), *Jurnal Saintifika*, **16**(1): 18-28.

Aras, T.R., 2013, Uji Toksisitas Terhadap Teripang *Holothuria scabra terhadap Artemia salina*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Arif, M.S., 2019, Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Kasar Metanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Variasi Metode Pengeringan dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Azizah, L.N., 2016, Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma Spinosum*), Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Malang.

Berhimpon, S., 2001, Industri pangan hasil bernilai tinggi (*Valuable Commodities*) salah satu unggulan agroindustry Sulawesi Utara, Makalah yang dipresentasikan pada seminar Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI) Manado, 25 Januari 2001.

Bopaiah, B.B.K., Kumar, D.A.N., Balan, K., Dehingia, L., Reddy, M.K.R.V., Suresh, A.B., dan Nadumane, V.K., 2020, Purification, characterization, and antiproliferative activity of L-methioninase from a new isolate of *Bacillus haynesii* JUB2, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **10**(10): 54-61.

Bonnarme, P., Psoni, L., dan Spinnler, H.E., 2000, Diversity of Lmethionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12): 5514–5517.

Colegate, S.M. dan Molyneux, R.J., 2007, *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*, CRC Press, Prancis.

CLSI, 2017, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, *27th Edition, CLSI Supplement M100*, Clinical and Laboraroty Standards Institute, Pennsylvania.

Desai, S.S., Chopra, S.J., dan Hungund, B.S., 2016, Production, Purification and Characterization of L-Glutaminase from *Streptomyces* sp. Isolated from Soil, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **6**(07): 100-105.

Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Sulawesi Selatan, 2017, Komoditas Unggulan Rumput Laut, Dinas Kelautan dan Perikanan Sulawesi Selatan (online), panel.sulselprov.go.id/pages/komoditas-unggulan-rumput-laut.

Direktorat Jenderal Pengelolaan Ruang Laut, 2020, Konservasi Perairan sebagai Upaya menjaga potensi kelautan dan perikanan Indonesia oleh Oki Pratama (online), kkp.go.id/djprl/artikel/21045-konservasi-perairan-sebagai-upaya-menjaga-potensi-kelautan-dan-perikanan-indonesia.

Doyle, A., Griffiths, J.B., dan Newell, D.G., 2000, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Edisi Ketiga, John Wiley and Son Incoorporation New York, Halaman 23–24.

Egan, S., T. Harder., C. Burke., P. Steinberg/. S. Kjelleberg and T. Thomas., 2013, The Seaweed Holobiont: Understanding Seaweed-Bacteria Intractions, *FEMS Microbiologi Rev* **37**(3): 462-467.

El-Sayed, A.S.A, 2011, Purification and Characterization of a New L-Methioninase from Solid Cultures of *Aspergillus flavipes*, 2011, *The Jorunal of Microbiology*, **49**(1): 130-140.

El-Sayed A.S., Shouman S.A., Nassrat H.M., 2012, Pharmacokinetics, immunogenicity, and anticancer efficiency of *Aspergillus flavipes* L-Methioninase, *Enzyme Microb Technol*, **51**(4): 200-210.

Finkelstein J.D., 1990, Methionine metabolism in mammals, *Journal Nutri Biochem*, **1**(5): 228-237.

Fitri, L. dan Yasmin, Y., 2011, Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri kitinolitik, *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi Edukasi*, **3**(2): 20-25.

Funty, 2015, Potensi Antibakteri dari Ekstrak Kasar Bakteri Asosiasi Karang Batu yang Terinfeksi Penyakit *Brown Band* (BrB) Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, Skripsi tidak diterbitkan, Universitas Hasanudin, Makasar

Freshney, I.A., 2000, *Culture Of Animal Cells, A Manual of Basic Technique.* Edisi IV, Willey-Liss, Toronto. Halaman 329–344.

Fridlender dkk, 2015, Plant derived substances with anti-cancer activity A new trend, that involved the isolation of plant active, *Frontiers in Plant Science*, **6**(1): 7991.

Ganiswarna, S.G., 1995, *Farmakologi dan Terapi*, *Edisi 4*, UI-Fakultas Kedokteran, Jakarta.

Handayani, D., Yulia, M., dan Allen, Y., 2012, Isolasi Senyawa Sitotoksik Dari Spons Laut Petrosia Sp., *JPB Perikanan*, **7**(1): 69–76.

Handayani, K., Ekowati, C.N., dan Pakpahan, M., 2013, *Karakterisasi fisiologi dan pertumbuhan isolat bakteri Bacillus thuringiensis dari tanah naungan di lingkungan Universitas Lampung*, Seminar Nasional Sains dan Teknologi V, Lembaga Penelitian Universitas Lampung, Lampung.

Harahap, D.G.S., Noviantari, A., Hidana, R., Yanti, N.A., Nugroho E.D., Nurdyansyah F., Widyastuti, D.A., Khairi, Pratiwi, R.H., Nendissa, D.M., Nendissa, S.J., Nurmalasari A., Noer, S., Watuguly, T.W., Setyowati, E., dan Estikomah, S.A., 2021, *Dasar-dasar Mikrobiologi dan Penerapannya*, Widina Bhakti Persada Bandung, Bandung.

Hu, J. dan Cheung, N.K.V., 2010, Methionine depletion with recombinant methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutics drugs, *Int. J. Cancer*, **124**(7): 1700-1706.

Iswari, R.S. dan Yuniastuti, A., 2006, *Biokimia*, Graha Ilmu, Yogyakarta.

Kasim, M., 2016, *Makro Alga*, Penebar Swadaya, Jakarta.

Kavya, D. dan Nadumane, V.K., 2020, Identification of Highest L-Methioninase Enzyme Producers among Soil Microbial Isolates, with Potencial Antioxidant and Anticancer Properties, *Journall of Applied Biology & Biotechnology*, **8**(6): 21-27.

Kementerian Luar Negeri (kemenlu) RI, 2021, Potensi Rumput Laut Indonesia (online), Kementerian Luar Negeri RI, kemlu.go.id/Maputo/id/news/11741/potensi-rumput-laut-indonesia.

Kementerian Kelautan Perikanan (KKP), 2018, *Profil Peluang Investasi Komoditas Rumput Laut*, Direktorat Usaha dan Investasi Gedung Mina Bahari-3, Jakarta.

Khalaf, S.A. dan El-sayed, A.S.A., 2009, L-methioninase production by filamentous fungi: I-screening and optimization under submerged conditions, *Curr Microbiol*, **58**(3): 219-226.

Krishnaraju, A.V., Rao, T.V., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H-S., dan Subbaraju, G.V., 2006, Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia sal ina*) Lethality Assay, *International Journal of Applied Science and Engineering*, **3**(2):125 – 135.

Kusuma, S.A.F., 2009, *Uji Biokimia Bakteri*, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran.

Lieu, E.L., Nguyen, T., Rhyne, S. dan Kim, J., 2020, Amino acids in cancer, *Exp Mol Med*, **52**(1): 15-30.

Long, R. A., and Azam, F., 2001, Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria, *Appl Environ Microbiol*, **67**(11): 4975-4983.

Lumantouw, Rondonuwu dan Singkoh, 2013, Isolasi dan identifikasi bakteri yang toleran terhadap fungisida mankozeb pada lahan pertanian tomat di Desa Tempok, Kecamatan Tompaso, Sulawesi Utara, *Jurnal Bios Logos*, **3**(2): 73-77.

Magdalena, M.M., 2014, *Penyebab Kanker yang Harus Diwaspadai*, Diunduh pada tanggal 24 Juni 2022 dari http://www.deherba.com/penyebab-kanker-yang-harus-diwaspadai.html.

Mahmudah, R., Baharuddin, M., dan Sappewali, 2016, Identifikasi Isolat Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Lejja, Kabupaten Soppeng, *Al-kimia*, **4**(1): 31-42.

Manukhov, I.V., Mamaeva, D.V., dan Morozova, E.A., 2006, L-methionine γ-lyase from *Citrobacter freundii*: cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme, *Biochemistry*, **71**(4): 361–369.

Marliza, H., Nurliyasman, Haryani, R., dan Lestari, V., 2022, Pre-eliminary Studi Aktivitas Sitotoksik Biota Laut Pantai Sekilak Batam terhadap Larva Udang (*Artemia salina Leach*), *Jurnal Katalisator*, **7**(1):115-124.

Masri, M., Nur, F., Widodo, J., Jusuf, E., Sahar, W., Wahida, N., Risnawati, R., Nurbaya, S., Asri, T.A., dan Fadly, N., 2022, a Novel L-asparaginase from the Symbiotic *Enterobacter aerogenesis* Isolate from *Eucheuma* sp., *Journal of Food and Processing and Preservation*, **46**(1): 1-11.

McLaughlin, J.L., 1998, Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality, Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination, *Methods in Plants Biochemistry*, **6**(1): 1-30.

Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., dan McLaughlin, J. 1982, *Brine Shrimp*: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Medica*, **45**(5): 31-34.

Mohkam, M., Taleban, Y., Golkar, N., Berenjian, A., Dehshahri, A., Mobasher, M.A., dan Ghasemi, Y., 2020, Isolation and Identification of Novel L-Methioninase Producing Bacteri and Optimization of its Production by Experimental Design Method, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **26**(2020): 1-7.

Monajati, M., Borandeh, S., Hesami, A., Mansouri, D., dan Tamaddon, A. M. , 2018, Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies, *Chemical Engineering Journal*, 354: 1153–1163.

Msuya, F.E., 2011, The impact of seaweed farming on thr socioeconomic status of coastal communities in Zanibar, Tanzania, *World Agriculture*, **42**(3): 45-48.

Muaja, A.D., Koleangan, H.S.J., dan Runtuwene, M.R.J., 2013, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi, *Jurnal MIPA*, **2**(2), 115.https://doi.org/10.35799/jm.2.2.2013.3 000.

Nofiani, R., 2008, Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut, *Jurnal Natur Indonesia*, **10**(2): 120-125.

Nurhaedar, 2008, Potensi Bakteri Simbion Spons Class Demospongiae sebagai Sumber Senyawa Antimikroba, Makalah Poster Seminar Nasional Persatuan Biologi Indonesia Ke–XIX, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Nurvita, N., 2019, Studi In Vitro Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion Alga Merah *Eucheuma Cottonii* sebagai Antibakteri dan Antikanker, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Nuryanti, 2019, *Pengaruh Induser (Maltosa), pH, dan suhu terhadap produksi dan Karakterisasi Enzim α-Amilase dari Isolat Bakteri Termofil Bacillus sp. 52B2$_3$ Sumber Air Panas Teluk Jailolo Maluku Utara*, Skripsi Tidak diterbitkan, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Parwata, I.M.O.A., 2014, Bahan Ajar Kanker dan Antikanker, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Udayana, Denpasar.

Perez-Matos, A.E., Rosado, W., dan Govind, N.S., 2007, *Bacterial Diversity Associated with the Caribbean Tunicate Ecteinascidia turbinata*, Department of Marine Sciences University of Puerto Rico, **92**(2): 155-164.

Petczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 2010, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta.

Pinnamaneni R., Gangula S.R., Koona S., dan Potti R.B., 2013, Isolation, screening, and assaying of methioninase of *Brevibacterium linen*, *Int. J. Science Nature*, 3:773-779.

Poedjiadi, A., 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.

Proksch, P., Edrata, R.A., and Ebel, R, 2003, Drugs from the sea- current status and microbiological implication. Appl. *Microbiol. Biotechnol*, **59**(3): 125-134.

Putra, D.R., Mulyadi, A., dan Zulkifli, 2021, *Toxicity of Sea Grass Extract* (*Eucheuma cottonii* and *Gracillaria* sp) to Larva *Artemia salina*, *Asian Journal of Aquatic Sciences*, **4**(2): 88-97.

