

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A.T., dan Yuhana, M., 2011, Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis sp.* Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba, *Ilmu Kelautan*, **16**(1):35-40.
- Adler-Nissen, J., 1979, Determination of The Degree of Hydrolysis of Food Proteins Hydrolysis by Trinitrobenzenesulfonic Acid, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **27**(6): 1256-1262.
- Adler-Nissen, J., 1979, Determination of The Degree of Hydrolysis of Food Proteins Hydrolysis by Trinitrobenzenesulfonic Acid, *Journal Agricultural Food Chemistry*, **27**(6): 1256-1262.
- Agustiani, 2014, Uji Aktifitas Antikanker Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Coklat *Sargassum sp.*, Skripsi Tidak Diterbitkan, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Akbar, A., 2017, *Isolasi Dan Pemurnian Enzim α-Glukosidase dari Beras Ketan Putih (Oryza sativa Var. Glutinosa) Serta Amobilisasi dengan Matriks Karagenan Secara Mikroenkapsulasi*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Aminah, I., Usman, H., dan Ahmad, A., 2014, Karakterisasi Metabolit Sekunder Ekstrak Diklorometana dari Spons *Petrosia alfiani* Sebagai Antioksidan, *Jurnal Ilmiah Kimia Organik*, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Bentley, R., and Meganathan, R., 1982, Biosynthesis of Vitamin K menaquinone) in Bacteria, *Microbiological Reviews*, **46**(3):241–80.
- Bergquist, P.R., 1978, *Spons*, Hutchinson, London.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Stephen, A.M., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta.
- Brusca, R.C., and Brusca, G.J., 1990, *Invertebrates*, Sinauer Associates inc. Publisher Sunderland, Massachusetts.
- CLSI, 2017, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Edition*, CLSI Suplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
- ., 1998, Coastal Zone Management in Indonesia: Issues and Approaches, *Journal of Coastal Development*, **1**(2): 97-112.



- Dahuri, R., 1998, Coastal Zone Management in Indonesia: Issues and Approaches, *Journal of Coastal Development*, 1(2): 97-112.
- Damodaran S, 1996, *Fuctional properties*, di dalam: Nakai S, Modler H.W (editor), *Food protein: Properties and characterization*, New York: UCH Publisher.
- Davis, W.W., Stout, T.R, 1971, Disc Plate Method of Microbiological Assay, *Journal of microbiology*, 22(4):659-665.
- De voogd, N. J., and Van Soest, R. W. M., 2002, *Indonesian Sponge of the Genus Petrosia*, Zool.Med. Leidan, 76.
- Dennison, C., 2002, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publisher, New York.
- Dewi, F.K., 2010, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar, Skripsi , Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Djide, N.M., Sartini dan Kadir, S., 2004, *Analisis Mikrobiologi Farmasi*, Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FMIPA UNHAS, Makassar.
- Ellyasheva, R. dan Rachman, E.A.G., 2005, *Purifikasi Protein*, Makalah kursus singkat: Perkembangan terkini dan Prospek Protein Rekombinan dalam Bidang Industri, School of Pharmacy ITB, Bandung, 13-17 Desember 2005, 20-26.
- Fitrianto, N.E., 2009, *Laju Pertumbuhan dan Sintasan Spons Aaptos aaptos di Kolam Buatan Terkontrol*, Skripsi tidak diterbitkan, Program Studi Ilmu dan Teknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Goering, R., Hazel, D., Mark, Z., Ivan, R., Peter, L.C, 2013, *Mims' Medical Microbiology*, Fifth Edition. Elsivier,Ltd.
- Gomez-Guillen, M.C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M.E., dan Montero, P., 2010, *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Aplication*, 7., *Antioxidant and Antimicrobial Peptide Fractions from Squid and Tuna Skin Gelatine*, Transworld Research Network, Trivandrum, India.
- Handayani, D., Sayuti, N., Dachriyanus, dan Van Soest, R.W.M., 2011, Epidemiologi Sterol, Senyawa Antibakteri dari Spon Laut *Petrosia nigra*, *Jurnal Bahan Alam*, 7(6), 289–293.
- Handayani, D., Sayuti, N., Dachriyanus, dan Van Soest, R.W.M., 2011, Epidemiologi Sterol, Senyawa Antibakteri dari Spon Laut *Petrosia nigra*, *Jurnal Bahan Alam*, 7(6), 289–293.
- E.L.V., 1989, *Concentration of The Extract*, di dalam Harris E.L.V., Gal S, Editor Protein Purification Methods, *A Pratical Approach*, IRL Press, Oxford.



Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., dan Recio, I., 2004, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1504-1510.

Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., dan Recio, I., 2004, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1504-1510.

Hill, L.R., 1981, *Taxonomy of the Staphylococci*, The Staphylococci: Proceedings of the Alexander Ogston Centennial Conference.

Hudault, S., Guignot, J., and Servin, A.L., 2001, *Escherichia coli* Strains Colonising the Gastrointestinal Tract Protect Germfree Mice Against *Salmonella Typhimurium* Infection, *Gu*, 49 (1): 47–55.

Ismet, M.S., 2007, *Penapisan Senyawa Bioaktif Spons Spons Aaptops dan Petrosia sp. dari lokasi yang berbeda*, Skripsi tidak diterbitkan, ITB, Bandung.

Ismet, M.S., 2007, *Penapisan Senyawa Bioaktif Spons Spons Aaptops dan Petrosia sp. dari lokasi yang berbeda*, Skripsi tidak diterbitkan, ITB, Bandung.

Kanagasabhapathy, M., Hideaki, S., Kazuhiko, N., Kumiko, N., and Shinichi, N., 2005, Inhibitor Activity of Surface Bacteria Isolated from the Marine Sponge *Pseudoceratia Purpurea*, *Mic Environ*, 20: 178–185.

Karim, H., 2018, *Pemurnian dan Studi Aktivitas Antimikroba dan Antikanker Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum sp.*, Disertasi tidak diterbitkan, Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Karim, H., 2018, *Pemurnian dan Studi Aktivitas Antimikroba dan Antikanker Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum sp.*, Disertasi tidak diterbitkan, Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Katzung, B.G., 2004, *Farmakologi Dasar dan Klinik Buku 3 Edisi 8*, Penerjemah dan editor: Bagian Farmakologi FK UNAIR, Penerbit Salemba Medika, Surabaya.

Kirk, R.E., Othmer, J.B., 1953, *Encyclopedia of Chemical Technology*, IX(1), New York: The Interscience Encyclopedia Inc.

Landolt-Bornstein, E.N., 1990, *Invertebrates*, Saunders College Publishing, New York.



Krisnanta, I.K.A.B., Parfati, N., Presley, B., dan Setiawan, E., 2018, Analisis Profil dan Faktor Penyebab Ketidakpatuhan Pengasuh Terhadap Penggunaan Antibiotik pada Pasien Anak, *Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi*, **8**(1): 39-50.

Krisnanta, I.K.A.B., Parfati, N., Presley, B., dan Setiawan, E., 2018, Analisis Profil dan Faktor Penyebab Ketidakpatuhan Pengasuh Terhadap Penggunaan Antibiotik pada Pasien Anak, *Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi*, **8**(1): 39-50.

Kristanti, N.D., 2001, *Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang R. oryzae TR 32*, Tesis, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Lay, B.W., 1994, *Analisis Mikroba di Laboratorium*, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta.

Lee, Y.K., Lee, J.H., and Lee, H.K., 2001, Microbiol Symbiosis in Marine Sponge, *J. Microbiol*, 39:254–264.

Lestari, P.I., Susanti, I., dan Rahmawati, H., 2017, Pola Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotik di Ruang Rawat Intensif RSPI Prof. Dr. Sulianti Saroso Jakarta, *The Indonesian Journal of Infectious Diseases*, **1**(2): 23-17.

Lestari, P.I., Susanti, I., dan Rahmawati, H., 2017, Pola Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotik di Ruang Rawat Intensif RSPI Prof. Dr. Sulianti Saroso Jakarta, *The Indonesian Journal of Infectious Diseases*, **1**(2): 23-17.

Lisdayanti. E., 2013, *Potensi Antibakteri dari Bakteri Asosiasi Lamun (Seagrass) dari Pulau Bonebatang Perairan Kota Makassar*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.I., dan Randall, 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagen, *J.Biol.Chem*, **193**, 265-275.

Mayasari, 2016, *Pemurnian Enzim Amilase Kasar dari Bakteri Amilolitik Endogenous Bekatul Secara Parsial Menggunakan Ammonium Sulfat*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Murniasih, T., Rasyid, A., 2010, Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Barrang Lombo (Makassar) Sebagai Sumber Bahan Antibakteri, *Oseanol Limnol Indonesia*, **36**(3): 281–292.

Nani, R., 2009, Pengujian Antibakteri Dari Minyak Atsiri Bunga Cengkeh, Kulit Yu Manis Dan Rimpang Jahe Terhadap *B. subtilis*, *S. aureus*, dan *P. uginosa*, *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus*: 3C (51–55), 2009.

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



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

Nofiani, R., Nurbetty, S., dan Sapar, A., 2009, Aktivitas Antimikroba Ekstrak Methanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat, *J Il Teknol Kelaut Trop*, **1**(2): 33-41.

Pardo, M.F., Lopez, L.M., Canals, F., Aviles, F.X., Natalucci, C.L. dan Caffini, N.O., 2000, Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae), *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 48: 3795-3800.

Pechenik, J.A., 1991, *Biology of The Invertebrates*, Second Edition, Dubque, USA: Wm, C. Brown Publisher: 63-76.

Pelczar, Michael,. J, and Chan, E.C.S., 2008, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Terjemahan Oleh Hadioetomo, Ratna, S., Jakarta: Universitas Indonesia, Hal : 458-956.

Pratama, F., 2014, *Distribusi dan Kelimpahan Sponge di Perairan Pulau Karammasang Kabupaten Polewali Mandar: Keterkaitan dengan Terumbu Karang dan Oseanografi Perairan*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Pratiwi, R.H., 2017, Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen, Terhadap Antibiotik, *Jurnal Pro-Life*, **4**(3): 418-429.

