

**UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI PROTEIN**

**DARI SPONS *Clathria riccartii***

**FATIMAH A. HADI**

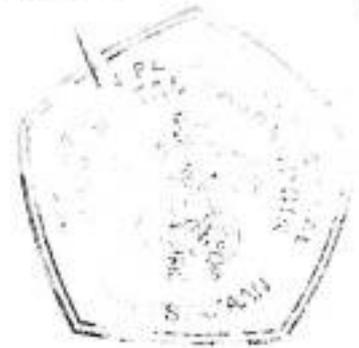
**H 311 04 024**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2009**

# UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI PROTEIN

DARI SPONS *Clathria reinwardtii*



*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

FATIMAH A. HADI

H311 04 024



PERPUSTAKAAN	
Tgl. Terima	24-02-09
Asal Dari	MIPA
Darvakan	1 dus
Harga	Gratis
No. Inventaris	44
No. Klas	SIKR - MP09

HAD  
U.

MAKASSAR

2009

*SKRIPSI*



**UJI BIOAKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI PROTEIN DARI  
SPONS *Clathria reinwardtii***

Disusun dan diajukan oleh

**FATIMAH A. HADI**

**H311 04 024**

**Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:**

**Pembimbing Utama**

**Prof. Dr. Ahyar Ahmad**  
**NIP 131 963 838**

**Pembimbing Pertama**

**Drs. Abdul Karim, MSi.**  
**NIP 131 792 020**

Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, silih bergantinya malam dan siang, bahtera yang berlayar di laut membawa apa yang berguna bagi manusia, dan apa yang Allah turunkan dari langit berupa air, lalu dengan air itu dia hidupkan bumi sesudah mati (kering)-nya dan dia sebarkan di bumi itu segala jenis hewan, dan pengisaran angin dan awan yang dikendalikan antara langit dan bumi; sungguh (terdapat) tanda-tanda (keesaan dan kebesaran Allah) bagi kaum yang memikirkan  
(QS Al Baqarah: 164).

*"Bila yang tertulis untukku, adalah yang terbaik untukmu*

*Kan kujadikan kau kenangan yang terindah dalam hidupku....."*

*Tuk mereka yang memberi arti dalam kebersamaan.....*

## PRAKATA



Alhamdulillah rabbi lalamin, puji sukur kehadiran Allah SWT, hanya kepadaNya kami berserah diri, hanya kepadaNya kami mohon pertolongan, hanya kepadaNya kami berharap. Tuhan seru sekalian alam, Tuhan Rabbulalamin yang telah memberikan kekuatan dan kesabaran, sehingga penulisan skripsi dengan judul **Uji Bioaktivitas Antibakteri Fraksi Protein dari Spons *Clathria reinwardtii*** dapat terselesaikan dan hadir sebagaimana adanya.

Salawat dan salam kepada Baginda Nabiullah Muhammad SAW, yang membawa pencerahan dan rahmah sehingga dunia ini bisa menikmati cahaya Ilahi.

Penghargaan dan pengabdian kupersembahkan untuk kedua orang tua tercinta Ayahanda **Atik Hadi** dan Ibunda **Nirwana *Who Always Teach Me to be Who I am***, juga untuk adik-adikku tercinta **Ila, Ikbal dan Iis**.

Terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Bapak Prof. Dr. Ahyar Ahmad selaku Pembimbing Utama, Bapak Drs. Abdul Karim, Msi selaku Pembimbing Pertama yang telah berkenan meluangkan waktu tenaga, dan pikiran dalam membimbing dan memberikan petunjuk yang begitu berharga dari awal persiapan penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Penulis juga menghaturkan terima kasih dan penghargaan sedalam-dalamnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Alfian Noor, MSc selaku Dekan Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin beserta staf pegawai.

2. Ibu Dr. Hj. Nursiah Lanafie, MSc dan Ibu Dr. Nunuk Hariani S., MS masing-masing selaku ketua dan sekretaris Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNHAS, Dosen-dosen Jurusan Kimia yang telah membagi ilmunya kepada penulis beserta staf atas pelayanan administrasi akademik selama mengikuti pendidikan.
3. Tim Penguji Ujian Sarjana Kimia Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS (Ketua), Drs.Syahrudin Kasim, Msi (Sekretaris), Prof. Dr. Ahyar Ahmad. (Ex. Officio), Drs. Abdul Karim, MSi (Ex. Officio) Dra. Asmawati (Anggota) dan Dra. Fauziah, MSi. (Anggota), Atas saran dan kritiknya demi kesempurnaan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Dr. Abd. Rauf Patong selaku Kepala Laboratorium Biokimia atas ijin pemakaian Laboratorium dan kak anti selaku analis atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.
5. Rekan sepenelitian spons crew, **Ema** dan **Ria** senang memiliki partner seperti kalian dan semoga kita dapat menjadi pengusaha Antibakteri masa depan juga kepada **Kak Eca** terima kasih atas bantuannya di mikrobiologi.
6. Saudara-saudariku angkatan 2004 FMIPA UNHAS: Fisika 04, Math 04, Biologi 04 dan teman-teman Kimia 04 : Analitik Crew (nidar, deasy, ira, ika, cici, tanzil, maman, Ama, Ana, Dayat, Erna), Biokimia Crew(nonoq, astin, Abhy, Hendra, Nov, Dian, Helma, Hanna dan Umroh), KF crew (Nisa, Nanang, Asbia), Organik Crew(ratih, Muis, Wawa, Eni) Anorganik Crew (Asra, Ella), kiki, Sripin, Akbar, Yohan, Uni, Aslan, cory, Anto, Andry. Terima kasih membiarkanku mengenal, memahami dan merasakan indahnyanya kebersamaan dengan kalian kawan-kawan, walau kadang

senyum dan tawa susah tapi kubahagia karena kalianpun susah untuk dilupakan.

7. Kakak-kakak angk. 00,01,02,03 se-FMIPA UH dan Ade-adeku angkatan 05, 06, 07, 08 FMIPA UH juga “Batu 07”, Terima Kasih untuk Semangat dan dukungan kalian kepada penulis.
8. Anggota Maperwa dan DPMK FMIPA UNHAS 2007-2009 terima kasih dan maaf jika selama ini saya kurang Loyal, tetap semangat buat kalian semua dan ingat “*Hiduplah untuk memberi sebanyak-banyaknya, bukan menerima sebanyak-banyaknya*”.