Rahman S.N., Wahab N.A., dan Malek S.N., 2013, *In vitro* Morphological assessment of apoptosis induced by anti-proliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*, *Evid Based Camplement Alternative Med*, (**13**)1: 1-14.

Rahayu dan Gumilar, 2017, Uji Cemaran air minum masyarakat sekitar margahayu raya Bandung dengan identifikasi bakteri *Escherichia coli*, *IJPST*, **4**(2): 50-57.

Salim, N., Santhiagu, A., dan Joji, K., 2020, Purification, characterization and anticancer evaluation of L-methioninase from *Trichoderma harzianum*, *Biotech*, **10**(501): 1-15.

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

Sato, D., dan Nozaki, D.T., 2009, Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers, *IUBMB Life Journals*, **61**(11): 1019-1028.

Selim, M.H., Elshikh, H.H., El-hadedy, D.E., Saad, M.M., Eliwa, E., dan Abdelraof, M., 2015, L-methioninase from Some *Streptomyces* Isolates I: Isolation, Identification of Best Producers and Some Properties of the Crude Enzyme Produce, *Journal of Generic Engineering and Biotechnology*, **15**(13): 129-137.

Sharma, B., Singh, S., dan Kanwar, S.S., 2014, L-methioninase: a therapeutic enzyme to treat malignancies, *BioMed Research International*, **14**(1): 1-13.

Tan, Y., Sun, X., Xu, M., An, Z., Tan, X., Tan, X., Han, Q., Miljkovic, D.A., Yang, M., dan Hoffman, R.M., 1998, High Expression, purification, and

properties of recombinant homocysteine alpha, gamma-lyase, *Protein Expression and Purification,* **141**(4): 535-544.

Tanaka, H., Esaki, N., Yamamoto, T., Soda, K., 1976, Purification and Properties of Methioninase from *Pseudomonas ovalis*, *FEBS Lett*, **66**(2): 307-311

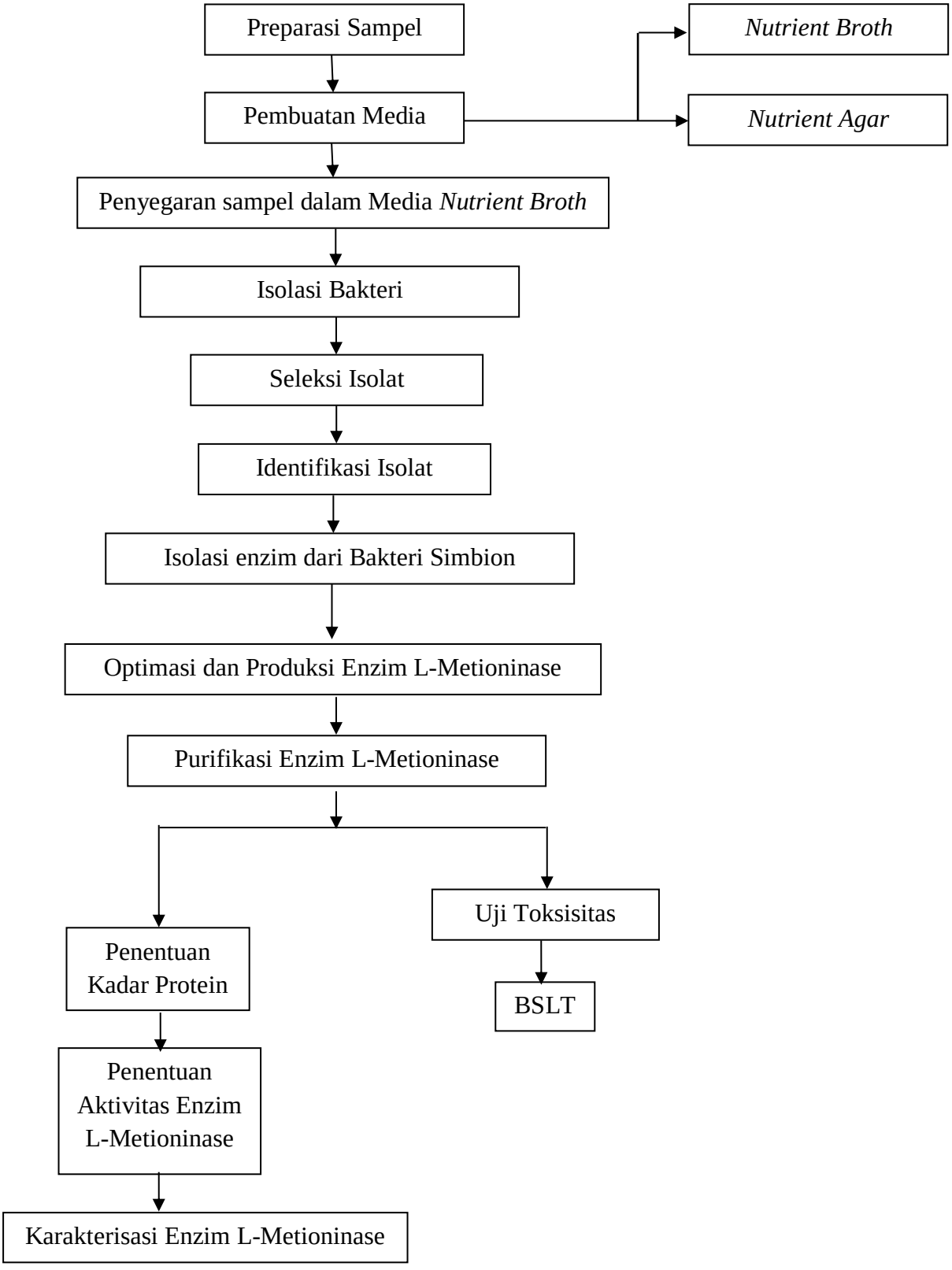
Tanaka, H., Esaki, N., Soda, K., 1985, A Versatile Bacterial Enzyme: L-methionine γ-lyase, *Enzyme and Microbial Technology*, **7**(11): 530-537.

Ummamie, 2017, Isolasi dan identifikasi *Escherichia coli* dan *Staphhylococcus aureus* pada keumamah di Pasar tradisional Lambaro, Aceh Besar, *JIMVET*, **1**(3): 574-583.

Villarreal-Gómez, L. J., Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas and Ayala-Sánchez, N. E., 2010, Antibacterial and Anticancer Activity of Seaweeds and Bacteria Associated with Their Surface, *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **45**(2): 267-275.

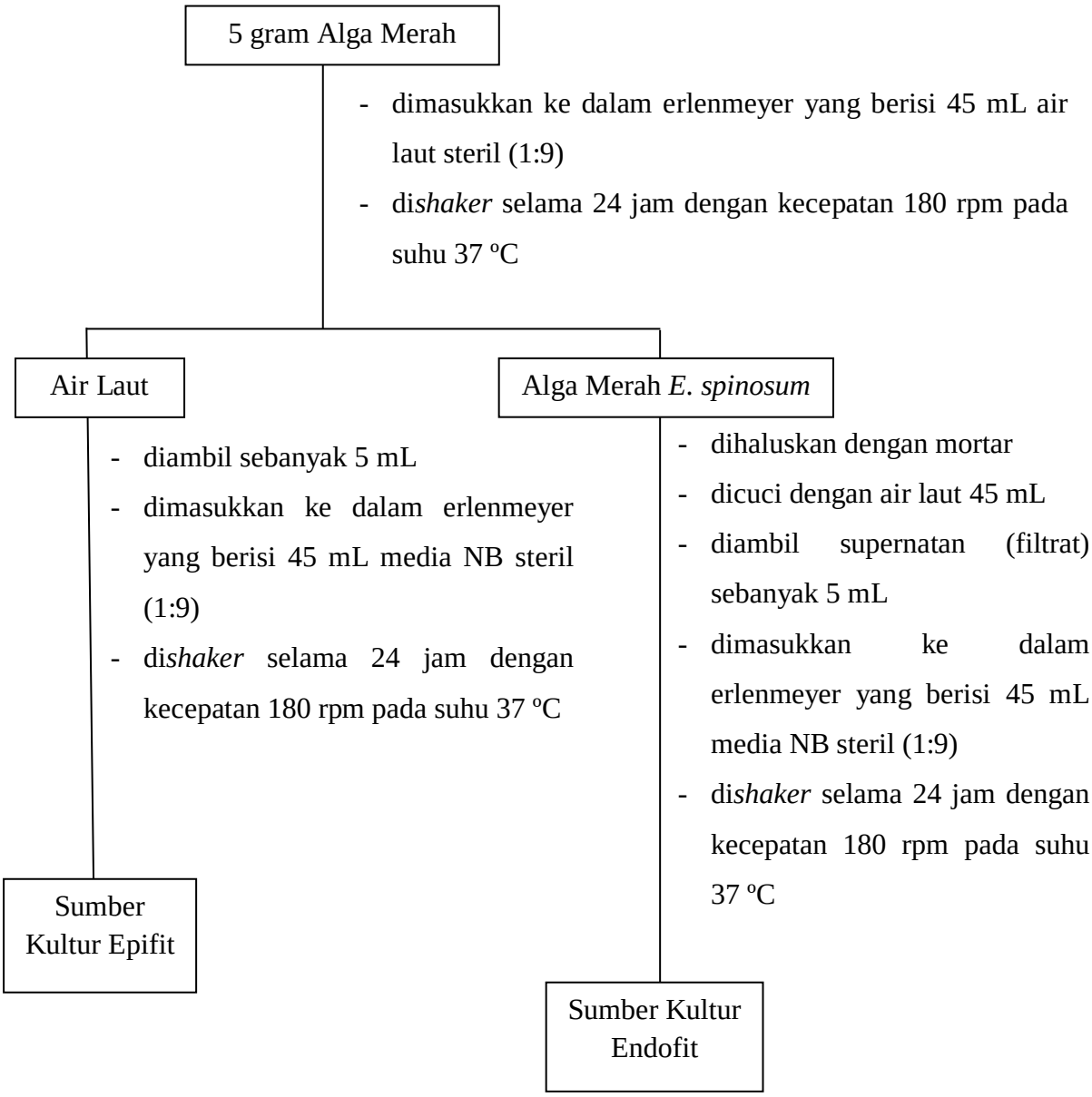
WHO in International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Obsevatory of Breast Cancer 2020, (diakses 24 Juni 2022). Tersedia dari : https://gco.iarc.fr/today/data/ factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