Purbasari, Dian., 2008, *Produksi dan Karakterisasi Hidrolist Protein dari Kerang Mas Ngur (Atactodea sriata)* skripsi tidak diterbitkan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Rachmat, R., 2008, Penelitian Pengembangan Obat dari Produk Alami Laut, *orasi Pengukuhan Profesor Riset Bidang Produk Alami Laut*, LIPI.

Ralph, D.F., 1988, *What Are Sponges?*, Adapted From: Hooper, JNA. Sponguide, version April 1988, Queensland Museum, Australia.

Rini, A.F., 2017, *Potensi Bakteri Penghasil Senyawa Bioaktif yang Berasosiasi dengan Spons Sebagai Biokontrol Vibriosis pada Udang Vaname*, Tesis Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Rizka, A., 2013, *Skrining Bakteri Simbion Spons Asal Perairan Pulau Polewali dan Pulau Sarappolombo sebagai Peghasil Antibakteri terhadap Bakteri patogen pada Manusia dan Ikan*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin, Makassar.



- Romimohtarto, K. dan Juwana, S., 1999, *Biologi Laut, Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi-LIPI, Jakarta, Hal. 115– 128.
- Sari, N.D.P., 2016, *Aktivitas Antimikroba Jamur Endofit Penicillum oxalicum dari Spons Genus Homaxinella*, Skripsi Tidak Diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Surabaya.
- Sartika, 2014, *Potensi Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum sp. Asal Perairan Pulau Lae-Lae*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sartika, 2019, Pembuatan Hidrolisat Kolagen dari Limbah Tulang Ikan Tuna Sirip Kuning (*Thunnus albacares*) Menggunakan Kolagenase dan Potensinya Sebagai Antidiabetes dan Antimikroba, Tesis, Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin Makassar.
- Scopes, R.K., 1994, *Protein Purification: Principles and Practice 3rd ed*, Springer-Verlag, New York.
- Selvin, J., Lipton, A.P., 2004, Dendrilla, N., a Marine Sponge, as Potential Source of Antibacterial Substances for Managing Shrimp Diseases, *Aquaculture* 236: 277–283.
- Septiani, Nurcahaya, E., dan Wijayanti, I., 2017, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea Rotundata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Saintek Perikanan*, 13(1):1-6.
- Setyaningsih, I., 2004, Resistensi Bakteri dan Antibiotik Alami dari Laut (Online), (http://tumoutou.net/pps702_9145/iriani_setyaningsih.pdf).
- Silvestre, M.P.C., Morais, H.A., Silva, V.D.M, Silva, M.R., dan Grau, 2013, Degree of Hydrolysis and Peptide Profile of Whey Proteins using Pancreatin, *J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, 38 (3), 278-290.
- Siswandoyo, S.B., 1995, *Kimia Medisinal*, Airlangga University Press, Surabaya.
- 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, 14 – 15 Oktober 1998: 41 – 52.



Sonia, G.A.S., Lipton, A.P., and Raj, R.P., 2008, Antibacterial Activity of Marine Sponge Extracts Against Fish Pathogenic Bacteria, *Israel J Aquac Bamidgeh*, **60**(3):172–176.

Sugiyono, dan Noviendri, D., 2006, Teknik Pemekatan, Purifikasi, dan Karakterisasi Protein Rekombinan, *Squalen*, **1**(1): 21-27.

Sunny, F., Kurniati, T.H., dan Hatmanti, A., 2016, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri yang Berasosiasi dengan Karang Batu dari Perairan Bitung dan Spons dari Selat Makassar, *Bioma*, **12**(1): 42-49.

Suryati, E., Parenrengi, A., dan Rosmiati., 2000, Penapisan Serta Analisis Kandungan Bioaktif Sponge *Clathria sp.* yang efektif sebagai Antifouling pada teritif (*Balanus amphitrit*), *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, **6**(3).

Sutedja, L., Udin, L.Z., dan Manupputy, A., 2005, *Antimicrobial Activity of the Spons Petrosia contignata Thiele*, Sistem Informasi Dokumen Kegiatan Pusat Penelitian Kimia LIPI, Bandung.

Sutedja, L., Udin, L.Z., dan Manupputy, A., 2005, *Antimicrobial Activity of the Spons Petrosia contignata Thiele*, Sistem Informasi Dokumen Kegiatan Pusat Penelitian Kimia LIPI, Bandung.

Taylor M.W., Radax, R., Steger, D., and Wagner, M., 2007, Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential, *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**:295–347.

Whitaker, J.R., 2003, Effect of temperature on rates of enzyme-catalyzed reactions, *Dalam: O.R. Fennema, M. Karel and G.W. Sanderson (eds.), Principles of Enzymology for the Food Science*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. Atlanta, Georgia.

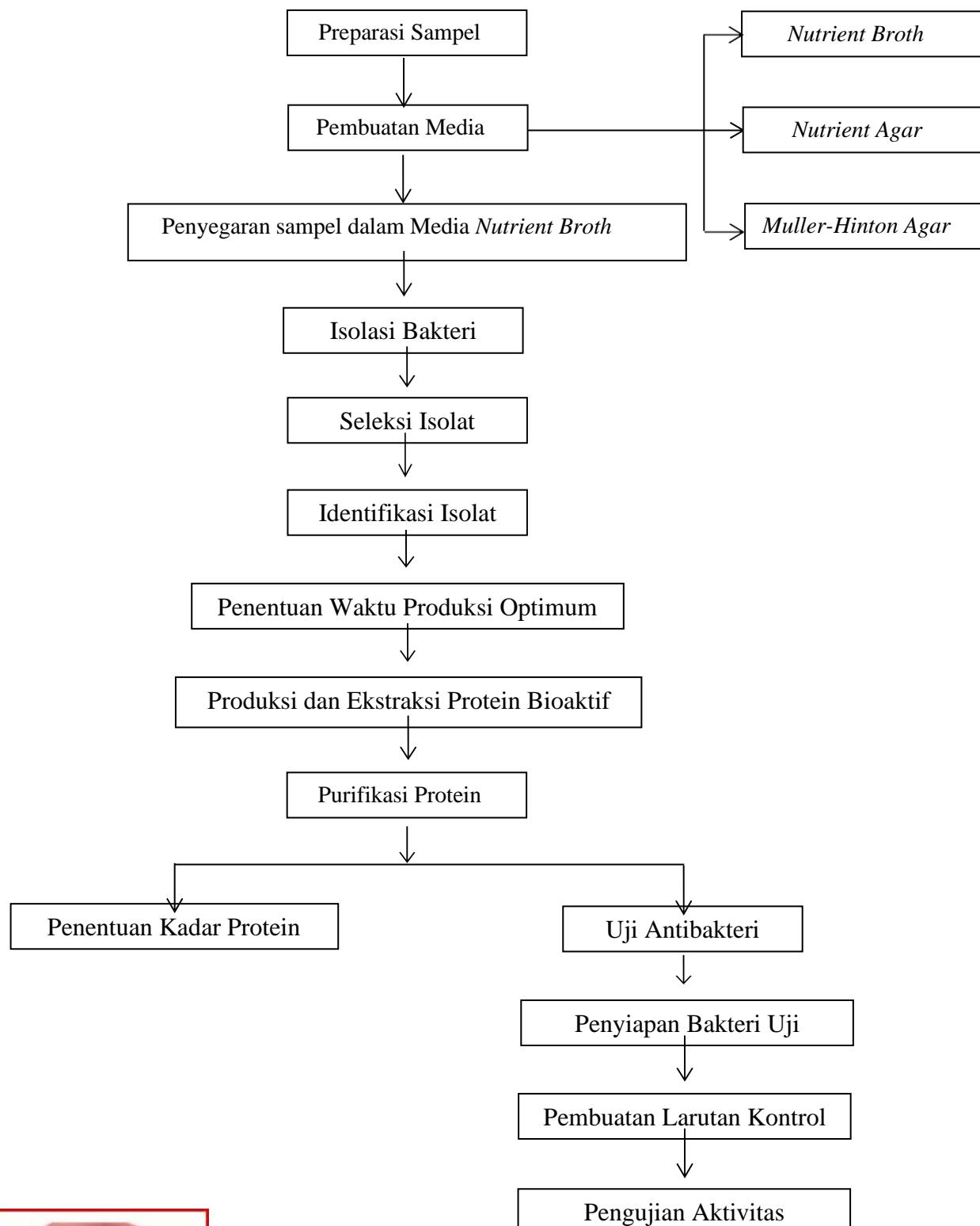
World Health Organisation, 2014, *The Global Burden of Disease*, diakses pada tanggal 27 Desember 2018.

Yulianti, T., Chasanah, E., dan Tambunan, U.S.F., 2012, Screening and Characterization of L-glutaminase Produced by Bacteri Isolated from Sangihe Talaud Sea, *Squalen*, **7**(3):115-121.