Penulis sadar akan kekurangan dalam skripsi ini baik materi maupun teknik penulisannya. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dalam perbaikan skripsi ini.

Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan wawasan bidang ilmu kimia secara umum dan bidang ilmu Biokimia khususnya.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Penelitian kemampuan daya hambat fraksi protein yang diisolasi dari spons *Clathria reinwardtii*. terhadap pertumbuhan bakteri patogen yang diambil dari pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan telah dilakukan. Protein tersebut diisolasi menggunakan buffer Tris (hidroksimetil) amino metana. Fraksinasi protein dari ekstrak kasar menggunakan metode salting out dengan penambahan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60% dan 60-80%. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan. Kadar protein ditentukan berdasarkan metode Lowry dengan konsentrasi protein tertinggi terdapat pada fraksi 0-20% yaitu 4,32 mg/mL dari 500 gram berat segar. Pengujian daya hambat dilakukan dengan metode difusi agar berlapis pada medium MHA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri terkuat terdapat pada fraksi 0-20 % terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida* dengan zona diameter hambatan masing-masing 22,85 mm dan 22,40 mm. Pengujian daya hambat pada fraksi optimal dilakukan pada konsentrasi 4000, 3000, 2000, 1000 dan 500 µg/mL. Hasil Penelitian menunjukkan aktivitas antibakteri terkuat terdapat pada konsentrasi 4000 µg/mL dengan zona diameter hambatan 13,45 dan 21,6 terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida*. Dari hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa protein bioaktif spons *Clathria reinwardtii* berpotensi sebagai bahan dasar obat antibakteri yang baru, khususnya terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida*.

Kata Kunci: antibakteri; fraksi protein; metode Lowry; spons; *Clathria reinwardtii*

## ABSTRACT

A research has been conducted to study the ability of protein fraction isolated from sponge *Clathria reinwardtii*, taken from Barang Lompo Island located in South Sulawesi in inhibiting the growth of pathogenic bacteria. The fraction was isolated by using buffer of 0.1 M Tris (hydroxymethyl) amino methane. Fractionation of protein from the crude extract used a salting-out method by adding ammonium sulphate at saturation levels of 0–20%, 20–40%, 40–60% and 60–80%. Protein was purified by a dialysis method using a cellophane membrane. The protein content was determined by the Lowry method. The highest protein concentration was found at 0–20% fraction, i.e. 4,32 mg/mL from 500 g fresh weight. The inhibition test was conducted by a layered gel diffusion method in a medium of MHA. Results showed that the highest anti-bacterial activity was observed at the 0-20 % fraction with the inhibition zone diameter of 22,85 mm and 22,40 mm to *Salmonella pullorum* and *Pasteurella multocida*. The inhibition test at the optimal fraction by concentration 4000, 3000, 2000, 1000 dan 500 µg/mL. Results showed that the highest anti-bacterial activity was observed at the 4000 µg/mL concentration with the inhibition zone diameter of 13,45 mm and 21,6 mm to *Salmonella pullorum* and *Pasteurella multocida*. The results indicated that bioactive proteins from *Clathria reinwardtii* have a potency to be used as basic materials for new antibacterial drugs, specially to *Salmonella pullorum* and *Pasteurella multocida*.

Keywords: antibacterial; protein fraction; Lowry method; sponge; *Clathria reinwardtii*

## DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA.....	v
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Maksud Penelitian.....	4
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Uraian Spons .....	5
2.2 Spons <i>Clathria reinwardtii</i> .....	9
2.3 Senyawa Bioaktif Spons .....	9
2.4 Senyawa Antibakteri .....	11
2.5 Tinjauan Bakteri Uji.....	16

2.5.1 <i>Eschericia coli</i> .....	16
2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.5.3 <i>Salmonella pullorum</i> .....	16
2.5.4 <i>Pasteurella multocida</i> .....	17
2.6 Metode Isolasi dan Pemurnian Protein .....	17
2.6.1 Isolasi .....	17
2.6.2 Ekstraksi .....	17
2.6.3 Salting Out.....	18
2.6.4 Dialisis.....	19
2.7 Agen Antibakteri yang Digunakan .....	19
2.7.1 Kloramphenikol .....	19
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
3.1 Bahan Penelitian.....	21
3.2 Alat Penelitian.....	21
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian .....	22
3.4 Penyiapan dan Perlakuan Sampel .....	22
3.5 Metode Kerja .....	22
3.5.1 Preparasi Sampel .....	22
3.5.2 Fraksinasi .....	23
3.5.3 Dialisis.....	23
3.6 Penentuan Kadar Protein.....	23
3.7 Pembuatan Medium.....	23
3.7.1 Medium Pertumbuhan Bakteri Uji .....	23
3.7.1.1 Pembuatan Medium Nutrien Agar (NA).....	23

3.7.1.2 Pembuatan Medium Muller Hinton Agar (MHA).....	24
3.8 Penyiapan Bakteri Uji .....	24
3.8.1 Peremajaan Bakteri Uji .....	24
3.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji .....	24
3.9 Pembuatan Larutan Kontrol .....	25
3.9.1 Pembuatan Larutan Kontrol Positif .....	25
3.9.2 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif .....	25
3.10 Pengujian Aktivitas Antibakteri .....	25
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
4.1 Ekstraksi, Isolasi dan Penentuan Kadar Protein dari Spons ..	27
4.2 Uji Bioaktivitas Antibakteri Fraksi Protein Hasil Dialisis .....	29
4.3 Uji Inhibisi dengan Berbagai Konsentrasi Protein Bioaktif pada Fraksi Optimal .....	33
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan.....	36
5.2 Saran.....	36
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>37</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>41</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Pola distribusi protein pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan Amonium Sulfat. ....	29
2. Bioaktivitas ekstrak kasar dan fraksi protein dari spons <i>Clathria reinwardtii</i> pada beberapa bakteri uji selama 1x24 jam dan 2x24 jam .....	30
3. Bioaktivitas Berbagai Konsentrasi dari Fraksi Protein 0-20% terhadap bakteri <i>Salmonella pullorum</i> dan <i>Pasteurella multocida</i> .....	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur Bunga Karang (Spons) .....	6
2. Morfologi <i>Clathria reinwardtii</i> .....	9
3. Interaksi antara bakteri, antibakteri dan hospes .....	12
4. Struktur Laktoperoksidase .....	13
5. Struktur primer lisosim yang diisolasi dari putih telur .....	15
6. Struktur Kloramphenikol .....	20
7. Diagram zona hambatan antibakteri fraksi protein .....	31
8. Diagram zona hambatan pada variasi konsentrasi .....	34