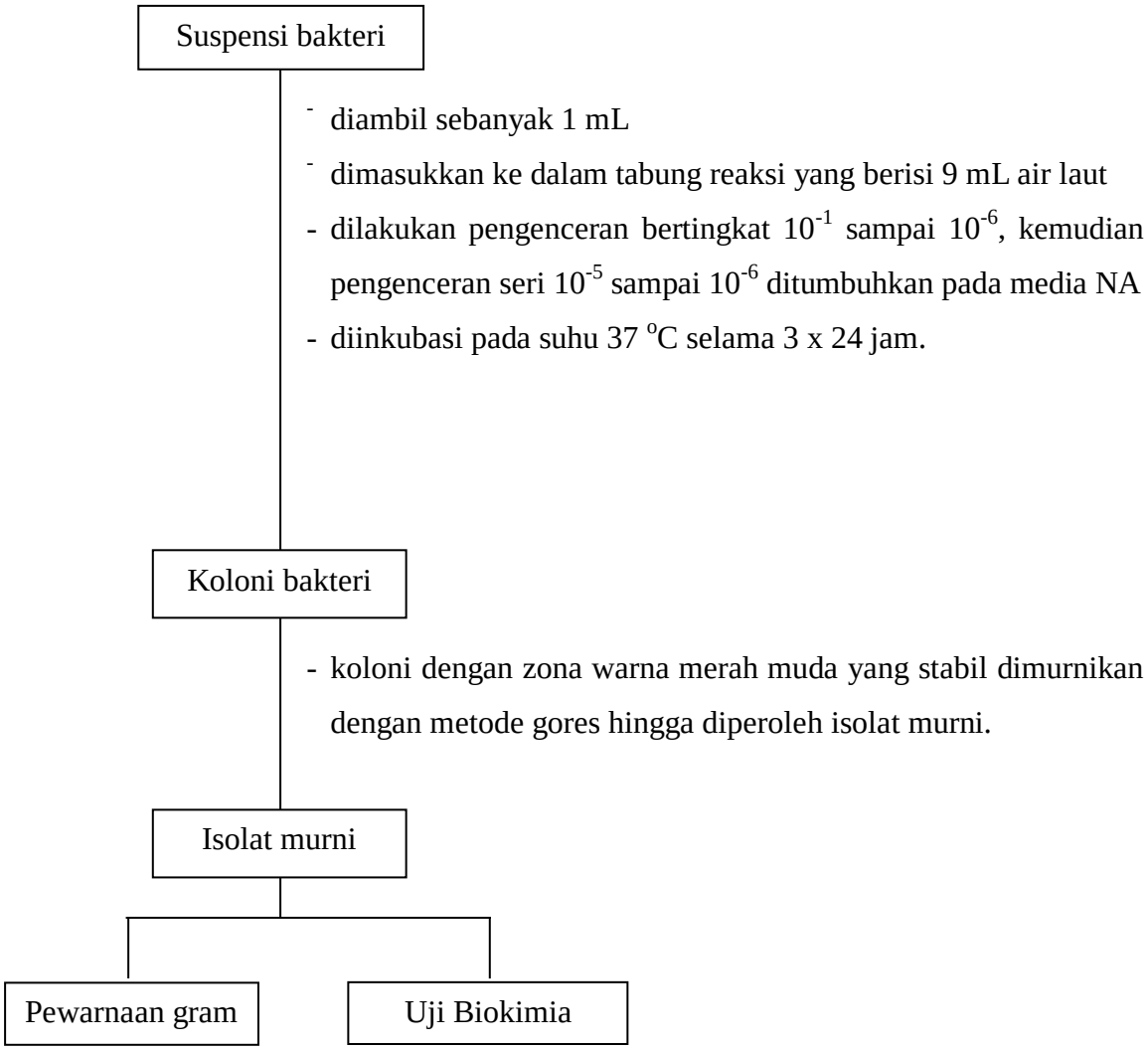
Lampiran 2. Bagan Kerja

A. Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth*

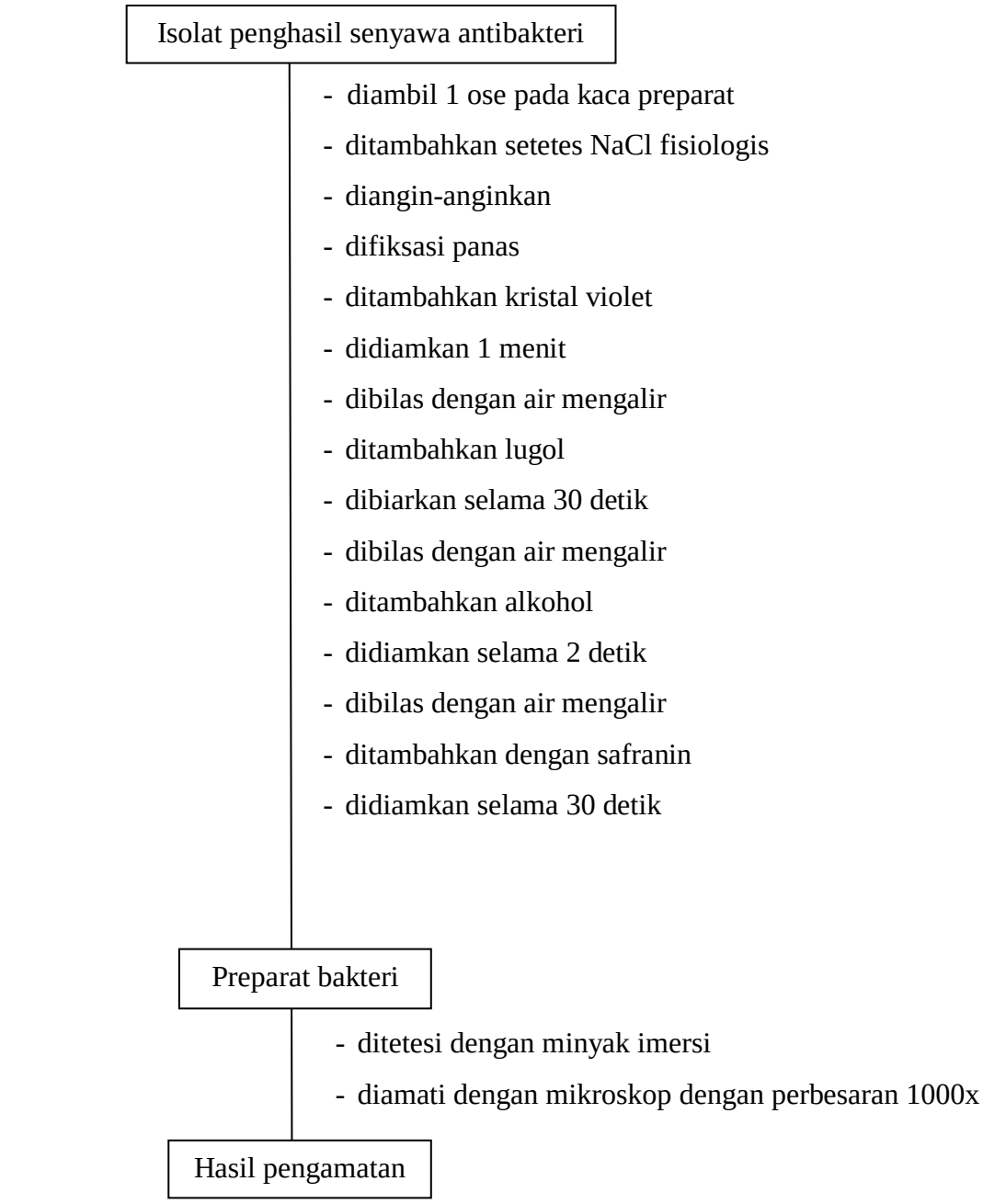


B. Isolasi dan Identifikasi Spesies Bakteri Simbion dari Alga Merah (*E. spinosum*) penghasil L-Metioninase

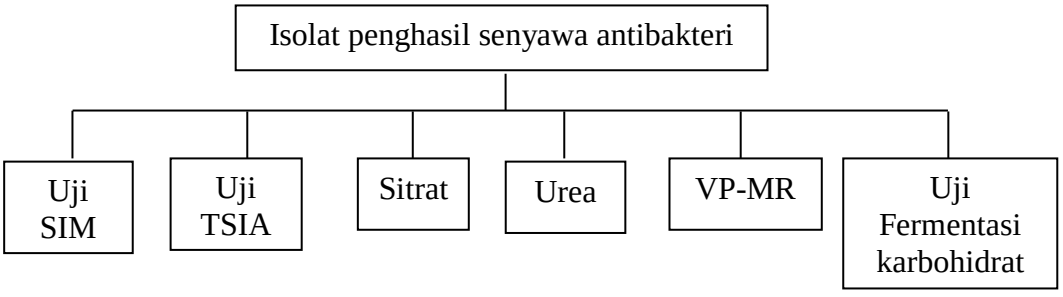
a. Isolasi Bakteri



b. Pewarnaan Gram



c. Uji Biokimia



C. Optimasi Produksi Optimum L-metioninase dalam Medium Produksi

Isolat murni

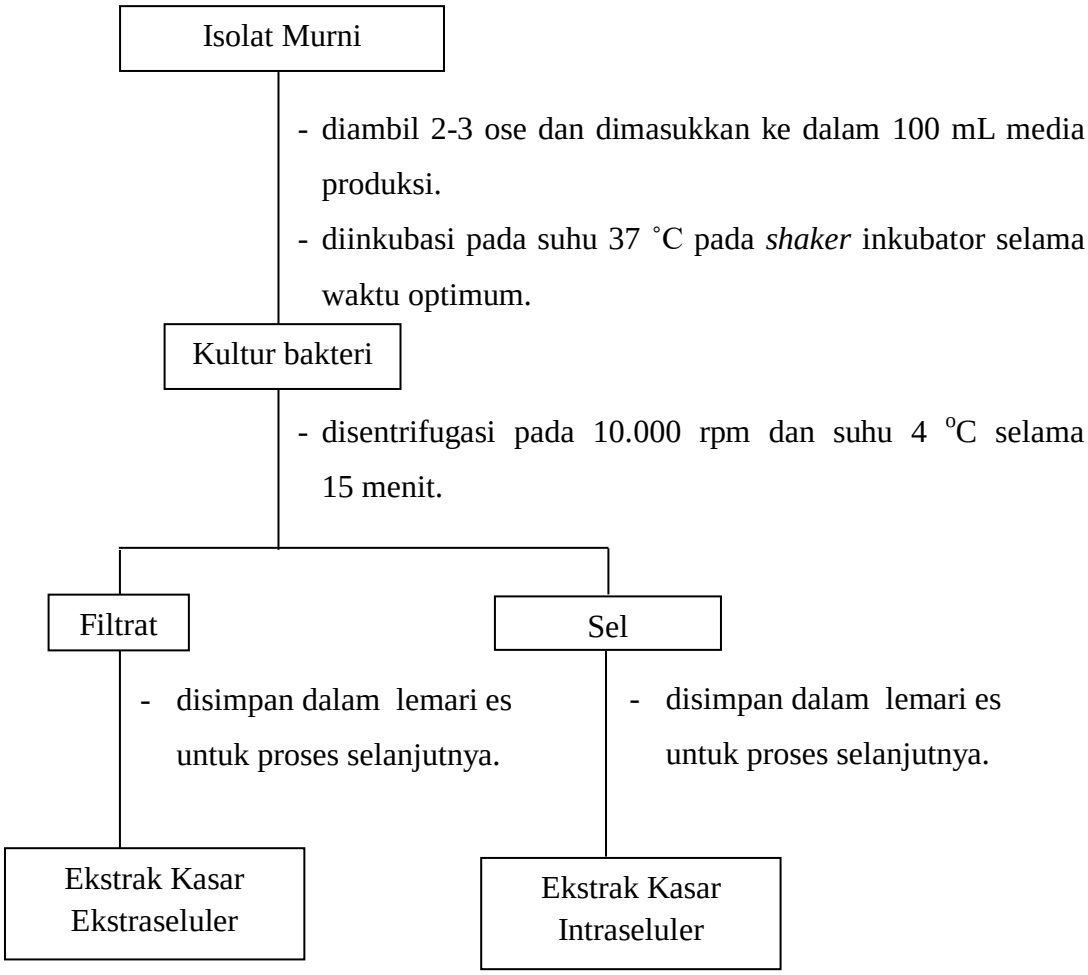
- diambil 1 ose
- dimasukkan ke dalam 100 mL media inokulum dengan konsentrasi substrat L-metionin 1 %
- diinkubasi dalam *shaker* inkubator pada 150 rpm suhu 37^{o}C selama 24 jam