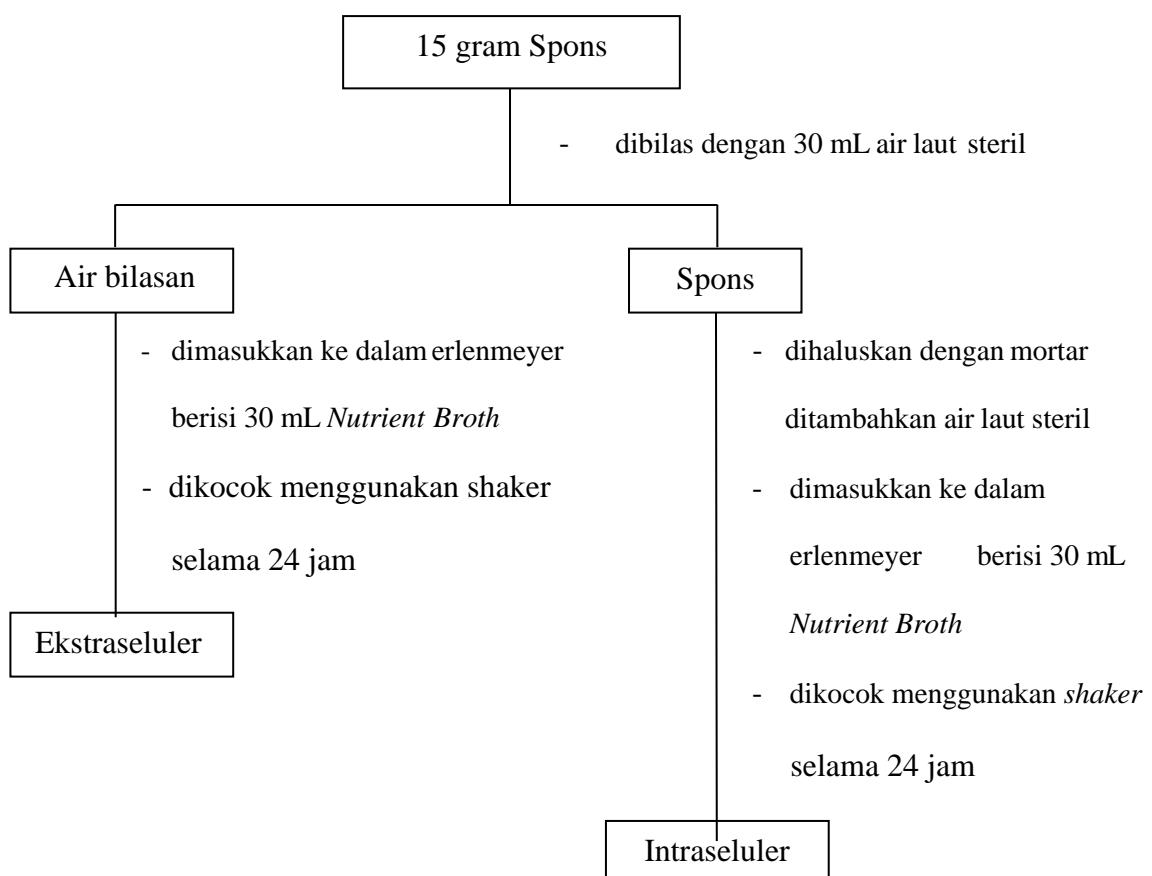
Yulianti T., Chasanah, E., dan Tambunan, U.S.F., 2012, Screening Characterization of L-glutaminase Produced by Bacteri Isolated from Sangihe Talaud Sea, *Squalen*, **7**(3):115-121.



Lampiran 1. Diagram Alur Penelitian

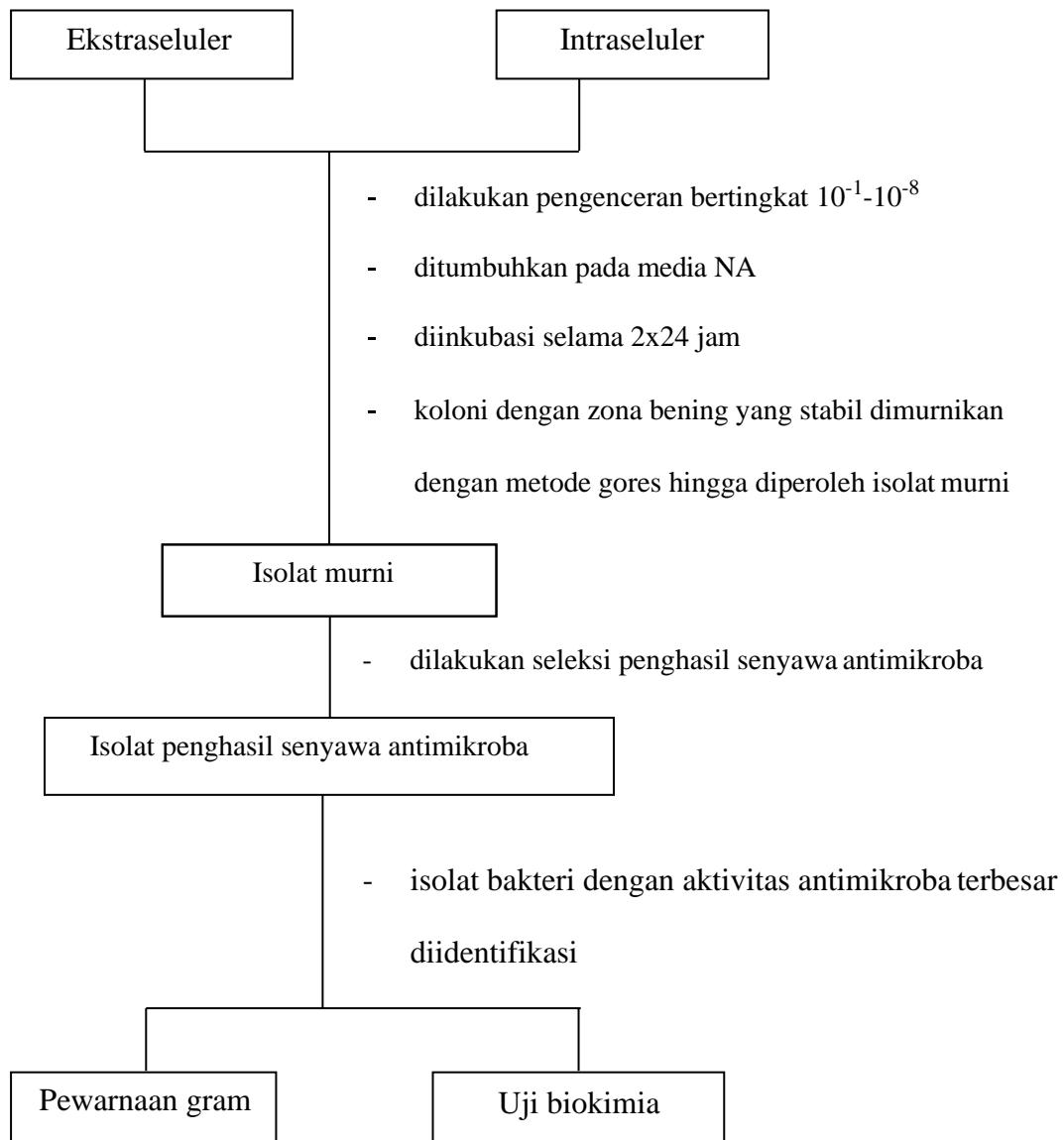


Lampiran 2. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media Nutrient Broth