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan kerja isolasi, pemurnian dan uji bioaktivitas protein bioaktif dari spons .....	41
2. Skema kerja fraksinasi protein bioaktif dengan amonium sulfat .....	42
3. Skema kerja dialisis.....	43
4. Prosedur pengujian kadar protein sampel .....	44
5. Skema kerja uji antibakteri.....	45
6. Penentuan kadar protein dengan metode lowry .....	46
7. Pembuatan Larutan Buffer .....	47
8. Penentuan serapan maksimum ( $\lambda$ maks) .....	49
9. Kurva kalibrasi larutan standar protein (BSA) pada $\lambda = 710$ nm....	50
10. Pengukuran kadar protein pada setiap tahap pemurnian spons <i>Clathria reinwardtii</i> .....	51
11. Penentuan total protein pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan .....	52
12. Jumlah Amonium Sulfat yang ditambahkan dan volume suspensi endapan yang diperoleh pada setiap fraksi spons <i>Clathria reinwardtii</i> ..	53
13. Foto dan klasifikasi <i>Clathria reinwardtii</i> .....	54
14. Foto lisis sel dan dialisis sampel <i>Clathria reinwardtii</i> .....	55
15. Foto Bioaktivitas Antibakteri dari Protein spons <i>Clathria reinwardtii</i> pada Beberapa Fraksi Amonium Sulfat.....	56
16. Foto Bioaktivitas Antibakteri dari Protein spons <i>Clathria reinwardtii</i> pada Fraksi Optimal terhadap bakteri <i>Salmonella pullorum</i> dan <i>Pasteurella multocida</i> .....	58
17. Tabel penambahan ammonium sulfat pada fraksinasi protein bioaktif...	59
18. Peta lokasi pengambilan sampel spons.....	60

## DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

A	: Absorbansi
$\alpha$	: Alpha
$\mu\text{g}$	: mikrogram
$\beta$	: beta
BSA	: Bovine Serum Albumin
HIV	: human immunity virus
M	: molar
MHA	: Muller Hilton Agar
mL	: mililiter
NA	: nutrien agar
PDA	: potato dekstrosa agar
pH	: potensial hidrogen
ppm	: part per million
<i>sp.</i>	: spesies
$\mu\text{m}$	: micrometer
KMI	: Konsentrasi Minimum Inhibisi

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia sebagai Negara kepulauan dengan dua pertiga wilayahnya berupa perairan memiliki banyak jenis kekayaan hayati laut seperti terumbu karang. Sekitar 25 sampai 30 % terumbu karang dunia ada di wilayah Asia Tenggara dan sebagian besar terumbu karangnya terdapat di Indonesia dan Filipina. Terumbu karang di daerah tropis merupakan suatu ekosistem yang khas, mempunyai produktivitas senyawa organik yang sangat tinggi termasuk keanekaragaman biota laut yang hidup di dalamnya.

Seiring dengan perubahan pola penyakit yang ada, maka usaha penemuan obat-obat baru terus dilakukan dan saat ini penelitian cenderung dikembangkan ke arah laut karena sebagian sumber daya alamnya belum dieksploitasi (Nybakken, 1993) Empat per lima jumlah organisme yang ada di dunia ini terdapat di laut, antara lain terdiri dari ikan, spons, karang lunak, echinodermata, ascidian dan tunicates. Beberapa jenis organisme tersebut merupakan sumber vitamin, protein dan mineral. Selain itu, ada juga beberapa organisme yang mensintesis dan menyimpan senyawa toksin yang disebut *marine toxin* pada bagian tubuhnya atau dikeluarkan ke lingkungan hidupnya.

Pengembangan obat baru yang berasal dari biota laut, saat ini menjadi perhatian seluruh peneliti kimia bahan alam. Tingginya keanekaragaman hayati laut dan uniknya struktur metabolit sekunder yang dihasilkannya, merupakan dua hal yang menjadi daya tarik para ilmuwan (Murniasih, 2005).

Sementara itu, pemahaman akan besarnya potensi kelautan sering kali terbatas hanya pada eksploitasi makroflora dan fauna laut seperti: ikan, udang, kerang-kerangan dan rumput laut yang dikategorikan sebagai *tangible resources* atau sumber daya yang dapat dipanen untuk selanjutnya secara langsung dapat dikomersialkan. Sedangkan sumber daya hayati laut lainnya yang *intangible* seperti: mikroflora dan fauna laut contohnya sponge dengan kandungan proteinnya relatif belum terjamah (Effendi, 2002).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi dewasa ini menemukan adanya perubahan pola dan resistensi kuman penyakit terhadap antibiotik yang telah ada saat ini. Resistensi kuman penyakit salah satu penyebabnya adalah terjadinya mutasi gen. Timbulnya mutan-mutan baru sering mengakibatkan penggunaan antibiotik harus dengan dosis yang lebih tinggi. Namun, apabila hal tersebut dilakukan maka dapat mengakibatkan efek samping yang tidak dikehendaki seperti nyeri perut, demam, pembengkakan hati, berkurangnya sekresi ginjal dan lain-lain. Untuk mengatasi masalah tersebut maka usaha penemuan obat antibiotik baru terus dilakukan (Ahmad dkk, 2006).

Spons sering juga disebut bunga karang organisme multiseluler yang termasuk dalam filum porifera. Porifera berarti hewan yang mempunyai tubuh dengan struktur berpori dengan banyak permukaan yang terbuka tidak mempunyai otot, saraf, dan organ-organ internal lainnya.