Inokulum aktif

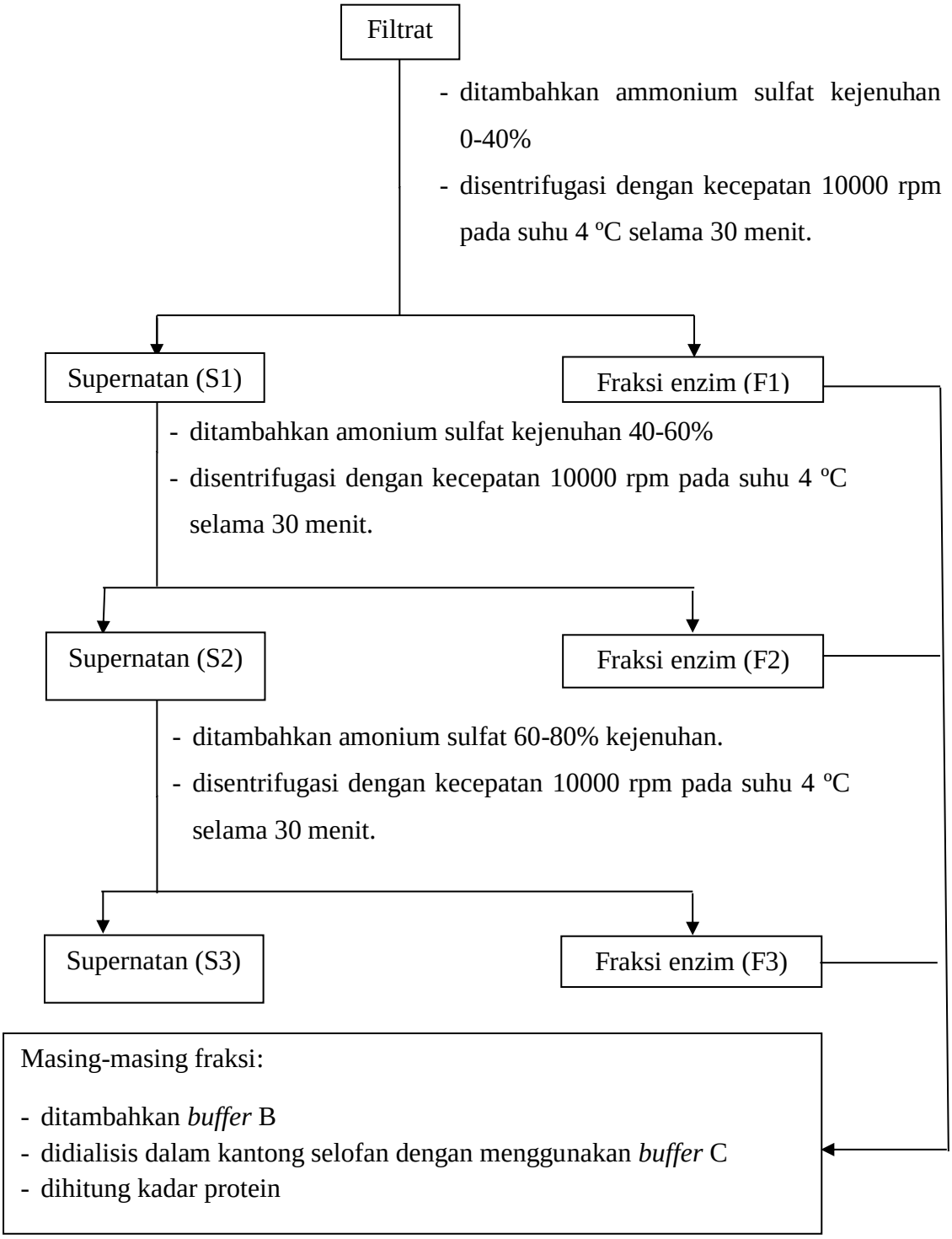
- dimasukkan ke dalam media produksi
- diinkubasi dalam *shaker* inkubator pada 150 rpm suhu 37 ^{o}C selama 3 hari
- dilakukan analisis *optical density* tiap 6 jam
- diukur kadar protein pada panjang gelombang 600-700 nm

Data

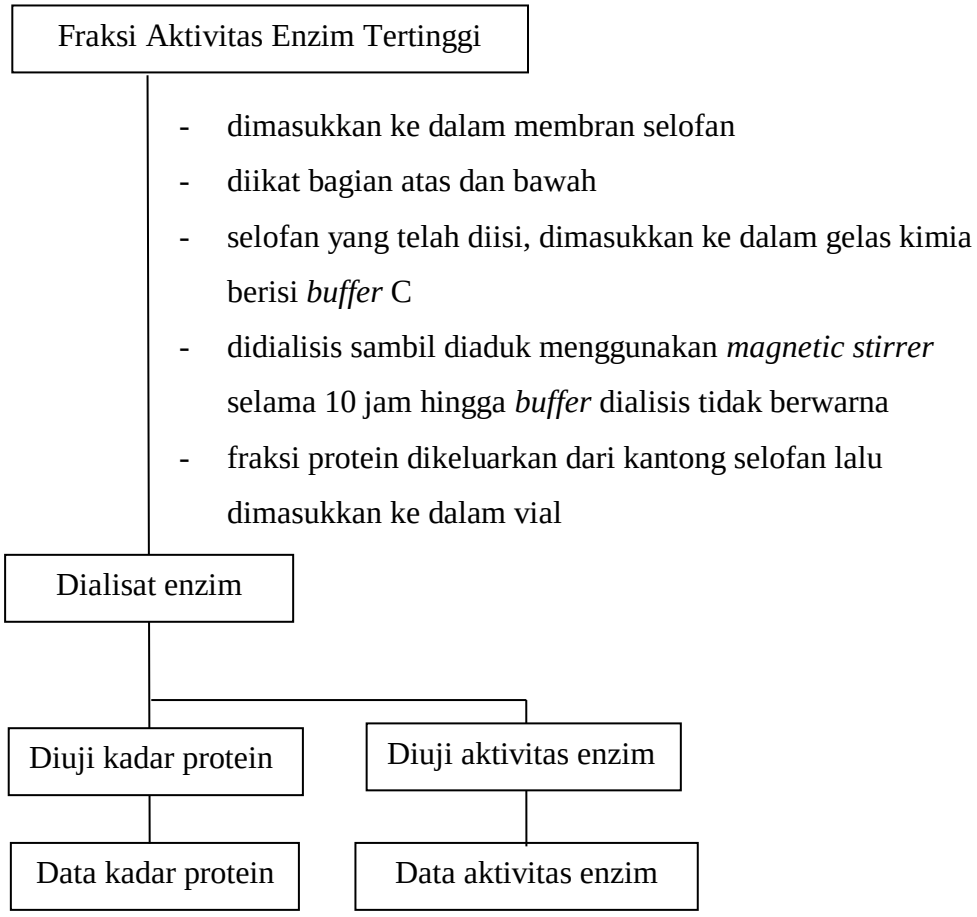
D. Produksi Enzim L-Metioninase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah (*E. spinosum*)



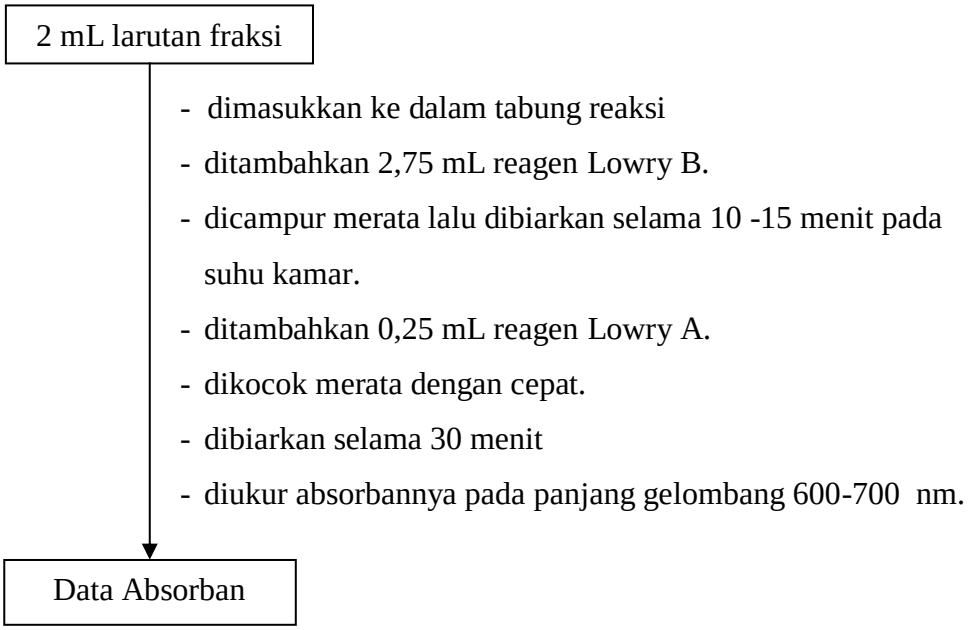
E. Bagan Kerja Fraksinasi Enzim L-Metioninase dengan $(NH_4)_2SO_4$



F. Dialisis


Fraksi Aktivitas Enzim Tertinggi
- dimasukkan ke dalam membran selofan
- diikat bagian atas dan bawah
- selofan yang telah diisi, dimasukkan ke dalam gelas kimia berisi *buffer* C
- didialisis sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 10 jam hingga *buffer* dialisis tidak berwarna
- fraksi protein dikeluarkan dari kantong selofan lalu dimasukkan ke dalam vial
Dialisat enzim
Diuji kadar protein
Diuji aktivitas enzim
Data kadar protein
Data aktivitas enzim

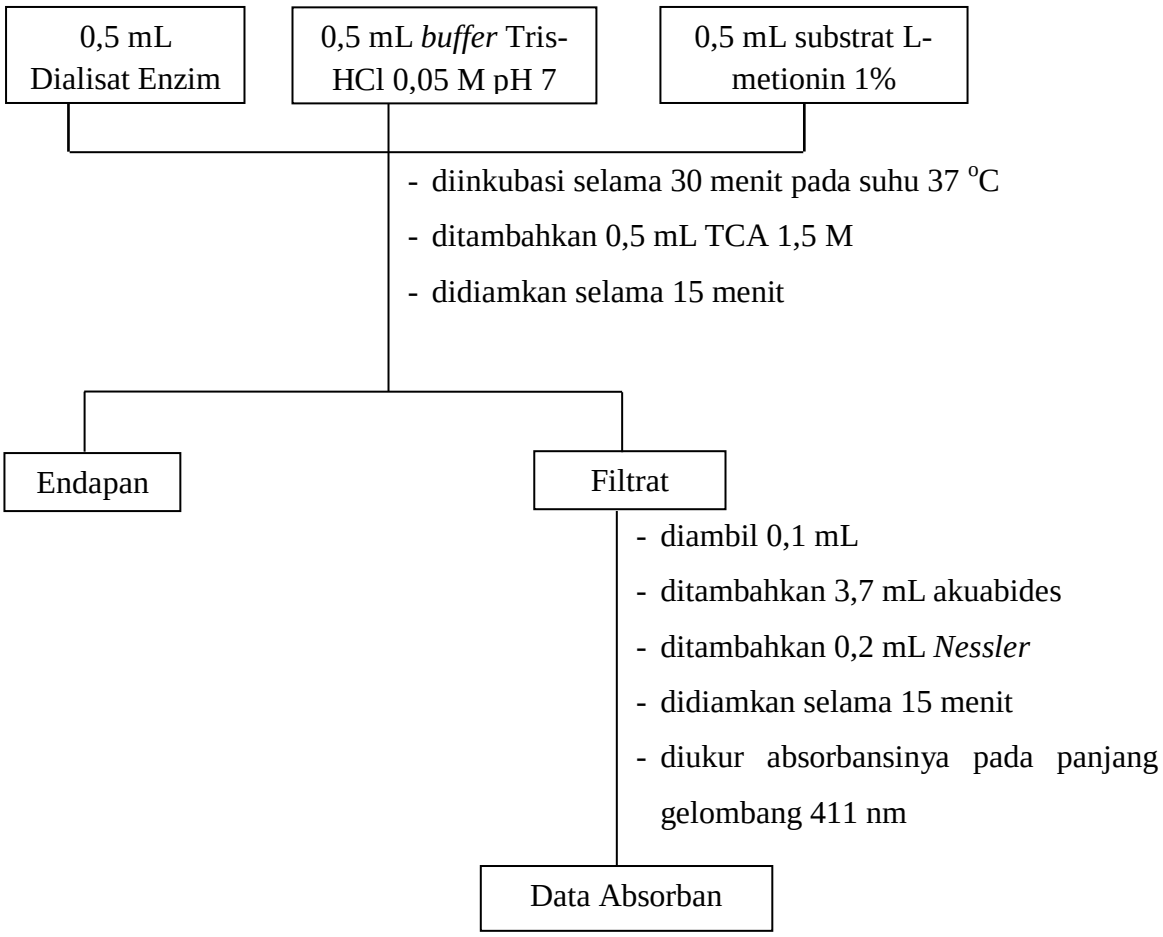
G. Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Lowry