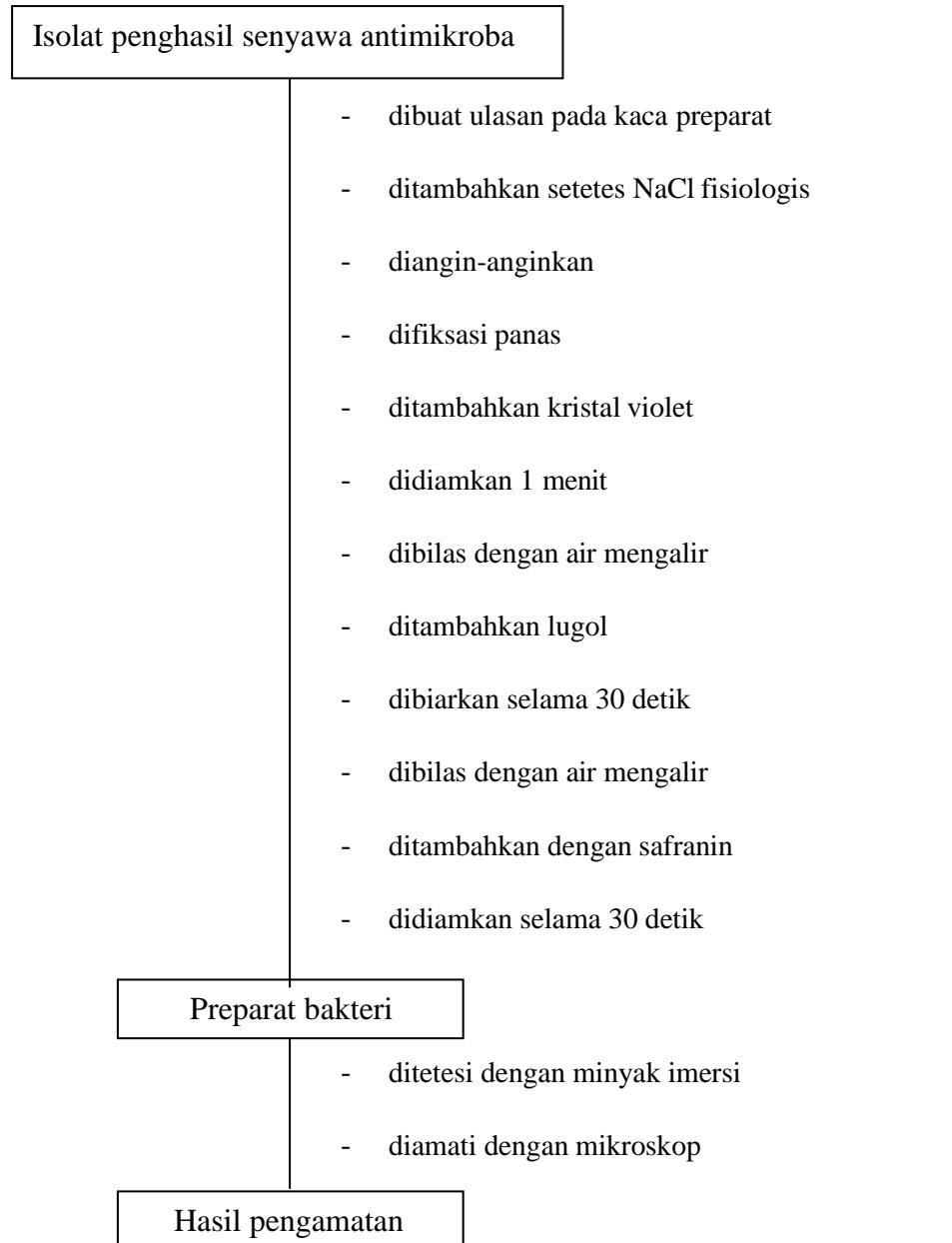


Lampiran 3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba

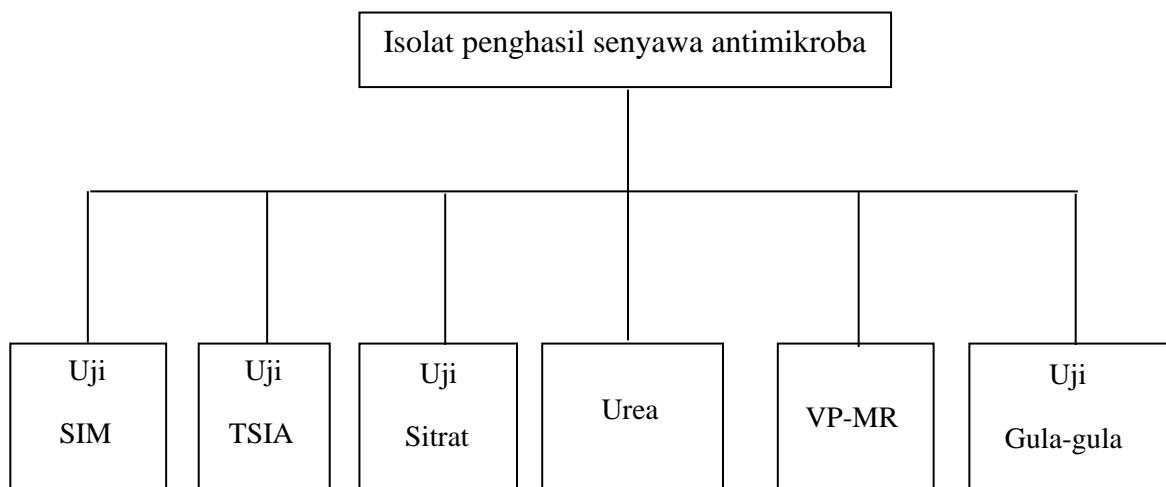
a. Isolasi Bakteri



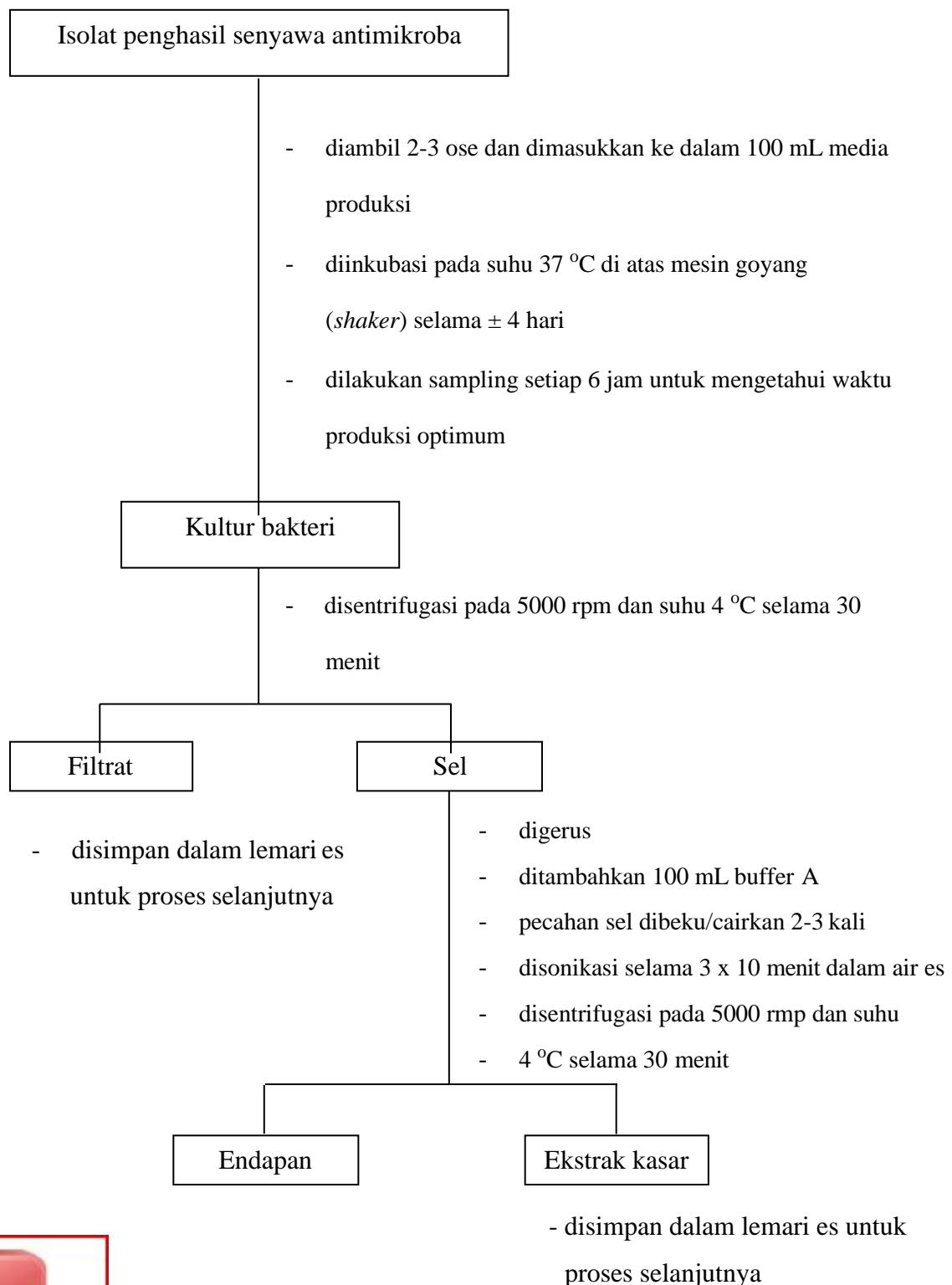
b. Pewarnaan gram



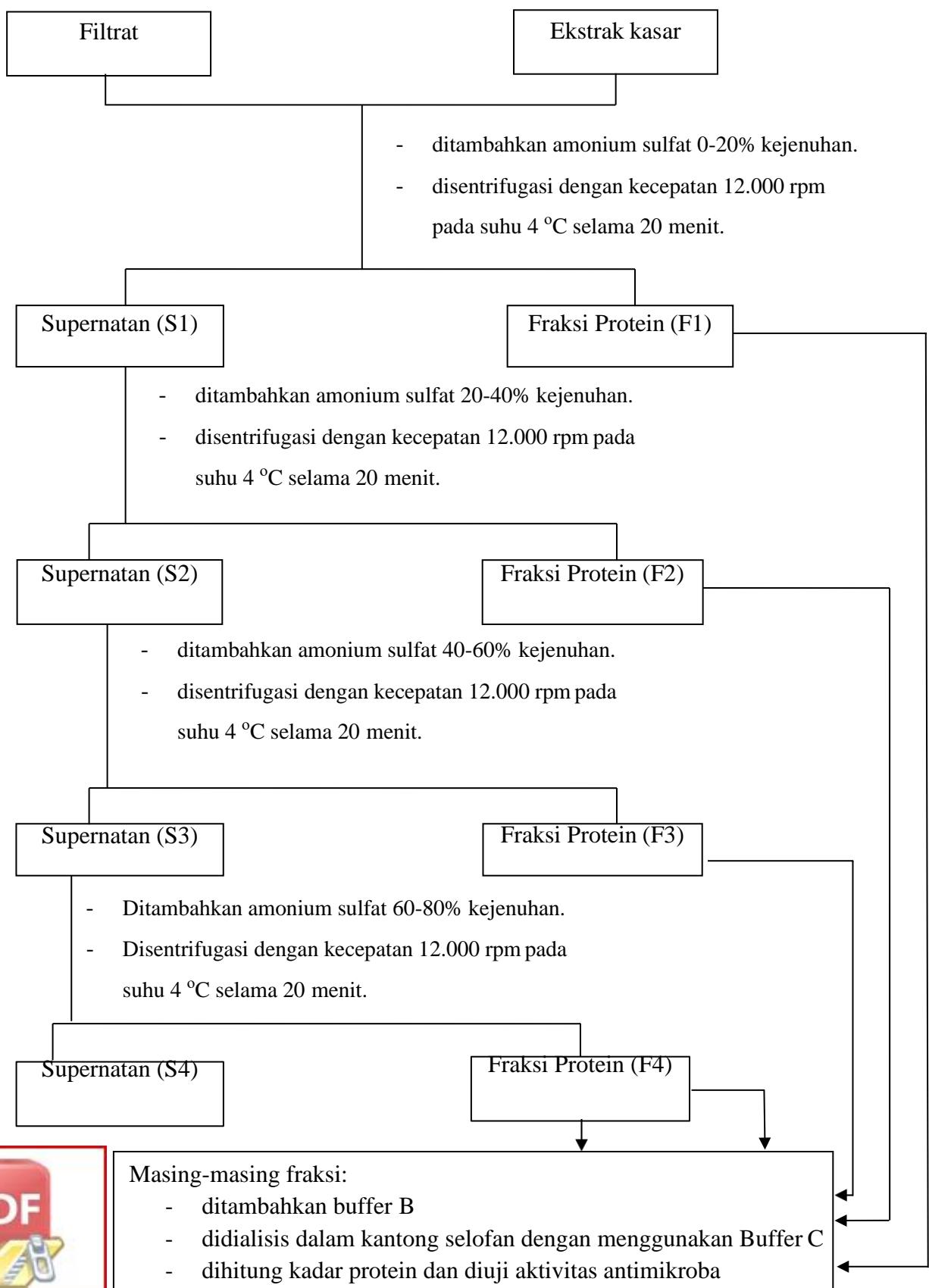
c. Uji Biokimia



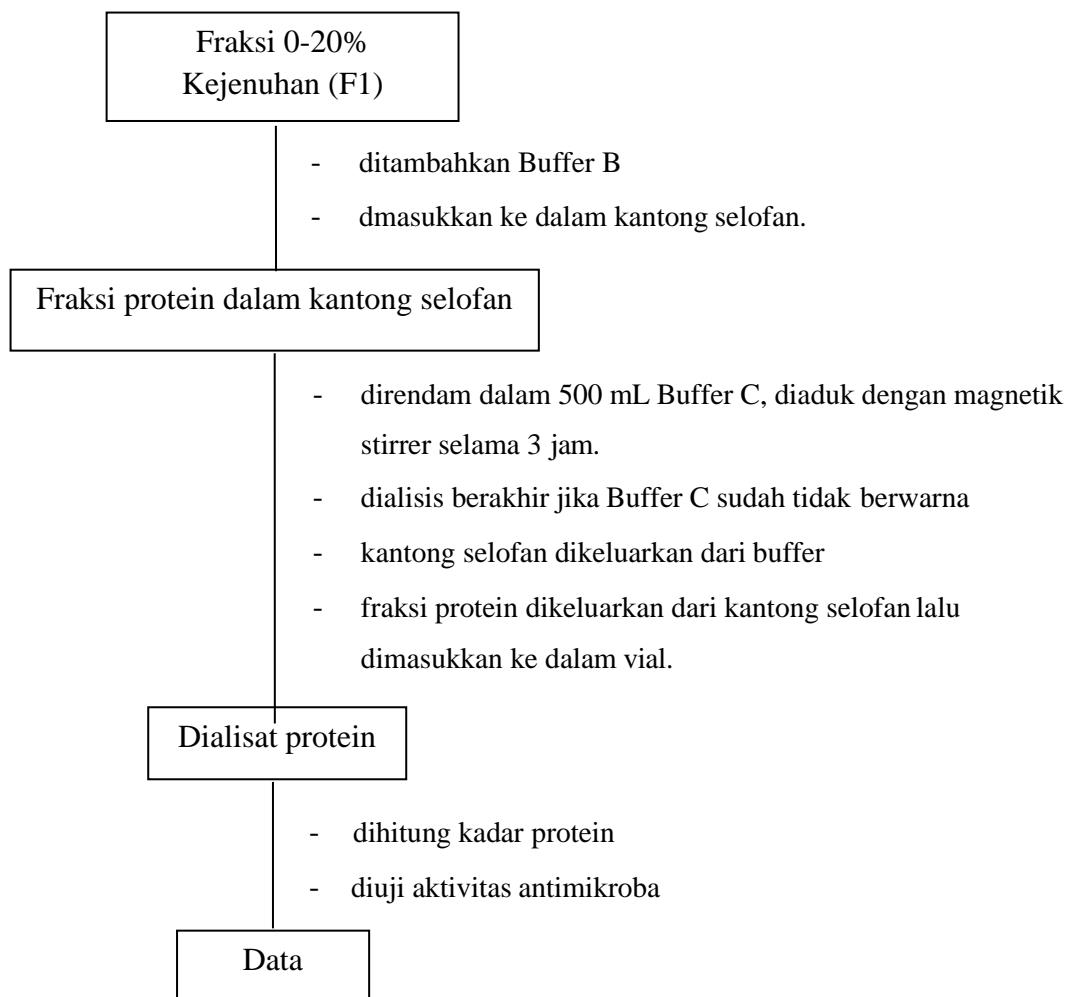