Salah satu jenis spons yang akan dimanfaatkan sebagai antibakteri adalah *Clathria reinwardtii*, spons ini termasuk ke dalam hewan kelas demospongiae (Kozloff, 1990). Spons ini diperoleh di perairan sekitar pulau Barrang Lompo

yang terkenal dengan keanekaragaman spesies spons yang melimpah (Rahman, 2004).

Beberapa jenis senyawa protein seperti *manopeptimycins*, *glycopeptides* yang berasal dari actinomycete spesies *Streptomyces hygroscopicus* telah ditemukan memiliki sifat sebagai antibakteri, *manopeptimycins* terdiri dari dua bentuk stereoisomer yaitu  $\alpha$ -amino  $\beta$ -[4'-(2'-iminoimidazolidinyl)]- $\beta$ -hydroxypropionic acid dan glycosylated cyclic hexapeptides, hal ini menunjukkan bahwa *manopeptimycins* berinteraksi dengan precursor lipid pada dinding sel bakteri dengan mengikat *teichoic acid* yang menyebabkan senyawa tersebut terakumulasi pada permukaan sel bakteri (Ruzin dkk, 2004). Selain itu, ada banyak senyawa protein lainnya yang ditemukan bersifat sebagai antibakteri antara lain laktoperoksidase, laktoferin, NAGase, lisosim dan defensin (Naim, 2003).

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Rahman dan Ridhay (2004) dengan menggunakan beberapa jenis spons termasuk *Clathria reinwardtii* dengan perlakuan ekstraksi dengan kloroform (non polar) pada pengujian inhibisinya terhadap jamur dan bakteri tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diduga ada senyawa lain yang bersifat polar seperti protein yang kemungkinan memiliki aktivitas antibakteri, untuk itu pada penelitian ini digunakan buffer Tris untuk mengekstrak senyawa polar kelompok protein dari spons *Clathria reinwardtii* sebagai bahan antibakteri yang baru.



## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun yang menjadi permasalahan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah dalam spons *Clathria reinwardtii* mengandung metabolit bioaktif dari kelompok senyawa protein.
2. Apakah Fraksi protein dalam spons *Clathria reinwardtii* memiliki aktivitas antibakteri.

## 1.3 Maksud dan Tujuan

### 1.3.1 Maksud Penelitian

Adapun maksud dari penelitian ini adalah mengetahui daya hambat protein bioaktif spons *Clathria reinwardti* terhadap bakteri patogen.

### 1.3.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengisolasi dan memurnikan protein bioaktif dari spons *Clathria reinwardti*
2. Menentukan fraksi protein yang efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang aktivitas antibakteri fraksi protein dari spons *Clathria reinwardti* dimana protein tersebut dapat berfungsi sebagai bahan dasar obat antibakteri

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Uraian Spons

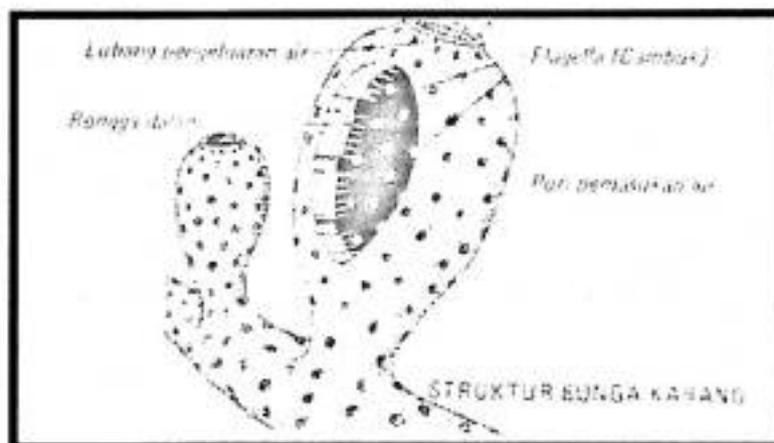
Spons atau sponge merupakan kelompok hewan yang paling sederhana diantara seluruh penghuni laut. Dalam struktur taksonomi, spons merupakan nama lain dari filum porifera. Porifera berarti pemilik pori-pori atau pore bearers (Y: *poros* = pori atau saluran; Latin (L): *feres* = memiliki). Melalui pori-pori dan saluran-saluran ini, air diserap oleh khusus yang dinamakan sel leher (*collar cell*), yang dalam banyak hal menyerupai cambuk. Jenis sel ini lebih pantas dinamakan koanosit (*choanocyte*; Y: *choane* = cerobong; *kytos* = berongga), yakni nama menurut anak-kelompok dari Flagelata, Choanoflagelata. Filum hewan ini lebih dikenal sebagai spons (Romimohtarto dan Juwana, 2005). Dengan tubuh yang diselimuti oleh jutaan pori-pori, spons merupakan hewan lunak yang menyerap air dan menyaring bahan organik dalam air laut sebagai bahan makanannya. Baik bentuk maupun warna dari spons sangat beragam, mulai dari yang berbentuk seperti tabung, gumpalan, hingga seperti mangkok besar. Warnanya pun juga demikian, mulai dari coklat pucat hingga merah menyala. Struktur spons yang hanya ditopang oleh spikula-spikula fiber, membuat tubuhnya agak lentur, namun tetap dapat bersiri tegak dan kokoh (Anonim, 2006).

Spons (Porifera) tergolong hewan multiseluler primitif dan diduga berasal dari zaman Paleozoik sekitar 1,6 juta tahun yang lalu (Amir dan Budiyanto, 1996; Romimohtarto dan Juwana, 1999).

Spons merupakan biota laut yang multiseluler primitive (metazoan) tanpa jaringan nyata, yang merupakan sumber metabolit sekunder terkaya (Eru, 2005 dan Romimoharto, 2001).

Jumlah penyebarannya sangat banyak, ada 15.000 spesies spons laut diseluruh dunia dan sekitar 45% senyawa bioaktif laut ditemukan pada spons laut (Anonim, 2006).

Adapun morfologi umum dari spons seperti gambar di bawah ini (Koen, 1985) :



Gambar 1. Struktur Bunga Karang (Spons).