Ket:

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

H. Penentuan Aktivitas Enzim L-Metioninase dengan Metode *Nessler*

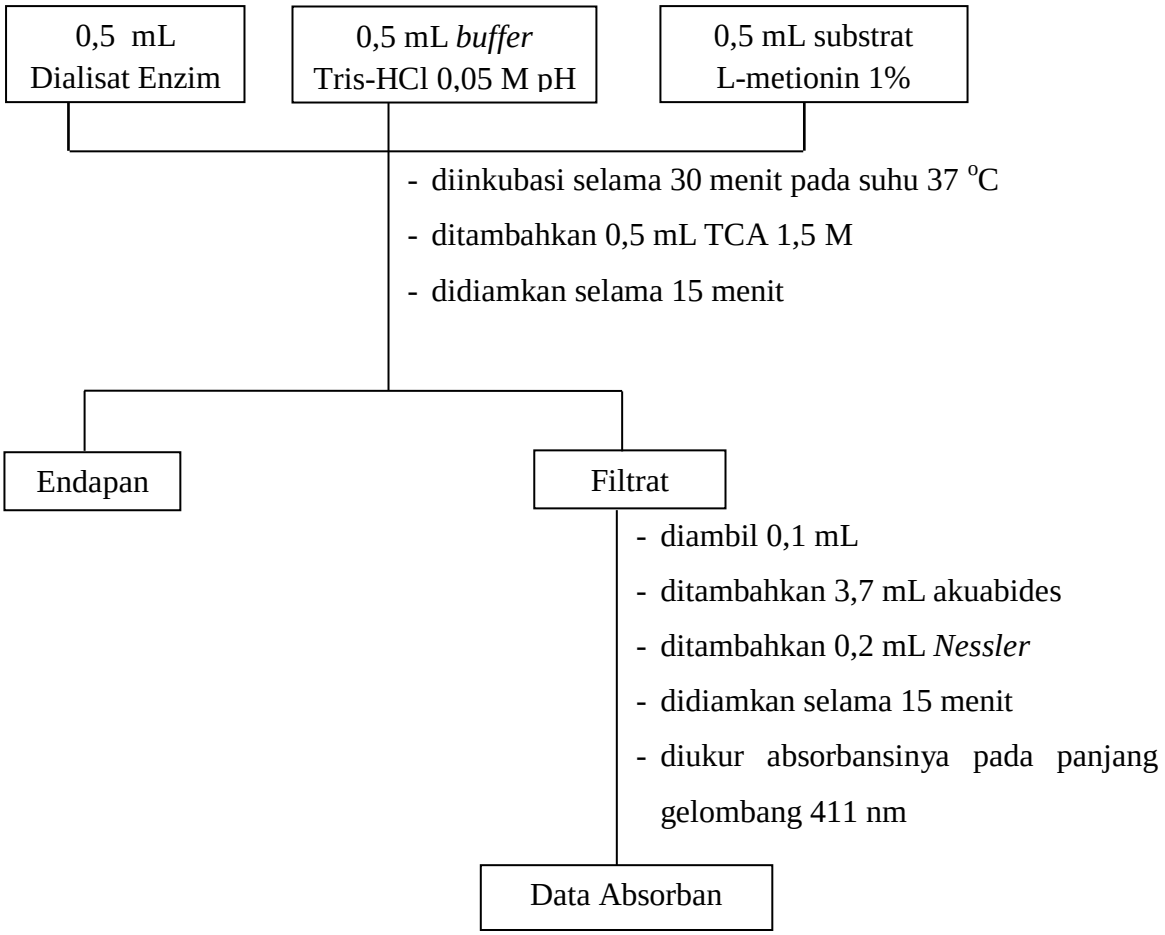


Ket:

- Dilakukan cara yang sama menggunakan standar NH_4Cl 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; dan 0,8 mg/mL dimulai dari tahap perlakuan filtrat
- Dihitung aktivitas enzim L-metioninase dari data absorbansi yang didapatkan

I. Skema Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Metioninase

a. Pengaruh Variasi pH terhadap Aktivitas Enzim L-Metioninase

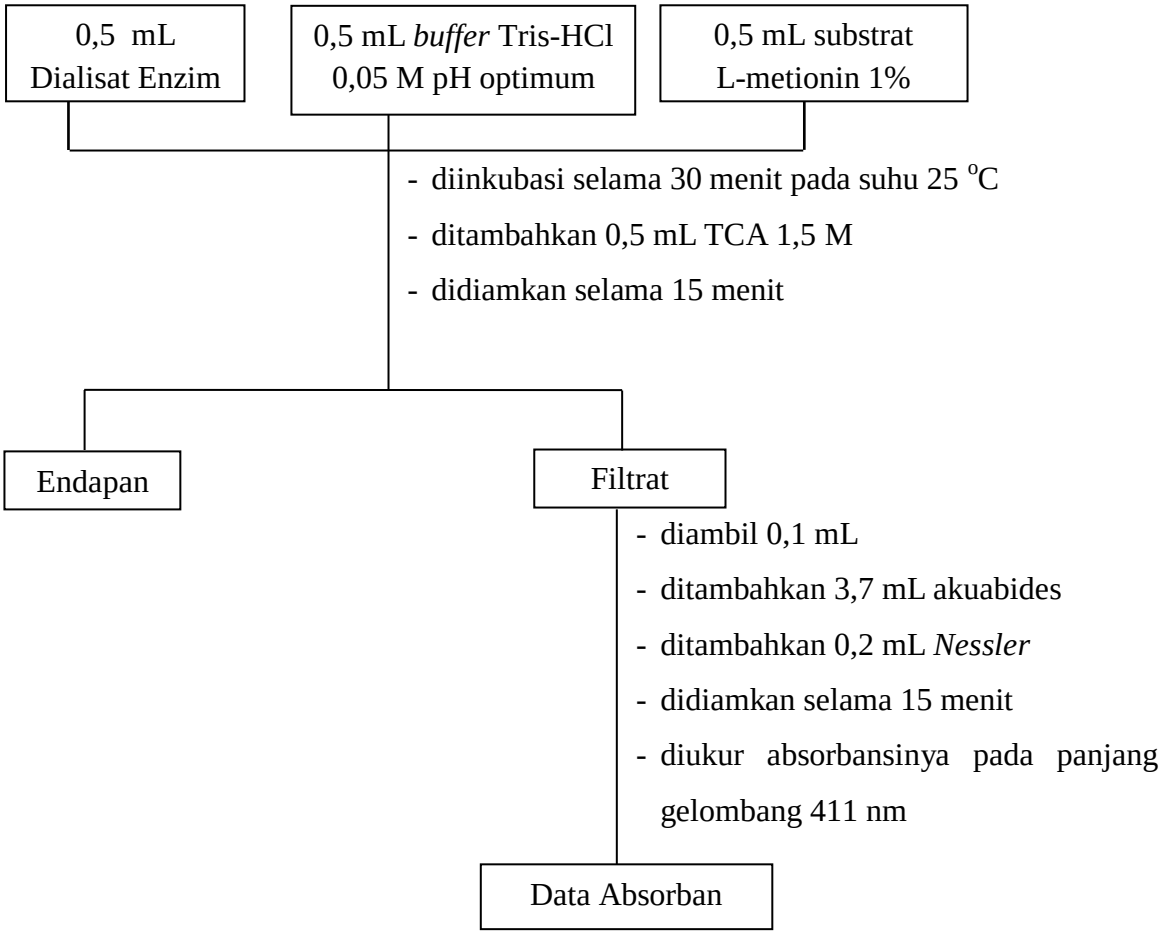


Keterangan:

- Dilakukan hal yang sama pada variasi pH 7, 8, 9 dan 10
- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y - b}{a} \text{ x } \frac{V_{total}}{V_{analisis}} \text{ x } \frac{1}{V_{enzim} \text{ x } t_{inkubasi}} \text{ x fp}$$

b. Pengaruh Variasi Suhu terhadap Aktivitas Enzim L-Metioninase

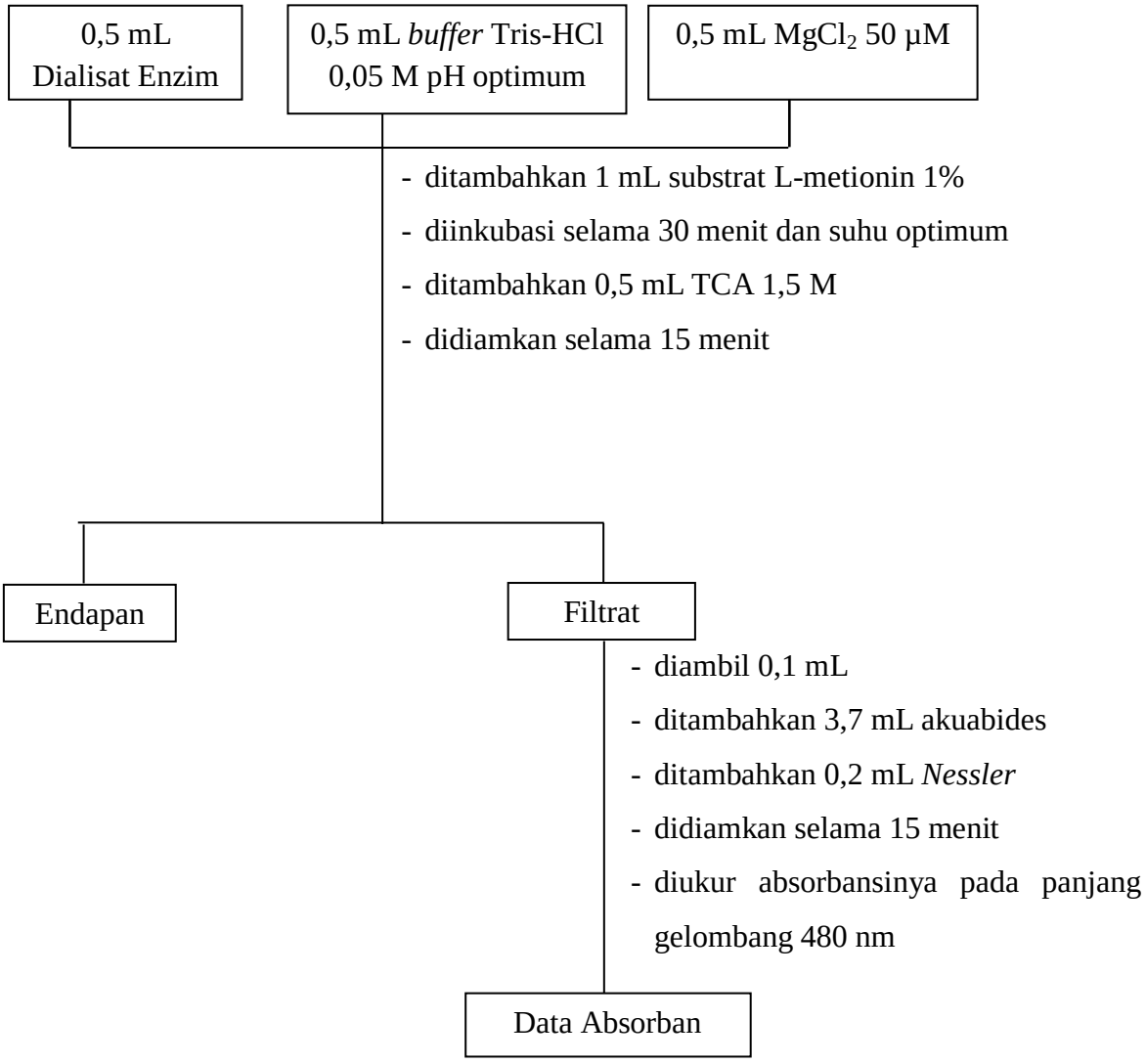


Keterangan:

- Dilakukan hal yang sama pada variasi suhu 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C dan 45 °C
- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y - b}{a} \text{ x } \frac{V_{total}}{V_{analisis}} \text{ x } \frac{1}{V_{enzim} \text{ x } t_{inkubasi}} \text{ x fp}$$

c. Pengaruh Variasi Penambahan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim L-metioninase

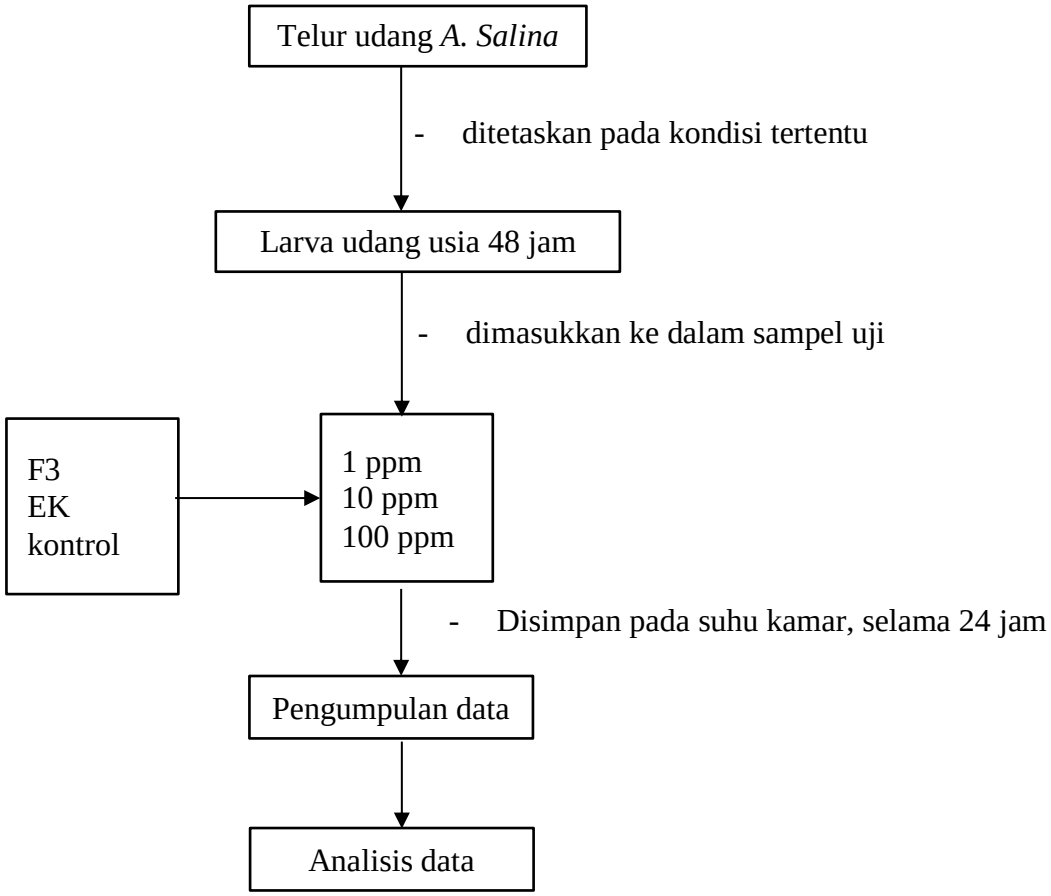


Keterangan:

- Perlakuan yang sama dilakukan untuk larutan blanko dan larutan kontrol
- Perlakuan yang sama dilakukan pada penambahan Cu^{2+}, Co^{2+} dan Mn^{2+} (masing-masing dengan konsentrasi 50 µM) .
- Dihitung aktivitas enzim dari data absorbansi yang didapatkan, dengan rumus:

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

J. Uji Sifat Toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

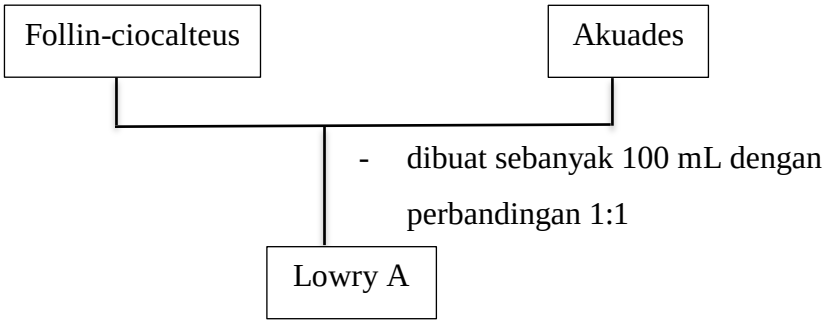


Keterangan:

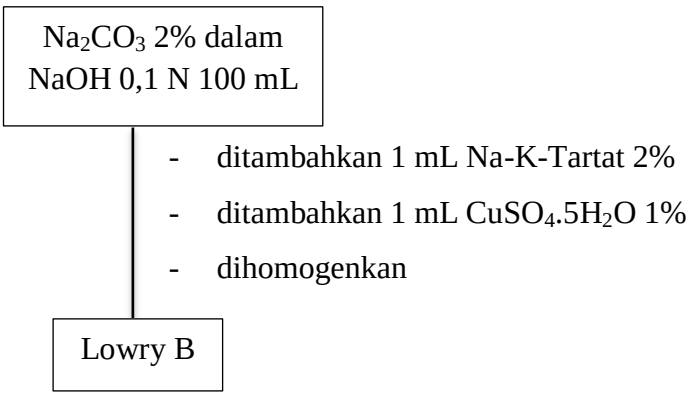
F3 = Fraksi protein kejenuhan 60-80%
EK = Ekstrak kasar