Lampiran 4. Bagan Kerja Ekstraksi Protein Bioaktif



Lampiran 5. Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat



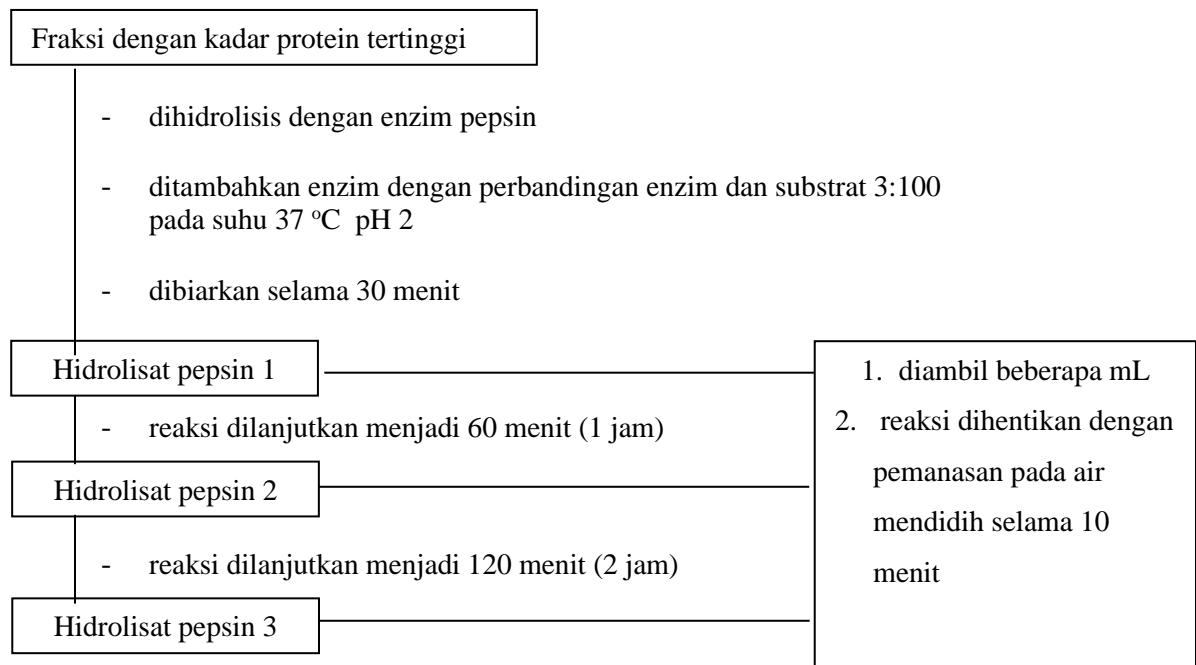
Lampiran 6. Bagan Kerja Dialisis



Catatan:

Perlakuan yang sama untuk F2, F3 dan F4

Lampiran 7. Bagan Kerja Hidrolisis

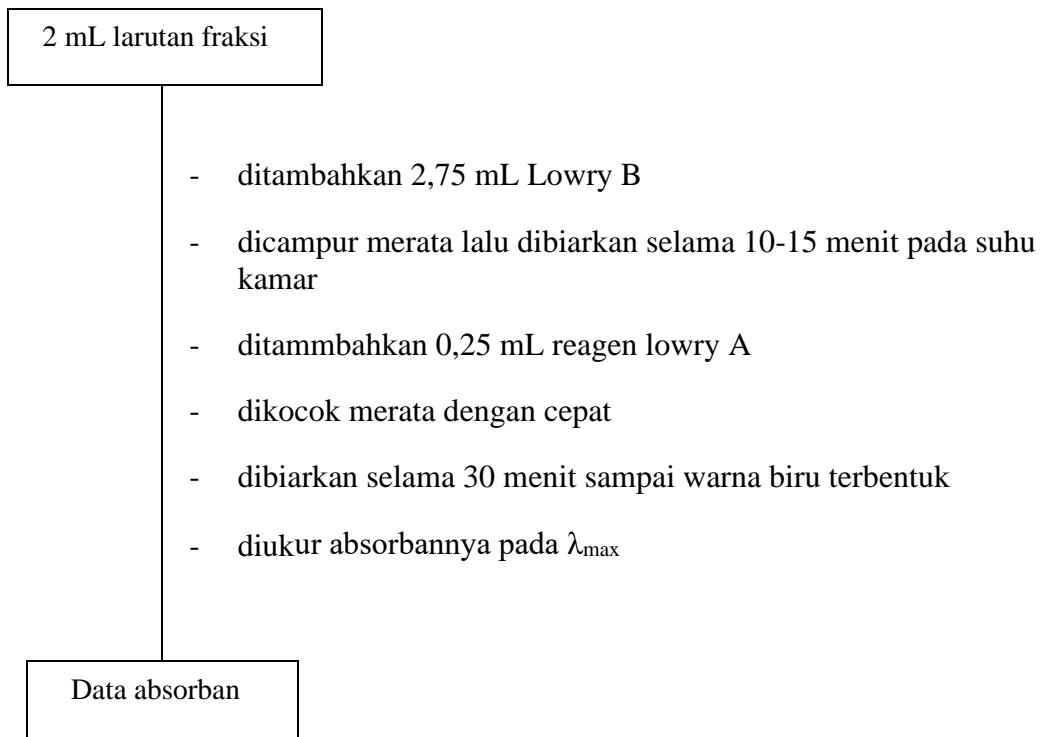


Catatan:

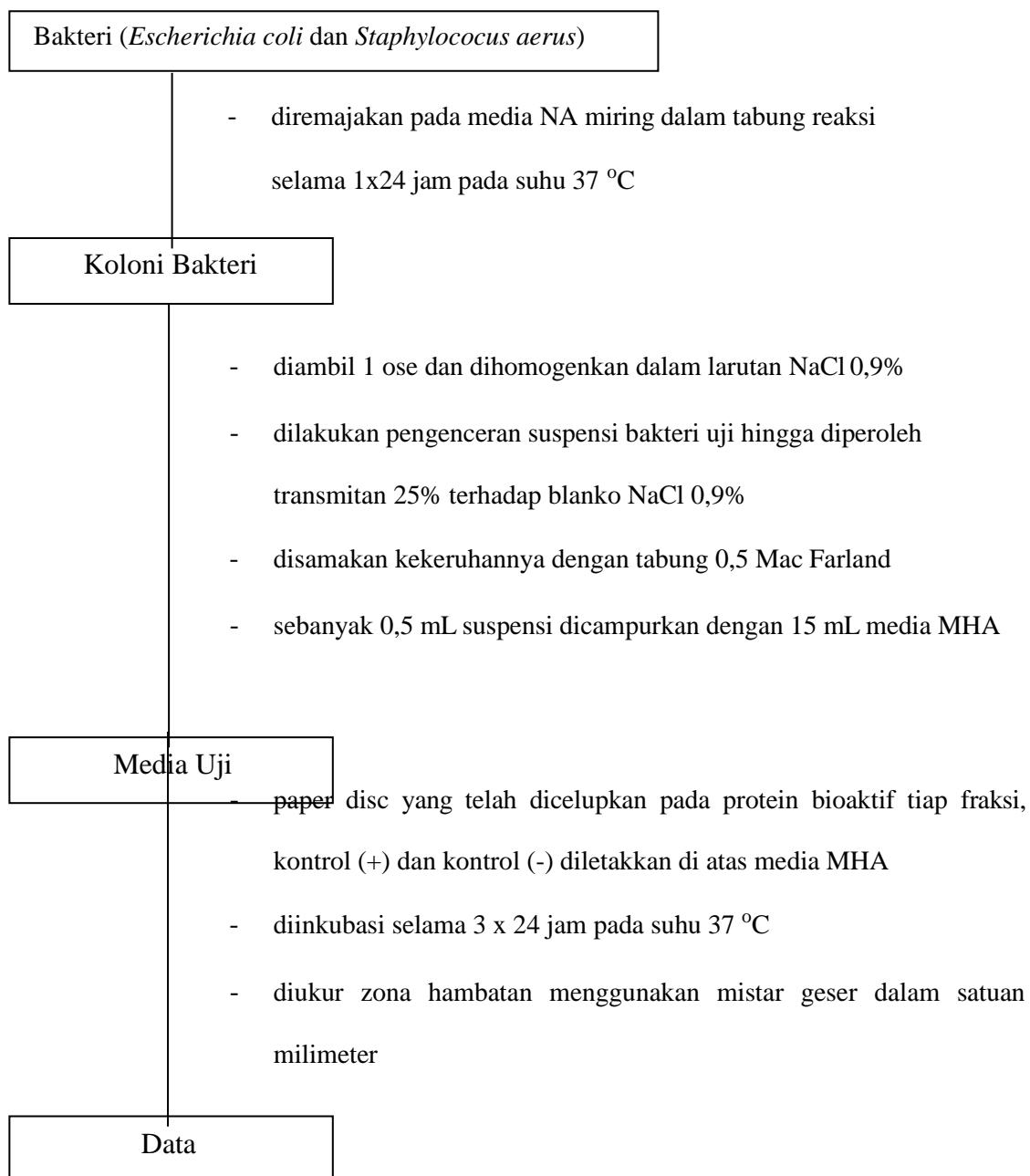
Reaksi dilanjutkan sampai 6 jam yang disampling setiap 30 menit

Hidrolisat 1,2,3 disentrifugasi pada 10000 rpm 4 °C selama 20 menit

Lampiran 8. Prosedur Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Lowry



Lampiran 9. Bagan Kerja Uji Antimikroba dengan Metode Difusi Agar



Optimization Software:
www.balesio.com

Lampiran 10. Penentuan Protein dengan Metode Lowry Pereaksi:

1. Pereaksi Lowry A

Cara pembuatan Lowry A yakni dengan pencampuran antara folin ciocalteus dan akuades dengan perbandingan 1 : 1 dan dibuat sebanyak 4 mL

2. Pereaksi Lowry B

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

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 sediaan 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 11. 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-mercaptoetanol 1%, Triton X-100 0,5%)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 6,05 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) 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 hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 58,5 gram dan 0,555 gram CaCl₂, β-mercaptoetanol 10 mL dan triton X-100 2,5 mL 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 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) 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 pH-nya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 gram dan 0,555 gram 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 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana 0,04 M ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 gram dan 0,555 gram CaCl₂ dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.



Optimization Software:
www.balesio.com

Lampiran 12. Tabel Hasil uji tentang isolat bakteri simbion spons *Petrosia alfiani* terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

NO.	Kode Isolat	Bakteri Uji			
		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
		24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
1	PA 8(1)	-	-	-	-
2	PA 8(2)	-	-	-	-
3	PA 8(3)	-	-	-	-
4	PA 8(4)	+	++	++	++
5	PA 8(5)	++	+++	++	++
6	PAI 8(1)	-	-	+	+
7	PAI 8(2)	-	-	+	++
8	PAI 8(3)	+	++	++	++
9	PAI 8(4)	+	+	++	++
10	PAI 8(5)	-	-	++	+++

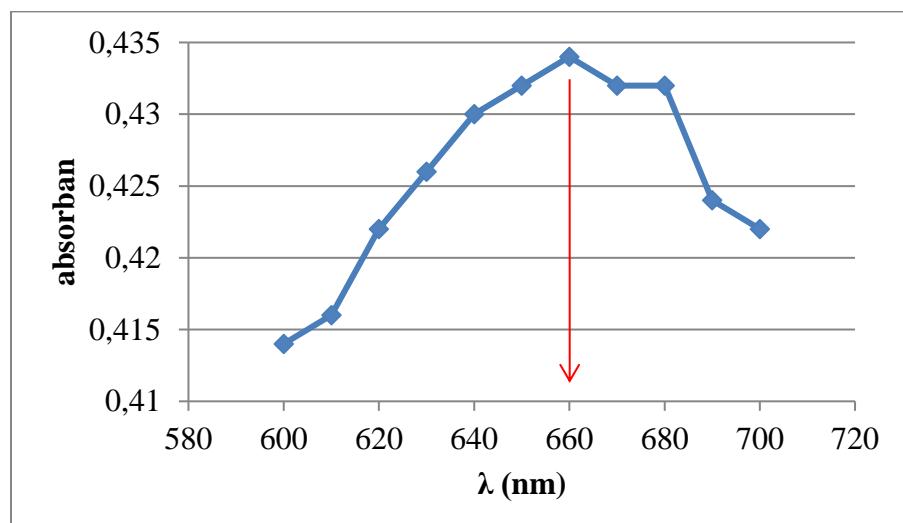
Keterangan zona bening:

- : tidak ada
- + : kecil
- ++ : agak besar
- +++ : cukup besar



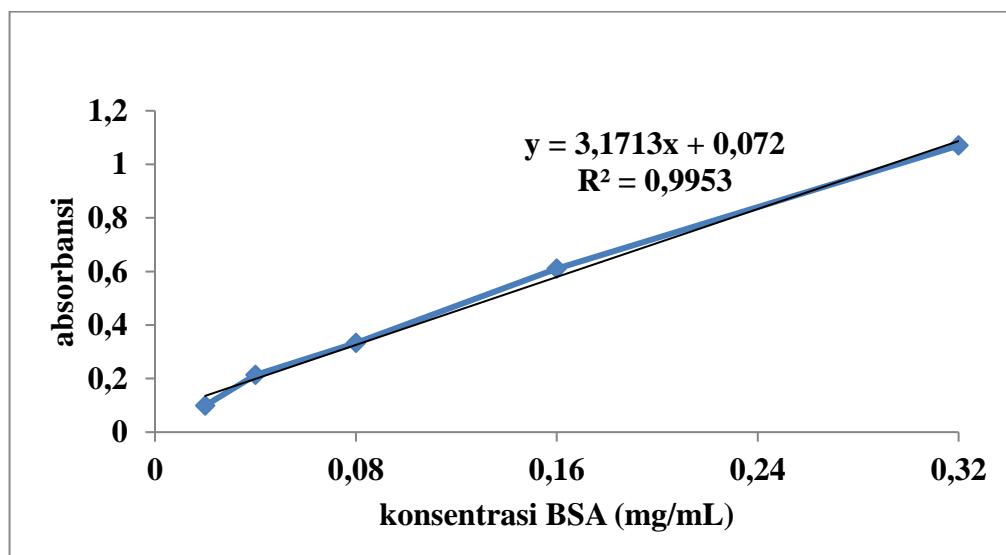
Lampiran 13. Penentuan λ maksimum pada konsentrasi Bovin Serum Albumin 0,08 mg/mL

No.	λ (nm)	Absorban
1	600	0.414
2	610	0.416
3	620	0.422
4	630	0.426
5	640	0.43
6	650	0.432
7	660	0.434
8	670	0.432
9	680	0.432
10	690	0.424
11	700	0.422



Lampiran 14. Kurva standar Bovin Serum Albumin pada λ 660 nm

No	Konsentrasi BSA	Absorbansi
1	0,02	0,099
2	0,04	0,214
3	0,08	0,333
4	0,16	0,61
5	0,32	1,070



Lampiran 15. Data hasil penentuan waktu produksi optimum protein dari bakteri *E. hafniae* PA (8)5 dan *optical density* (OD)

No	Waktu Fermentasi (jam)	OD	Kadar Protein Ekstraseluler (mg/mL)	Kadar Protein Intraseluler (mg/mL)
1	0	0,736	0,455	3,34
2	6	1,64	1,67	8,83
3	12	1,72	1,515	8,45
4	18	1,8	1,09	9,92
5	24	1,8	0,885	7,41
6	30	1,8	0,915	7,63
7	36	1,95	2,115	11,13
8	42	1,8	0,645	6,62
9	48	1,76	0,66	7,285
10	54	1,74	0,595	4,43



Lampiran 16. Konsentrasi protein pada sampel ekstrak kasar ekstraseluler (λ 660 nm)

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0,101	0,455
2	6	0,178	1,67
3	12	0,168	1,515
4	18	0,141	1,09
5	24	0,128	0,885
6	30	0,13	0,915
7	36	0,206	2,115
8	42	0,113	0,645
9	48	0,114	0,66
10	54	0,11	0,595

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 3,1713x + 0,072$, dimana $y = 0,206$ adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui $y = 0,206$, maka:

$$0,206 = 3,1713x + 0,072$$

$$3,1713x = 0,206 - 0,072$$

$$3,1713x = 0,134$$

$$x = 0,0423 \text{ mg/mL}$$

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

$$x = 0,0423 \text{ mg/mL} \times 50$$

$$= 2,115 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 17. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler (λ 660 nm)

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0.284	3.34
2	6	0.632	8.83
3	12	0.608	8.45
4	18	0.7013	9.92
5	24	0.542	7.41
6	30	0.556	7.63
7	36	0.778	11.13
8	42	0.492	6.62
9	48	0.534	7.285
10	54	0.353	4.43

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 3,1713x + 0,072$, dimana $y = 0,778$ adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui $y = 0,778$, maka:

$$0,778 = 3,1713x + 0,072$$

$$3,1713x = 0,778 - 0,072$$

$$3,1713x = 0,706$$

$$x = 0,2226 \text{ mg/mL}$$

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

$$x = 0,2226 \text{ mg/mL} \times 50$$

$$= 11,13 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 18. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejemuhan

Jenis Protein	Fraksi Protein	Bobot Amonium Sulfat (g)
Protein Ekstraseluler	F1	53
	F2	54,805
	F3	60,6
	F4	69,144
Protein Intraseluler	F1	3,074
	F2	3,164
	F3	3,6
	F4	3,87

Penambahan Amonium sulfat:

Protein Ekstraseluler

$$F1 = \frac{500 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ g} = 53 \text{ g}$$

$$F2 = \frac{485 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 54,805 \text{ g}$$

$$F3 = \frac{505 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ g} = 60,6 \text{ g}$$

$$F4 = \frac{536 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ g} = 69,144 \text{ g}$$

Protein Intraseluler

$$F1 = \frac{29 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ g} = 3,074 \text{ g}$$

$$F2 = \frac{28 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 3,164 \text{ g}$$

$$F3 = \frac{30 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ g} = 3,6 \text{ g}$$

$$F4 = \frac{30 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ g} = 3,87 \text{ g}$$

Lampiran 19. Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat

Konsentrasi awal dari amonium sulfat (% kejenuhan pada 0°C)	% Kejenuhan pada 0°C									
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Penambahan amonium sulfat kristal (gram) untuk pada 1 liter larutan										
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276
25	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280
30	0	28	56	86	117	148	181	214	249	285
35	0	28	57	87	118	151	184	218	254	291
40	0	29	58	89	120	153	187	222	258	296
45	0	29	59	90	123	156	190	226	263	302
50	0	30	60	92	125	159	194	230	268	308
55	0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60	0	31	62	95	129	164	201	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						



Lampiran 20. Pengukuran Kadar Protein pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein

Jenis Protein	Fraksi Protein	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)	Faktor Pengenceran	Kadar Protein Sebenarnya (mg/mL)
Protein Ekstraseluler	F1	0,678	0,1911	50	9,555
	F3	0,103	0,0098	50	0,49
	F3	0,164	0,0290	50	1,4505
	F4	0,215	0,0451	50	2,255
Protein Intraseluler	F1	0,554	0,1519	50	7,599
	F2	0,328	0,0807	50	4,035
	F3	0,690	0,1949	50	9,745
	F4	0,550	0,1507	50	7,535

Dari hasil regresi kurva larutan standar diperoleh persamaan garis: $y = 3,1713x + 0,072$.

Maka data pada tabel di atas diperoleh dengan cara:

Protein Ekstraseluler

$$X_1 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,678 - 0,072}{3,1713} = 0,1911 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,103 - 0,072}{3,1713} = 0,0098 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,164 - 0,072}{3,1713} = 0,0290 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,215 - 0,072}{3,1713} = 0,0451 \text{ mg/mL}$$

Protein Intraseluler

$$X_1 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,554 - 0,072}{3,1713} = 0,1519 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,328 - 0,072}{3,1713} = 0,0807 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,690 - 0,072}{3,1713} = 0,1949 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0,072}{3,1713} = \frac{0,550 - 0,072}{3,1713} = 0,1507 \text{ mg/mL}$$



Lampiran 21. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejemuhan

Jenis Protein	Fraksi Protein	Volume Setiap Fraksi (mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)
Protein Ekstraseluler	0-20 %	4,5	9,555	42,9975
	20-40 %	4,5	0,49	2,205
	40-60 %	7	1,4505	10,1535
	60-80 %	7	2,255	15,785
Protein Intraseluler	0-20 %	5	7,599	37,995
	20-40 %	4	4,035	16,14
	40-60 %	5	9,745	48,725
	60-80 %	4	7,535	30,14

Penentuan total protein dengan rumus:

$$\text{Total Protein} = \text{Volume setiap Fraksi (mL)} \times \text{Konsentrasi Protein (mg/mL)}$$

Protein Ekstraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 4,5 \text{ mL} \times 9,555 \text{ mg/mL} = 42,9975 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 4,5 \text{ mL} \times 0,49 \text{ mg/mL} = 2,205 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 7 \text{ mL} \times 1,4505 \text{ mg/mL} = 10,1535 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 7 \text{ mL} \times 2,255 \text{ mg/mL} = 15,785 \text{ mg}$$

Protein Intraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 5 \text{ mL} \times 7,599 \text{ mg/mL} = 37,995 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 4 \text{ mL} \times 4,035 \text{ mg/mL} = 16,14 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 5 \text{ mL} \times 9,745 \text{ mg/mL} = 48,725 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 4 \text{ mL} \times 7,535 \text{ mg/mL} = 30,14 \text{ mg}$$

Lampiran 22. Perhitungan Derajat Hidrolisis (DH)

a. Variasi Waktu Hidrolisis F3

Waktu Hidrolisis (jam)	Protein Terlarut (mg/mL)				Protein Total (mg/mL)				
	Absorban	KP	FP	KP Sebenarnya	Absorban	KP	FP	KP Sebenarnya	DH (%)
0	0,083	0,0035	5	0,0175	0,118	0,0145	5	0,0725	24,1379
0,5	0,650	0,1823	50	9,115	0,825	0,2374	50	11,870	76,7902
1	0,648	0,1816	50	9,08	0,820	0,2359	50	11,795	76,9818
2	0,608	0,169	50	8,45	0,810	0,2327	50	11,635	72,6257
3	0,682	0,1924	50	9,62	0,830	0,2390	50	11,950	80,5021
4	0,684	0,1946	50	9,73	0,985	0,2879	50	14,395	67,5929
5	0,658	0,1848	50	9,24	0,945	0,2753	50	13,765	67,1268
6	0,618	0,1722	50	8,61	0,915	0,2658	50	13,290	64,7856

Keterangan:

KP = Kadar Protein

FP = Faktor Pengenceran

$$\text{Derajat Hidrolisis (DH)\%} = \frac{\text{Protein terlarut 10\% TCA}}{\text{Protein total}} \times 100\%$$

$$= \frac{9,62}{11,950} \times 100\% \\ = 80,5021\%$$



Optimization Software:
www.balesio.com

b. Variasi Waktu Hidrolisis F1

Waktu Hidrolisis (jam)	Protein Terlarut (mg/mL)				Protein Total (mg/mL)				
	Absorban	KP	FP	KP Sebenarnya	Absorban	KP	FP	KP Sebenarnya	DH (%)
0	0,078	0,0019	10	0,019	0,128	0,017	5	0,0850	22,3529
0,5	0,660	0,1852	50	9,260	0,860	0,2485	50	12,425	74,5272
1	0,668	0,1879	50	9,395	0,870	0,2516	50	12,580	74,6820
2	0,670	0,1886	50	9,430	0,895	0,2595	50	12,975	72,6782
3	0,718	0,2037	50	10,185	0,860	0,2485	50	12,425	81,9718
4	0,660	0,1852	50	9,260	0,970	0,2832	50	14,160	65,3955
5	0,582	0,1608	50	8,040	0,950	0,2769	50	13,845	58,0715
6	0,516	0,14	50	7	0,885	0,2564	50	12,820	54,6022

Keterangan:

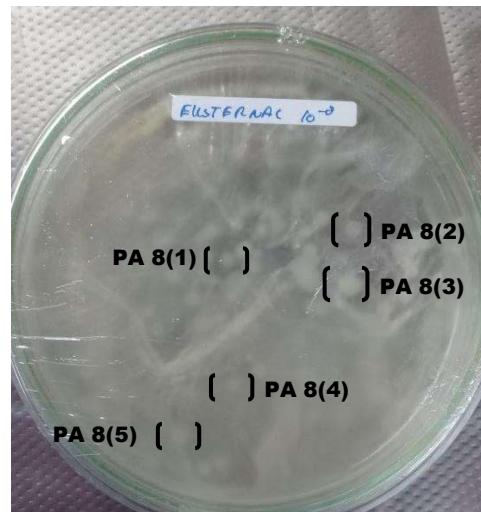
KP = Kadar Protein

FP = Faktor Pengenceran

$$\begin{aligned}
 \text{Derajat Hidrolisis (DH)\%} &= \frac{\text{Protein terlarut 10\% TCA}}{\text{Protein total}} \times 100\% \\
 &= \frac{10,185}{12,425} \times 100\% \\
 &= 81,9718\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 23. Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba pada Pengenceran 10^{-8}

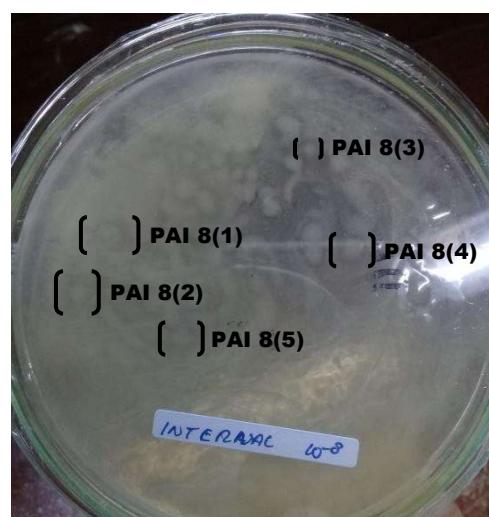
- a. Isolat bakteri dari bagian permukaan spons



Keterangan kode isolat:

PA 8: Isolat eksofit spons *Petrosia alfiani* pada pengenceran 10^{-8}

- b. Isolat bakteri dari bagian dalam spons



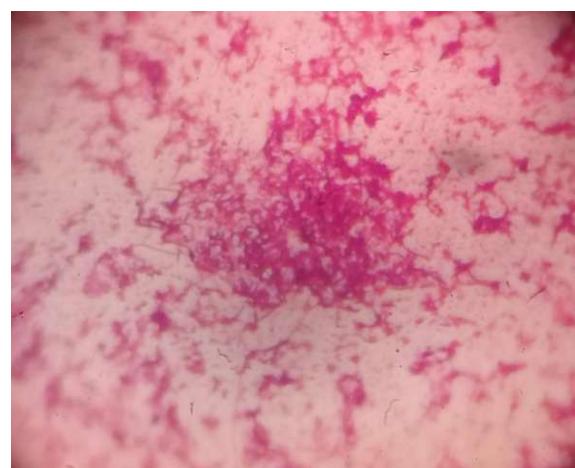
Keterangan kode isolat:

PAI 8: Isolat endofit spons *Petrosia alfiani* pada pengenceran 10^{-8}

Isolat yang atas dipilih berdasarkan kestabilan zona bening setelah inkubasi 2 x 24 jam. Dilakukan diligores beberapa kali hingga diperoleh isolat murni.