Spons atau disebut juga bunga karang mempunyai perkembangan bentuk yang menarik dan dipengaruhi oleh kondisi sekelilingnya seperti aliran air, tekanan, dan kandungan garam. Kadang-kadang suatu bunga karang yang berbentuk tidak teratur dapat berubah menjadi bentuk plastis dan kompleks. Warnanya pun dapat bermacam-macam antara lain abu-abu, merah cerah, orange, kuning biru, violet bahkan hitam (Hooper, 1997).

Bunga karang berkompetisi untuk menyingkirkan predator-predator dengan cara meracuninya menggunakan zat kimia karena ia tidak dapat menggigit, menyengat atau melarikan diri. Banyak bunga karang yang menghasilkan bahan kimia beracun dan dapat melepaskannya secara aktif ke

dalam daerah pertumbuhannya untuk meracuni karang dan hewan lainnya yang cenderung tumbuh melebihi bunga karang. Bahan kimia yang poten secara khusus memberikan banyak perlindungan untuk melawan predator, tetapi jika predator memiliki beberapa enzim yang dapat mendetoksifikasi bahan kimia tersebut, maka predator memiliki keuntungan untuk mengeksploitasi bunga karang. Bunga karang di bawah tekanan yang selektif menghasilkan racun poten yang banyak, dan predator di bawah tekanan selektif mengembangkan beberapa bahan detoksifikasi racun yang lebih baik. Efek akhir dari bunga karang merupakan kekebalan yang absolut tetapi masih ada predator yang dapat memakannya. Predator tidak dapat memakan apapun karena memiliki keterbatasan produksi detoksifikasi. Kedua spesies ini mendekati batasnya dan hanya memiliki kapasitas metabolik juga untuk menghasilkan racun atau enzim detoksifikasi (Kennish, 1989; Hooper, 1997; Kelly, 2001).

Menurut Kozloff (1990), bunga karang dapat diklasifikasikan berdasar pada pengelompokan secara umum dan komponen rangka yang dimiliki, yaitu:

1. Kelas *Calcarea* atau *Calcispongiae*

Merupakan bunga karang yang hidup di daerah pantai yang dangkal, bentuk tubuhnya sederhana. Spikula bunga karang ini tersusun dari kalsium karbonat dan tidak mengandung spongin. Sebagian besar bunga karang dari kelas ini bentuknya kecil-kecil dan berwarna putih keabu-abuan, dan ada beberapa jenis berwarna kuning, merah jambu atau hijau. Elemen kerangka dari kelas *Calcarea* berbentuk spikula "triaxon" dan tidak ada perbedaan megasklera dan mikrosklera.

Jenis bunga karang ini antara lain *Sycon gelatinosum* (berbentuk silinder berwarna coklat muda), *Clathrina sp.* dan *Leucetta sp.* Bunga karang ini jumlahnya sedikit, lebih kurang hanya 10% dari jumlah semua hewan bunga karang yang ada di laut dan terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Asconosa* dan ordo *Syconosa*.

## 2. Kelas Hexactinellida atau Hyalospongiae

Merupakan bunga karang yang hidup di daerah yang dalam dengan ketinggian 0,5 meter bahkan ada yang dapat tumbuh hingga 1 meter dan disebut juga bunga karang gelas. Spikula terdiri dari silikat dan tidak mengandung spongin. Spikulanya berbentuk bidang "triaxon", di mana masing-masing bidang terdapat dua jari-jari (Hexactinal).

Bunga karang dari kelas ini belum banyak dikenal, karena sulit mendapatkan dan hanya terdapat di laut dalam. Bunga karang ini terdiri dari 2 ordo, yaitu ordo *Hexastrophora* dan ordo *Amphidiscophora*. Contohnya *Euplectella sp.* dan *Aspergillum sp.*

## 3. Kelas Demospongiae

Hampir 75% jenis bunga karang yang dijumpai di laut termasuk dalam kelas Demospongiae. Bunga karang ini tidak memiliki spikula "triaxon" (spikula kelas Hexactinellidae), tetapi spikulanya berbentuk "monaxon", "teraxon" yang mengandung silikat. Beberapa jenis bunga karang kelas ini ada yang tidak mengandung spikula tetapi hanya mengandung serat-serat kolagen atau spongin saja, seperti *Cliona sp.* dan *Spongia sp.*

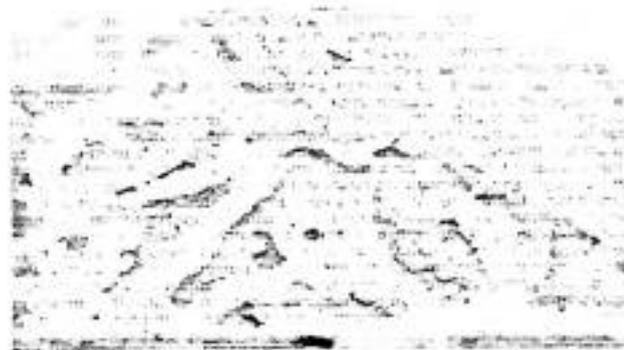
Kelas ini terdiri atas 8 ordo, yaitu *Carnosa*, *Choristida*, *Epipolasida*, *Hadromerida*, *Halicondrina*, *Poeciloclerina*, *Haploscerina*, dan *Keratosa*.

## 2.2 Spons *Clathria reinwardtii*

*Clathria reinwardtii* adalah salah satu jenis spons yang termasuk ke dalam kelas demospongiae. Spons jenis ini tidak memiliki spikula triaxon tetapi spikulanya berbentuk monaxon, teraxon yang mengandung silikat (Kozloff, 1990).

Taksonomi dari *Clathria reinwardtii* :

Filum : Porifera  
Kelas : Demospongiae  
Subkelas : Ceractinomorpha  
Ordo : Poeciloclerina  
Sub Ordo : Microcionina  
Family : Microcionidae  
Genus : *Clathria*  
Spesies : *Clathria reinwardtii*



Gambar 2. Spons *Clathria reinwardtii*

(Erhardt dan Moosleitner, 1995).