K. Penentuan Protein dengan Metode Lowry

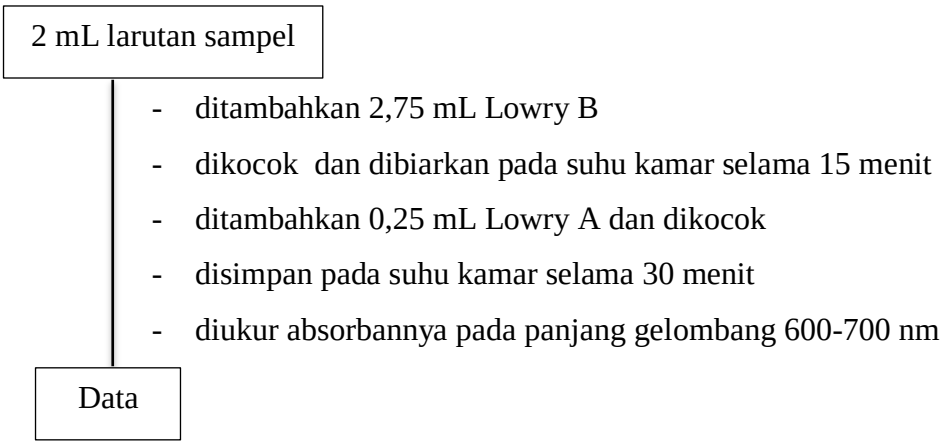
1. Lowry A



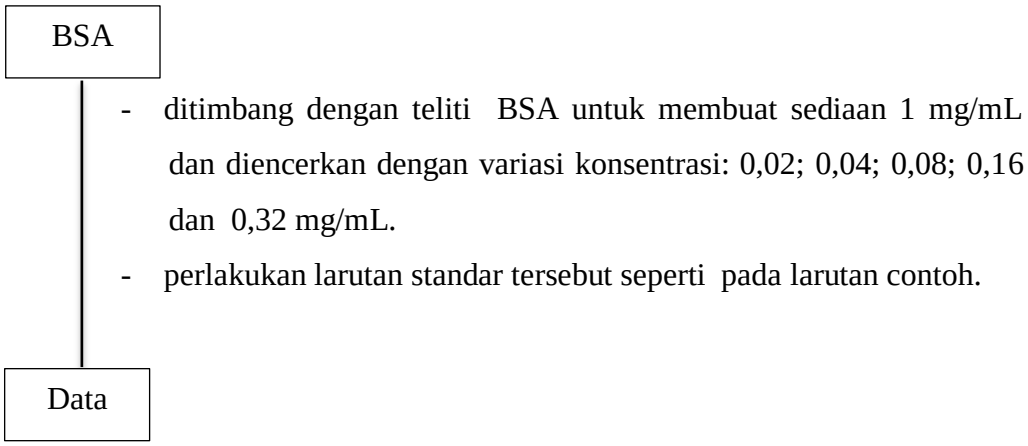
2. Lowry B



3. Larutan Contoh

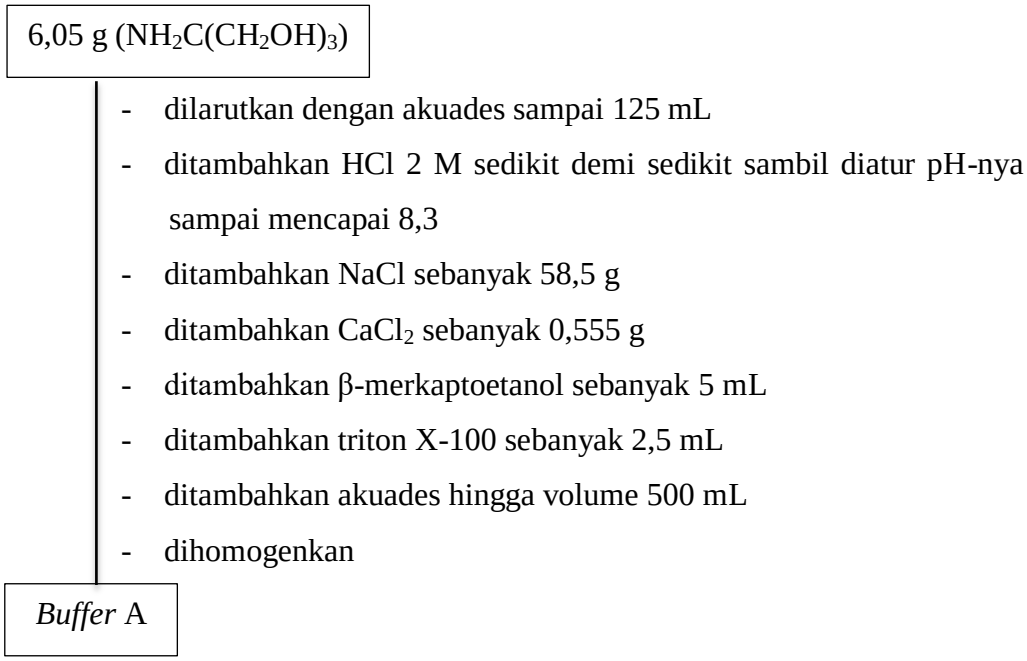


4. Larutan Baku

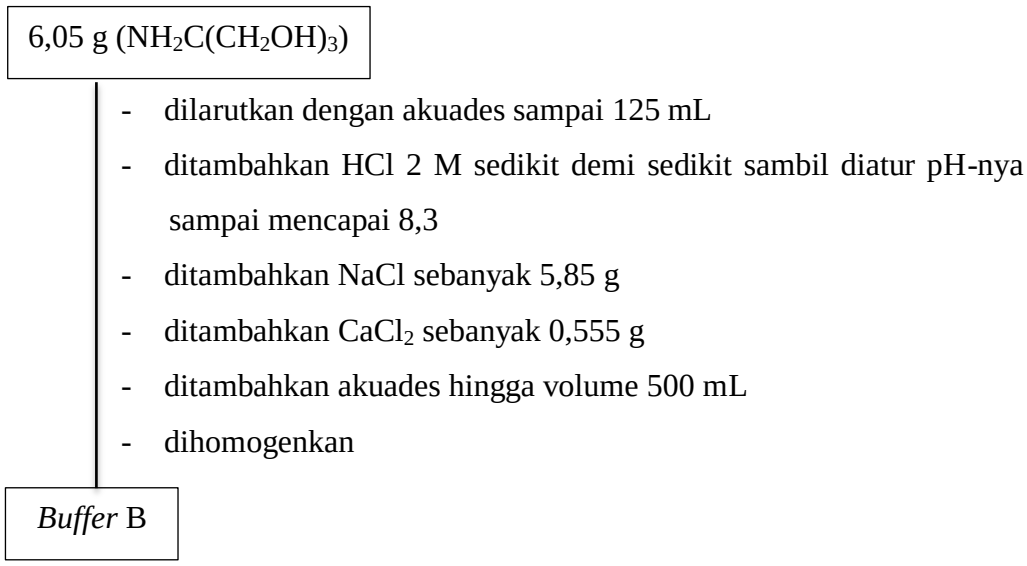


L. Pembuatan Larutan *Buffer* Tris-HCl

1. Larutan *Buffer* A



2. Larutan *Buffer* B



3. Larutan *Buffer* C

0,605 g ($NH_2C(CH_2OH)_3$)

- dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL
- ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pH-nya sampai mencapai 8,3
- ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 g
- ditambahkan $CaCl_2$ sebanyak 0,555 g
- ditambahkan akuades hingga volume 500 mL
- dihomogenkan

Buffer C

M. Pembuatan Reagen *Nessler*

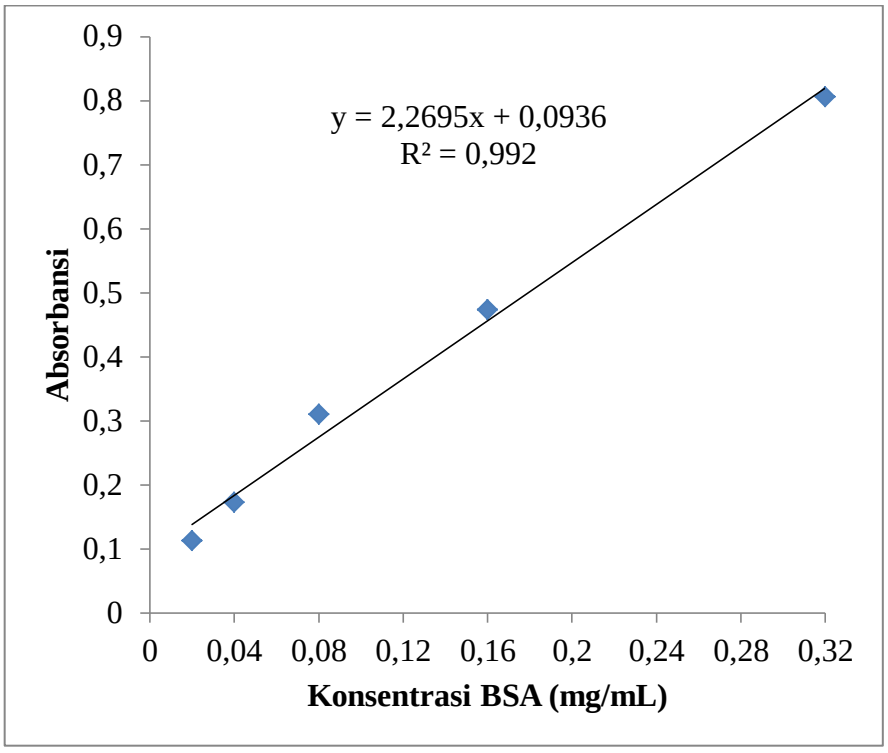
22, 4 g KOH

- dilarutkan dengan akuades hingga larut lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL.
- dilarutkan KI 10 g dalam 10 mL akuades.
- dilarutkan $HgCI_2$ 4 g dalam 100 mL akuades.
- dimasukkan campuran KI dan $HgCI_2$ ke dalam larutan NaOH dalam labu ukur 100 mL.
- Didekantasi semalaman hingga didapat cairan jernih

Stok Reagen *Nessler*

Lampiran 3. Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* pada λmax 660 nm

No	Konsentrasi BSA (mg/mL)	Absorbansi (λ 660 nm)
1	0	0
2	0,02	0,113
3	0,04	0,173
4	0,08	0,310
5	0,16	0,473
6	0,32	0,806



Lampiran 4. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein dan Aktivitas Enzim dari Bakteri Simbion dan *Optical Density* (OD)

No	Waktu Fermentasi (jam)	OD (λ 660 nm)	Absorbansi (λ 660 nm)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar Protein (mg/mL)	Absorbansi (λ 411 nm)	Aktivitas enzim (U/mL)
1	6	0,85	0,327	50	5,1421	0,409	19,6144
2	12	1,21	0,358	50	5,8250	0,542	25,7324
3	18	1,38	0,256	50	3,5778	0,604	28,5844
4	24	1,34	0,326	50	5,1201	0,619	29,2744
5	30	1,35	0,345	50	5,5386	0,614	29,0444
6	36	1,29	0,388	50	6,4860	0,518	24,6284
7	42	1,34	0,216	50	2,6966	0,879	41,2344
8	48	1,17	0,317	50	4,9217	0,421	20, 1664
9	54	0,806	0,388	50	6,4860	1,001	46,8464
10	**60**	**1,42**	**0,292**	50	**4,3710**	**1,115**	**52,0904**
11	66	0,995	0,294	50	4,4150	0,509	24,2144
12	72	0,835	0,312	50	4,8116	0,506	24,0764

Lampiran 5. Perhitungan Penambahan Amonium Sulfat pada Tahap Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

Fraksi Enzim	Fraksi (%)	Volume Filtrat (mL)	Bobot Ammonium Sulfat (g)
F0	Ekstrak Kasar	900	0
F1	0-40%	900	203,4
F2	40-60%	800	96
F3	60-80%	700	90,3

Penambahan Ammonium Sulfat:

a. 0-40% = 226 g x 900 mL/1000 mL= 203, 4 g

b. 40-60% = 120 g x 800 mL/1000 mL= 96 g

c. 60-80% = 129 g x 700 mL/1000 mL= 90,3 g

Lampiran 6. Tabel Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat

	S2																
	20	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	**55**	**60**	**65**	**70**	**75**	**80**	**85**	**90**	**95**	**100**
S1	**Garam amonium sulfat yang ditambahkan (gram)**																
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	305	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	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	210	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Lampiran 7. Pengukuran Kadar Protein Dialisat Enzim L-Metioninase

Fraksi Protein	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)	Faktor Pengenceran (FP)	Kadar Protein Sebenarnya (mg/mL)
EK	0,508	0,1825	50	9,125
F1	0,212	0,0521	50	2,605
F2	0,253	0,0702	50	3,51
F3	0,261	0,0737	50	3,685

Hasil regresi kurva larutan standar diperoleh persamaan garis y = 2,2695x + 0,0936. Maka data pada tabel di atas diperoleh dengan cara:

$$X_{EK} = \frac{y - 0,0936}{2,2695} = \frac{0,508 - 0,0936}{2,2695} = 0,1825 \text{ mg/mL}$$

$$X_1 = \frac{y - 0,0936}{2,2695} = \frac{0,212 - 0,0936}{2,2695} = 0,0521 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,0936}{2,2695} = \frac{0,253 - 0,0936}{2,2695} = 0,0702 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0,0936}{2,2695} = \frac{0,261 - 0,0936}{2,2695} = 0,0737 \text{ mg/mL}$$

Selanjutnya dikalikan dengan faktor pengenceran (fp = 50), sehingga:

X_{EK} = 0,1825 mg/mL x 50 = 9,125 mg/mL

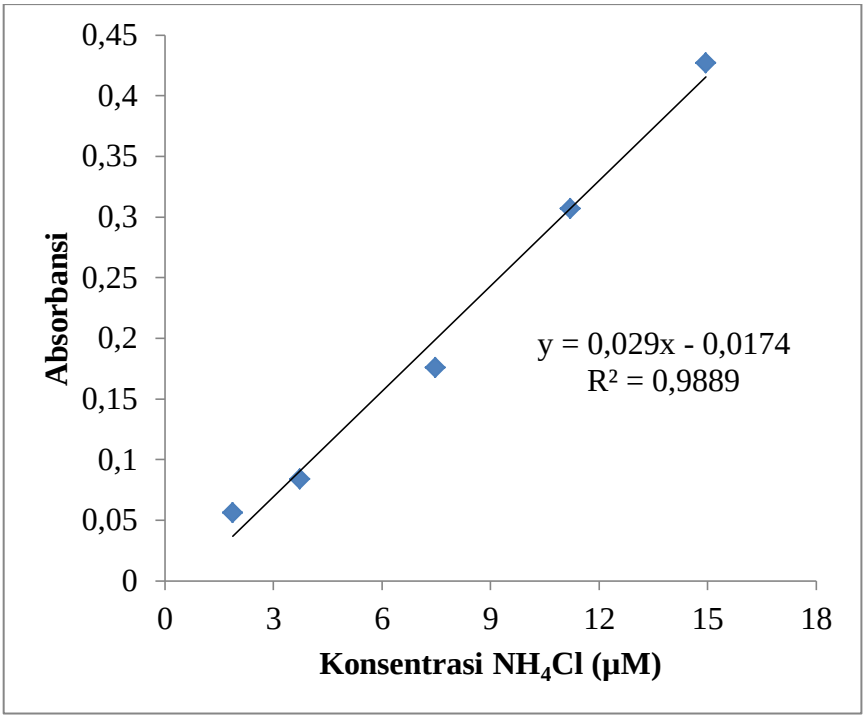
X_1 = 0,0521 mg/mL x 50 = 2,605 mg/mL

X_2 = 0,0702 mg/mL x 50 = 3,51 mg/mL

X_3 = 0,0737 mg/mL x 50 = 3,685 mg/mL

Lampiran 8. Kurva Standar NH_4Cl pada λmax 411 nm

No	Konsentrasi NH_4Cl (mg/mL)	Konsentrasi NH_4Cl (µM)	Absorbansi
1	0	0	0
2	0,1	1,869	0,056
3	0,2	3,738	0,084
4	0,4	7,476	0,176
5	0,6	11,214	0,307
6	0,8	14,952	0,427



Lampiran 9. Tabel Aktivitas Enzim L-Metioninase

Fraksi Enzim	Absorbansi	Aktivitas L-Metioninase (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
EK	0,656	30,9764	9,125	3,3946
F1	0,356	17,1764	2,605	6,5936
F2	0,451	21,5464	3,51	6,1385
F3	**0,562**	**26,6524**	**3,685**	**4,9133**