Lampiran 24. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana dari Isolat PA (8)5



Penampakan *Enterobacter hafniae* secara morfologi di bawah mikroskop dengan pembesaran 100x



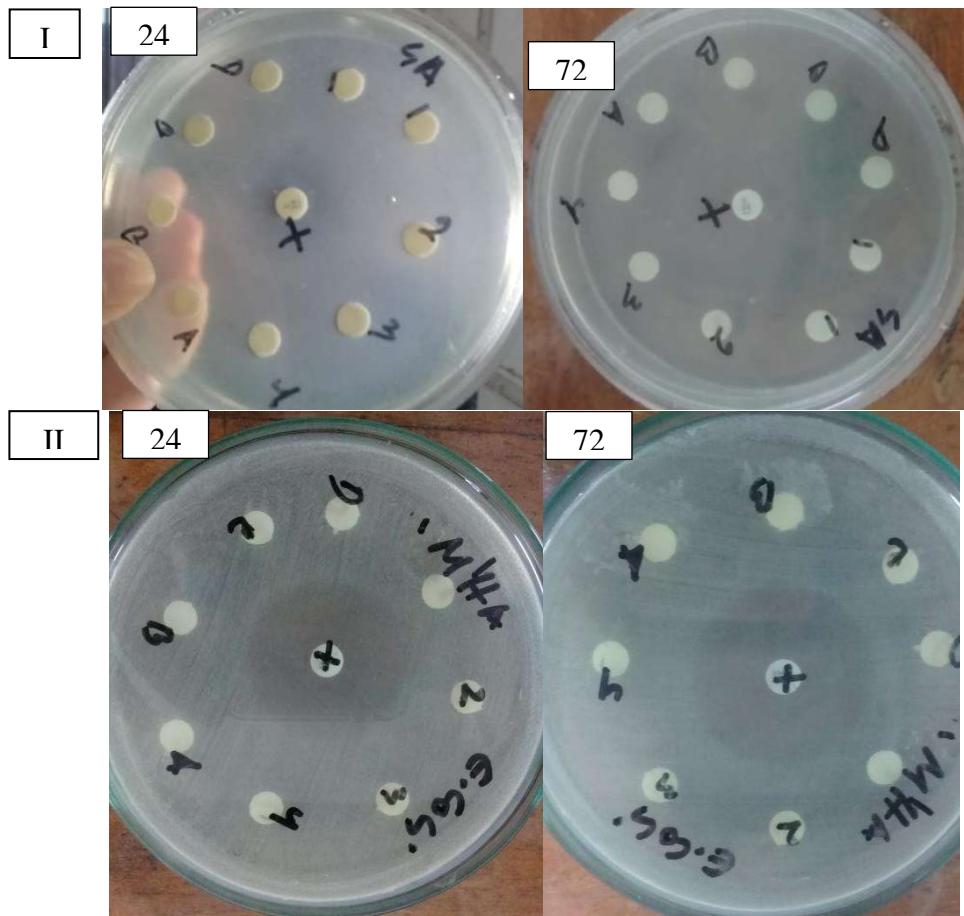
Uji TSIA, SIM, MR-VP, urea, Sitrat dan uji gula-gula

Lampiran 25. Klasifikasi Bakteri *E. hafniae* PA(8)5

Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Proteobacteria*
Class : *Gammaproteobacteria*
Order : *Enterobacteriales*
Family : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Hafnia*
Species : *Enterobacter Hafniae*



Lampiran 26. Uji Antibakteri Fraksi Protein *E. hafniae* PA (8)5



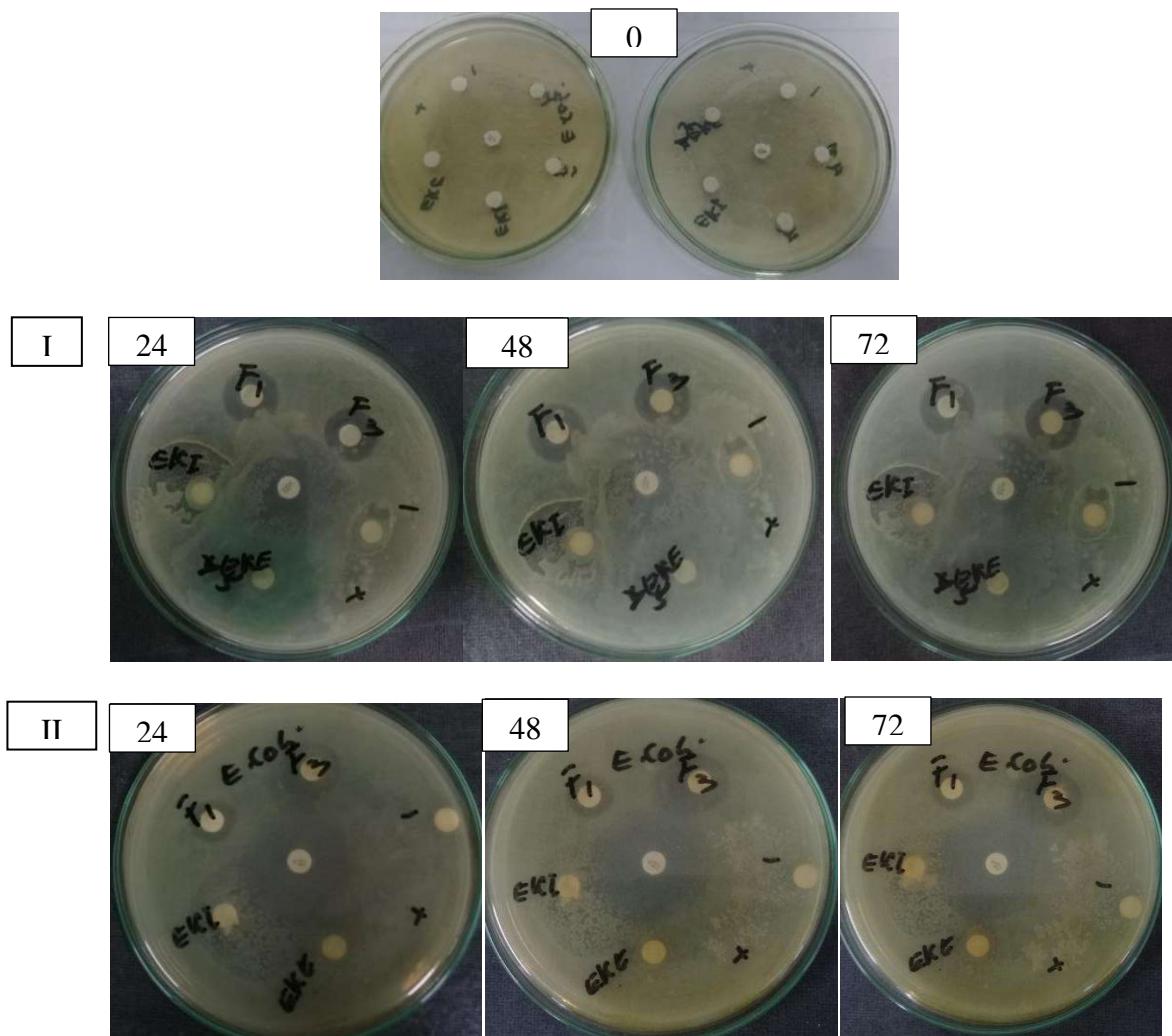
Diameter zona hambatan fraksi protein ekstraseluler dan fraksi protein intraseluler terhadap pertumbuhan *S. aureus* (I) dan *E. coli* (II) pada masa inkubasi 24 jam dan 72 jam

Keterangan:

- 1 : Fraksi protein intraseluler F1
- 2 : Fraksi protein intraseluler F2
- 3 : Fraksi protein intraseluler F3
- 4 : Fraksi protein intraseluler F4
- A : Fraksi protein ekstraseluler F1
- B : Fraksi protein ekstraseluler F2
- C : Fraksi protein ekstraseluler F3
- D : Fraksi protein ekstraseluler F4
- + : Kontrol positif
- : Kontrol negatif



Lampiran 27. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar dan Hidrolisat Protein *E. hafniae* PA (8)5



Diameter zona hambatan ekstrak kasar protein ekstraseluler dan intraseluler serta hidrolisat protein F1 dan F3 terhadap pertumbuhan *S. aureus* (I) dan *E. coli* (II) pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam

Keterangan:

- F1 : Hidrolisat protein F1
- F3 : Hidrolisat protein F3
- EKE : Ekstrak kasar protein ekstraseluler
- EKI : Ekstrak kasar protein intraseluler
- + : Kontrol positif
- : Kontrol negatif

Lampiran 28. Dokumentasi



Pembuatan media

Sentrifugasi



Fraksinasi

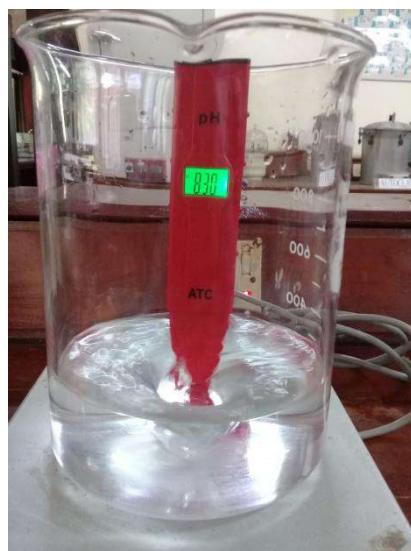
Hasil sentrifugasi



Pengukuran kadar protein



Optimization Software:
www.balesio.com



Pembuatan Buffer



Proses Dialisis



Hidrolisat Protein



Uji aktivitas antibakteri