## 2.3 Senyawa Bioaktif Spons

Senyawa bioaktif diartikan sebagai senyawa kimia bahan alam yang mempunyai aktivitas biologi yang berguna. Spons merupakan sumber penghasil senyawa bioaktif terbesar diantara invertebrata laut lainnya (Muniarsih, 2005).

Ekstrak metabolit dari spons mengandung senyawa bioaktif yang diketahui mempunyai sifat aktivitas seperti: respirasi, kardiovaskuler, gastrointestinal, dan antibiotik (Anonim, 2007); sitotoksik dan antitumor (Kobayashi dan Rachmaniar, 1999); antivirus (Munro dkk., 1989); anti HIV dan antiinflamasi (Proksch, 1999); antifungi (Muliani dkk., 1998); antibakteri (Ireland dkk., 1989; Munro dkk., 1989;

Muniarsih dan Rachmaniar, 1999); antileukemia (Soediro, 1999); antimalaria (Konig dan Wright, 1999); dan penghambat aktivitas enzim (Soest dan Braekman, 1999).

Menurut Harper dkk., (2001) dalam Darwis (2007) bahwa dalam dekade terakhir, dilaporkan bahwa sebanyak 50% senyawa bioaktif yang ditemukan dalam invertebrata laut, berasal dari filum porifera. Produksi metabolit sekunder dari spons merupakan kompensasi akibat interaksi dengan lingkungan biotik, abiotik dan sebagai senjata kimia terhadap predator. Salah satu pemicu produksi senyawa terpenoid, poliketida dan alkaloid oleh spons adalah adanya kompetisi dengan koral dan untuk mencegah infeksi bakteri patogen. Selain sebagai sumber senyawa bioaktif untuk keperluan industri farmasi dan industri kimia lainnya, spons juga dapat dimanfaatkan sebagai alat mandi, indikator biologi untuk pemantauan pencemaran laut, terutama logam berat dan pestisida (Amir, 1991), indikator dalam interaksi komunitas (Bergquist, 1978), dan sebagai hewan penting untuk akuarium laut (Riseley, 1971; Warren, 1982).

Selain itu, spons juga memproduksi senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang bermanfaat dalam bidang pertanian, industri dan pengobatan serta dalam proses pencernaan secara enzimatik, terutama untuk mencerna bakteri sebagai sumber nutrisi baginya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons tidak hanya bermanfaat untuk proses pencernaan makanannya, tetapi kandungan kimianya juga mampu menangkal dan menghambat pertumbuhan mikroba patogen yang mengganggu kelangsungan hidupnya (Bernes, 1980).

Spons tidak memiliki sistem susunan saraf, sehingga respons yang muncul karena rangsangan lingkungan, merupakan respon masing-masing sel individu.

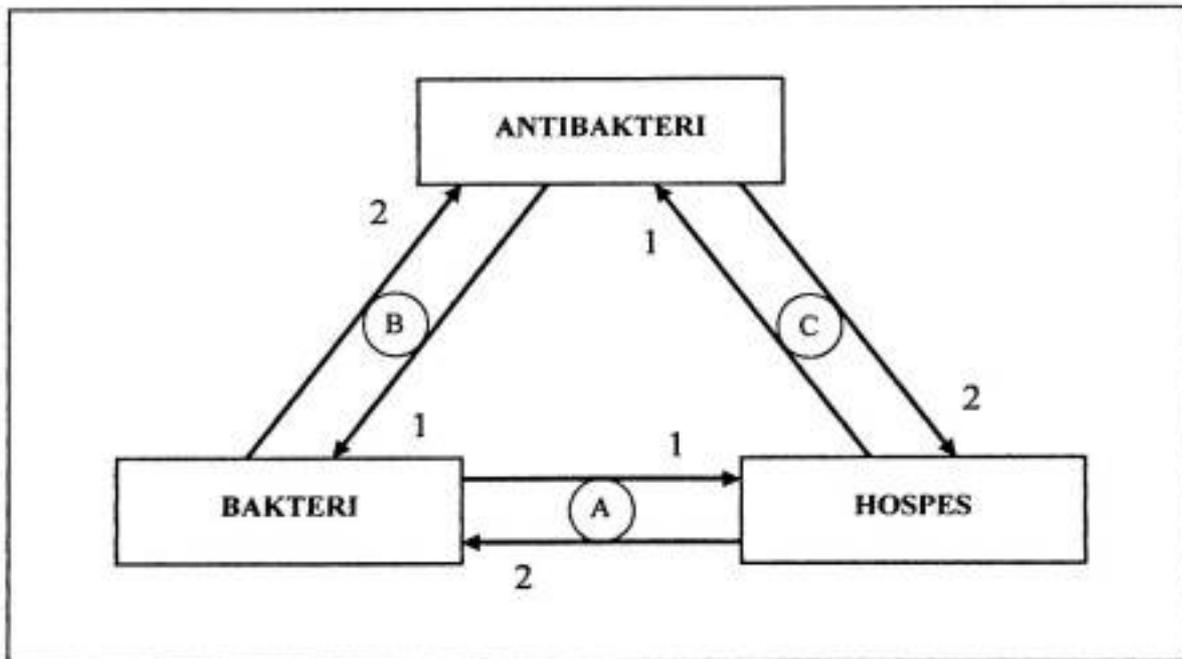
Pertahanan diri spons, kemungkinan dengan senyawa kimia aktif metabolik sekunder yang dihasilkan, sebagai penolak terhadap parasit maupun mikroba yang ada disekelilingnya (Yasman, 2003). Zat kimia tersebut kemungkinan berpengaruh terhadap kuman patogen, sel kanker atau penyakit-penyakit manusia lainnya (Setyowati dkk., 2003).

## 2.4 Senyawa Antibakteri

Antibakteri adalah obat untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Obat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut harus bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksis untuk hospes. Dalam penggunaannya ada tiga faktor yang berperan, yaitu bakteri sebagai agen patogen, hospes dalam hal ini manusia yang terinfeksi, dan antibakteri sebagai obat. Ketiga faktor tersebut saling berinteraksi dan dikemukakan secara sederhana dalam Gambar 3 (Doerge, 1982; Gan, 1989).

Aktivitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja, daya kerja, konsentrasi minimum untuk inhibisi (KMI) dan potensi pada KMI. Suatu antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi bila KMI terjadi pada kadar antibakteri yang rendah tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar. Pada percobaan secara *in vitro* dengan metode difusi agar, hal ini dapat dilihat pada besar diameter zone inhibisi pertumbuhan bakteri di sekeliling antibakteri. Bila pada kadar yang rendah dapat memberikan diameter zona inhibisi yang luas dan bening di sekeliling antibakteri, maka hal ini menunjukkan

bahwa antibakteri tersebut berpotensi tinggi terhadap bakteri uji yang digunakan (Gan, 1989; Wattimena, 1991).



Gambar 3. Interaksi antara antibakteri, bakteri dan hospes (Gan, 1989).

Keterangan :

- A. **Interaksi bakteri-hospes:** 1. Patogenitas bakteri sebagai penyebab pada hospes; 2. Reaksi daya tahan hospes untuk mengatasi/membasmi bakteri. Reaksi ini terjadi dengan proses fagositosis dan reaksi imun yang dapat disertai proses peradangan.
- B. **Interaksi antibakteri-bakteri:** 1. Aktivitas antibakteri dalam membasmi bakteri; 2. Sifat sensitivitas atau resistensi bakteri terhadap antibakteri.
- C. **Interaksi antibakteri-hospes:** 1. Farmakokinetik obat di dalam tubuh hospes; 2. Farmakodinamik obat terhadap tubuh hospes.

Aktivitas suatu antibakteri secara *in vitro* tidak selalu mempunyai aktivitas yang setara secara *in vivo*. Secara *in vivo*, antibakteri harus mampu mencapai tempat infeksi dalam konsentrasi yang memadai untuk mereproduksi aktivitas *in vitro* dan ditunjang oleh sistem pertahanan tubuh agar dapat membasmi bakteri penginfeksi (Wattimena, 1991).

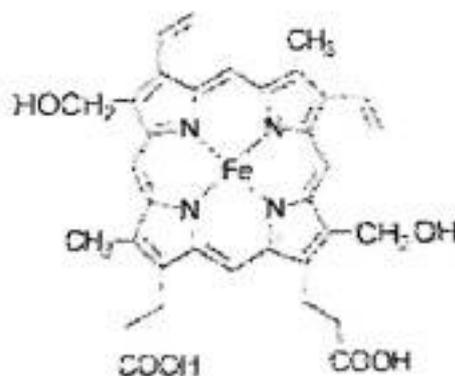
Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dapat dibagi dalam lima kelompok, yaitu: 1) yang mengganggu metabolisme sel bakteri; 2) yang menghambat sintesis dinding sel bakteri; 3) yang merusak keutuhan membran sel bakteri; 4) yang menghambat sintesis protein sel bakteri; dan 5) yang

menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Gan, 1989; Wattimena, 1991).

Adapun jenis - jenis protein antibakteri yang berhasil di isolasi dari sel mahluk hidup antara lain :

### 1. Laktoperoksidase

Laktoperoksidase adalah enzim peroksidase yang dapat membunuh bakteri dengan mekanisme oksidatif. Aktifitas peroksidase terdapat dalam berbagai sekresi kelenjar eksokrin yang telah dapat diisolasi dari saliva, air mata dan sekresi bronkhial. Laktoperoksidase sendiri tidak memiliki aktifitas antibakterial namun bersama-sama dengan hidrogen peroksida dan tiosianat membentuk suatu sistem anti bakterial alami. Pengaruh antibakterial dari sistem laktoperoksidase diperantarai oleh reaksi hidrogen peroksida dan thiosianat dengan katalis enzim laktoperoksidase yang menghasilkan hipotiosianat yang berumur relatif pendek yang merupakan substansi antibakterial utama. Sifat antibakterial dari sistem ini berdasarkan hambatan enzim metabolik bakterial yang vital oleh hipotiosianat (Naim, 2003).



**Gambar 4.** Struktur laktoperoksidase (Voet dan Voet, 2004).

## 2. Laktoferin

Laktoferin adalah sejenis glikoprotein pengikat besi yang merupakan suatu substansi yang termasuk kedalam famili sitokin (Cytokine) bertanggungjawab mengkoordinasi respon seluler yang memproteksi sel dari proses infeksi bakteri. Kemampuan yang unik dari laktoferin untuk mengikat besi mineral esensial yang digunakan oleh sejumlah patogen untuk reproduksi dan pertumbuhan. Selain itu laktoferin juga memiliki kemampuan untuk metabolisme karbohidrat dari bakteri atau aktifitas ribonuklease yang menghambat kemampuan bakteri untuk mensintesis RNA yang esensial untuk sintesa protein bakteri. Sejumlah data telah mendukung aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal laktoferin. Contoh dari bakteri yang dihambat oleh laktoferin meliputi bakteri dengan kebutuhan besi tinggi (*coliform*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*), *Staphylococcus aureus*, spesies *Bacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Helicobacter pylori* ( Naim, 2003).

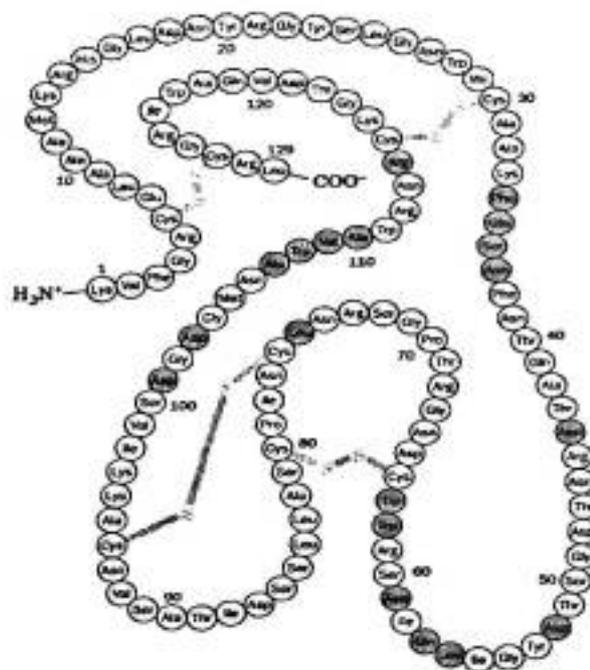
## 3. NAGase (N- Acethyl Glucosamine)