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

Data absorbansi yang diperoleh, disubtitusikan ke dalam persamaan standar y = 0,029x-0,0174, dengan y adalah absorbansi aktivitas enzim

$$X_{EK} = \frac{0,656 - (- 0,0174)}{0,029} \text{ x } \frac{2}{0,1} \text{ x } \frac{1}{0,5 \text{ x } 30} = 30,9764 \text{ U/mL}$$

$$X_1 = \frac{0,356 - (- 0,0174)}{0,029} \text{ x } \frac{2}{0,1} \text{ x } \frac{1}{0,5 \text{ x } 30} = 17,1764 \text{ U/mL}$$

$$X_2 = \frac{0,451 - (- 0,0174)}{0,029} \text{ x } \frac{2}{0,1} \text{ x } \frac{1}{0,5 \text{ x } 30} = 21,5464 \text{ U/mL}$$

$$X_3 = \frac{0,562 - (- 0,0174)}{0,029} \text{ x } \frac{2}{0,1} \text{ x } \frac{1}{0,5 \text{ x } 30} = 26,6524 \text{ U/mL}$$

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

$$X_{EK} = \frac{30,9764 \text{ U/mL}}{9,125 \text{ mg/mL}} = 3,3946 \text{ U/mg}$$

$$X_1 = \frac{17,1764 \text{ U/mL}}{2,605 \text{ mg/mL}} = 6,5936 \text{ U/mg}$$

$$X_2 = \frac{21,5464 \text{ U/mL}}{3,51 \text{ mg/mL}} = 6,1385 \text{ U/mg}$$

$$X_3 = \frac{26,6524 \text{ U/mL}}{3,685 \text{ mg/mL}} = 7.2326 \text{ U/mg}$$

Lampiran 10. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Metioninase

A. Aktivitas Enzim L-Metioninase terhadap Pengaruh Variasi pH

No	pH	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	6	0,128	6,6884
2.	7	0,214	10,6444
3.	8	0,169	8,5744
4.	9	0,090	4,9404
5.	10	0,084	4,6644

B. Aktivitas Enzim L-Metioninase terhadap Pengaruh Variasi Suhu

No	Suhu (^oC)	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
1.	25	0,098	5,3084
2.	30	0,103	5,5384
3.	35	0,110	5,8604
4.	40	0,156	7,9764
5.	45	0,090	4,9404

C. Aktivitas Enzim L-Metioninase terhadap Pengaruh Penambahan Variasi Logam

No	Logam	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)	Aktivitas Relatif (%)
1.	Kontrol	0,253	12,4384	100
2.	Ca^{2+}	0,42	20,1204	161,76
3.	Mg^{2+}	0,372	17,9124	144
4.	Mn^{2+}	0,073	4,1584	33,43
5.	Cu^{2+}	0,193	9,6784	77,81
6.	Co^{2+}	0,301	14,6464	117,75

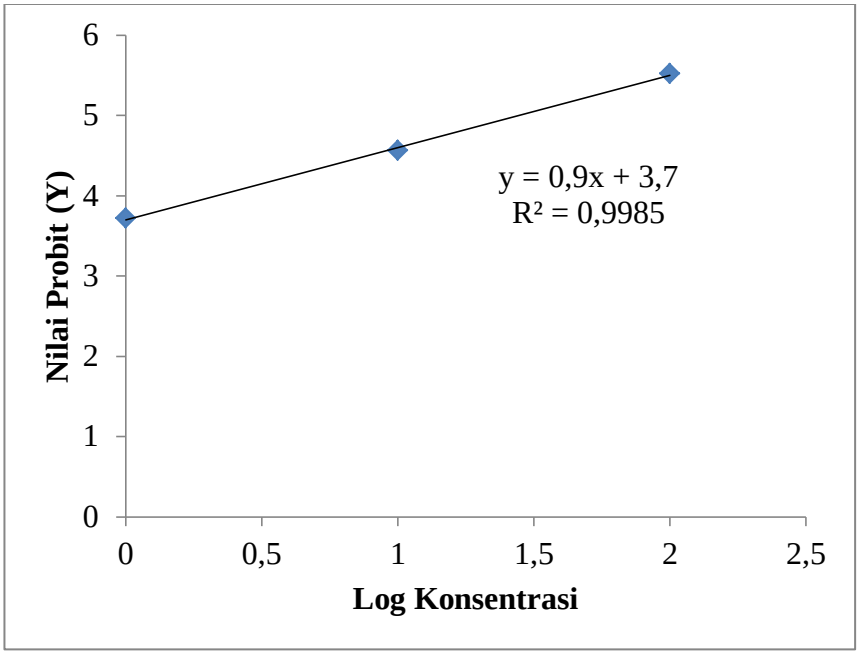
Lampiran 11. Tabel Harga Probit

Persentase	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 12. Perhitungan LC_{50}

A. Perhitungan LC_{50} pada Fraksi Ekstrak Kasar

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	10	3,72
1	33	4,56
2	70	5,52



Untuk LC_{50}, nilai probitnya adalah 5, dimasukkan ke persamaan regresi

Y = 0,9x + 3,7,

Y = 0,9x + 3,7

5 = 0,9x + 3,7

x = 1,444444

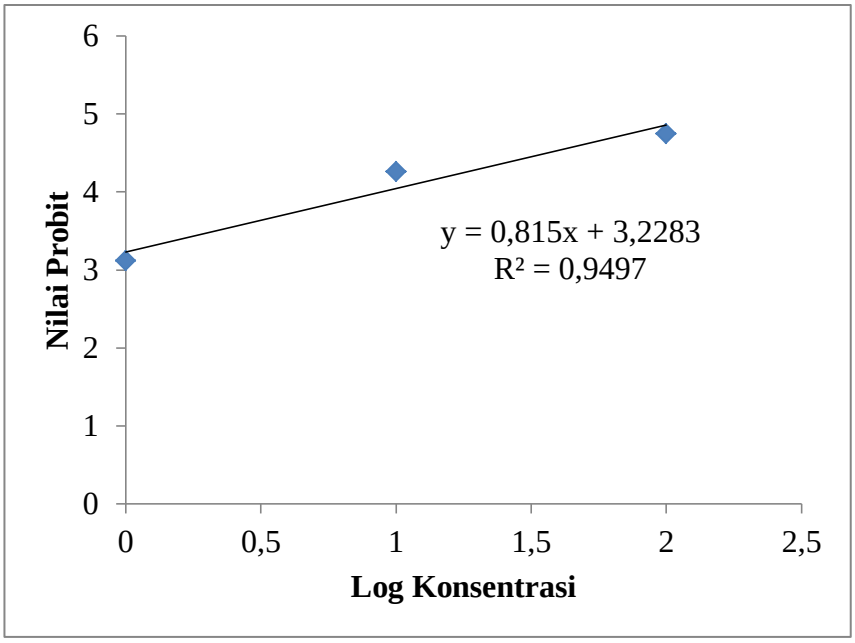
log x = 1,444444

x = antilog 1,444444

x = 27,8255 ppm

B. Perhitungan LC_{50} pada Fraksi 3 (60-80%)

Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
0	3	3,12
1	23	4,26
2	40	4,75



Untuk LC_{50}, nilai probitnya adalah 5, dimasukkan ke persamaan regresi

Y = 0,815x + 3,2283,

Y = 0,815x + 3,2283

5 = 0,815x + 3,2283

x = 2,173865

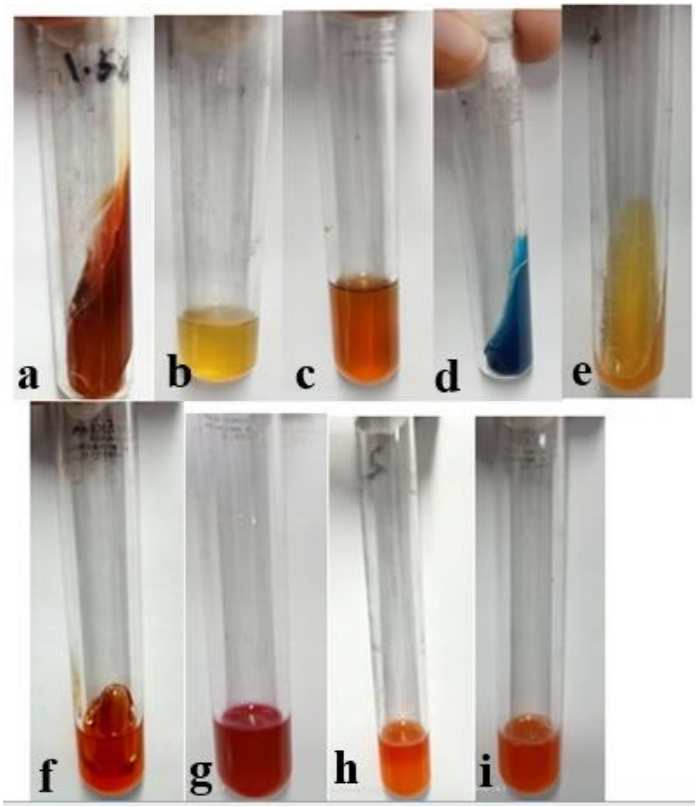
log x = 2,173865

x = antilog 2,173865

x = 149,23 ppm

Lampiran 13. Dokumentasi

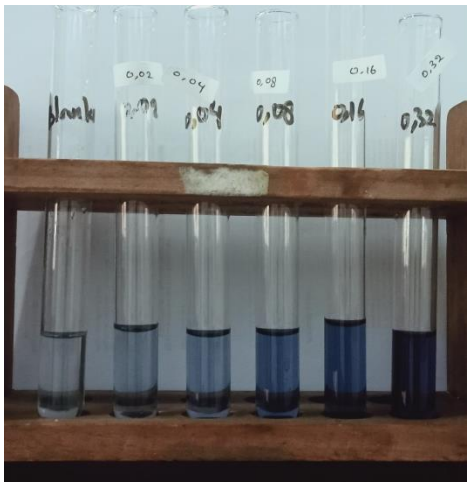
Penyegarn sampel alga merah



Uji Biokimia isolat bakteri E. *spinosum*: (a) uji TSIA; (b) uji SIM; (c) uji MR-VP; (d) uji Sitrat; (e) uji Urea; (f) uji Glukosa; (g) uji Laktosa; (h) uji Sukrosa; dan (i) uji Mannitol

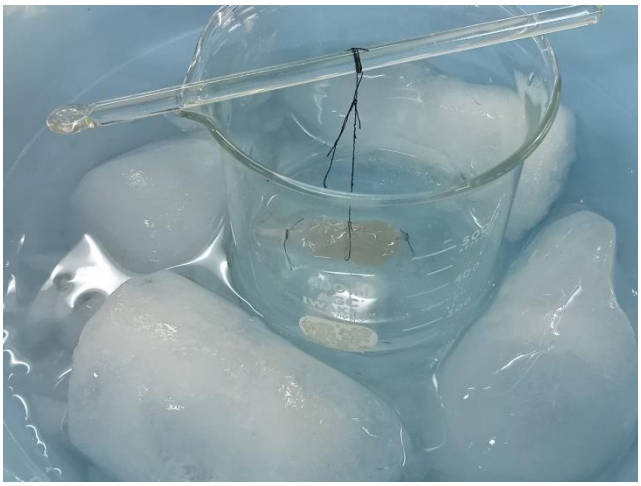
Produksi enzim L-metioninase

Sentrifugasi hasil produksi enzim L-metioninase



Larutan Standar BSA

Penentuan kadar protein tiap fraksi



Dialisis fraksi

Larutan Standar NH_4Cl

Penentuan aktivitas enzim L-metioninase

Pengujian toksisitas fraksi enzim L-Metioninase