NAGase merupakan enzim yang memiliki aktivitas yang berimplikasi sebagai suatu indikator dari kerusakan jaringan selama mastitis. Protein ini merupakan enzim lisosomal yang disekresikan dalam jumlah besar pada kelenjar susu selama involusi dan inflamasi. Enzim NAGase juga telah diisolasi pada alat sekresi sapi yang lain seperti cairan uterus. Fungsi spesifik NAGase pada kelenjar susu belum diketahui dengan baik, namun riset telah mengindikasikan bahwa NAGase mungkin memperlihatkan aktivitas antimikroba. Para peneliti telah mempelajari efek bakterisidal dari NAGase pada beberapa bakteri patogen yang umum ditemukan pada uterus sapi, seperti *Actinomyces pyogenes*,

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. NAGase telah menghambat bakteri tersebut, tetapi spesies *E.coli* dan *Enterobacter aerogenes* tidak dihambat (Naim, 2003).

#### 4. Lisosim

Lisosim adalah suatu protein enzim yang memiliki kemampuan untuk melisis dinding sel bakteri. Protein ini telah berhasil diisolasi dari putih telur ayam, pada ASI, dan pada susu sapi. Enzim ini efektif membunuh *Escherichia Coli* (Naim, 2003).



**Gambar 5.** Struktur primer lisosim yang diisolasi dari putih telur (Voet dan Voet, 2004).

#### 5. Defensin

Defensin adalah suatu protein anti mikrobal alami (*Natural antimicrobial protein*) yang merupakan peptida kationik kecil dengan aktifitas anti bakteri yang sangat luas, yang berperan dalam pertahanan sel tubuh dengan cara mematahkan

struktur atau fungsi membran sitoplasma mikroba. Defensin mempunyai aktivitas antimikroba pada *E.coli*, *Salmonella typhymurnium*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* (Setiono, 2002).

## 2.5 Tinjauan Bakteri Uji

### 2.5.1 *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* berbentuk batang, Gram negatif, fakultatif aerob, tumbuh baik pada media sederhana. Dapat melakukan fermentasi laktosa dan fermentasi glukosa, serta menghasilkan gas. *Escherichia coli* merupakan flora normal di dalam usus manusia dan akan menimbulkan penyakit bila masuk ke dalam organ atau jaringan lain. *Escherichia coli* dapat menimbulkan pneumonia, endocarditis, infeksi pada luka-luka dan abses pada berbagai organ. *Escherichia coli* merupakan penyebab utama meningitis pada bayi yang baru lahir (Entjang, 2003).

### 2.5.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcosis adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Penyakit secara normal dapat ditemukan pada permukaan kulit, selaput lendir dan juga di dalam ransum. Genus staphylococcus adalah bakteri berbentuk bulat atau lonjong yang biasanya tersusun bergerombol seperti buah anggur. Bakteri bersifat gram positif, tidak berspora, tidak bergerak dan umumnya tidak berkapsul (Entjang, 2003).

### 2.5.3 *Salmonella pullorum*

Pullorum adalah suatu penyakit infeksi akut atau kronis pada unggas yang disebabkan oleh *Salmonella pullorum*. Tanda-tandanya adalah diare putih dan

adanya nekrosis jarum di beberapa organ. Masa tunas terjadi antara 4-5 tahun tetapi bakteri ini dapat tahan hidup sampai satu tahun di kandang unggas (Budi,1993).

#### **2.5.4 *Pasteurella Multocida***

Kolera unggas adalah penyakit menular pada unggas. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi bakteri *Pasteurella multocida*. Biasanya menyerang ayam pada usia 12 minggu. Serangan penyakit ini bisa bersifat akut atau kronis. Ayam yang terserang kolera akan mengalami penurunan produktivitas bahkan mati. Bakteri ini menyerang pernapasan dan pencernaan. Kolera dapat ditularkan melalui kontak langsung, pakan, minuman, peralatan, manusia, tanah maupun hewan lain. Pada serangan akut, kematian dapat terjadi secara tiba-tiba (Sauvani, 2005).

## **2.6 Metode Isolasi dan Pemurnian Protein**

### **2.6.1 Isolasi**

Isolasi adalah proses pemisahan komponen-komponen kimia yang terdapat dalam suatu ekstrak. Pemisahan ini didasarkan atas sifat adsorpsi dan partisi dari senyawa yang dipisahkan terhadap larutan yang digunakan. Pada umumnya bioaktif dapat diperoleh dengan cara ekstraksi, fraksinasi dan pemisahan secara kromatografi (Harbane, 1987).

### **2.6.2 Ekstraksi**

Ekstraksi bertujuan untuk menarik komponen-komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada

lapisan antar permukaan sel, kemudian berdifusi masuk ke pelarut (Harbane, 1987).

### **2.6.3 Salting Out**

Protein adalah suatu peptida yang mempunyai bobot molekul yang sangat bervariasi dari 5000 hingga lebih dari satu juta. Ada protein yang mudah larut dalam air dan ada pula protein yang sukar larut dalam air. Mendapatkan suatu protein dari bahan alam dalam keadaan murni bukanlah pekerjaan yang mudah. Hal ini disebabkan karena molekul protein tidak stabil terhadap pemanasan serta pelarut organik. Langkah awal pemurnian protein adalah menentukan bahan alam yang akan diproses. Selanjutnya, mengeluarkan protein dari bahan alam tersebut.

Pada umumnya hal ini dilakukan dengan jalan memecahkan sel-sel jaringan secara mekanik. Dalam proses ini, perlu dijaga agar suhu dan pH larutan tidak merusak protein. Pada suhu 40°C protein mudah terdenaturasi, maka pemurnian protein sering dilakukan pada suhu yang rendah, yaitu mendekati titik beku pelarut yang digunakan. Di samping itu, protein juga sensitif terhadap asam atau basa dengan konsentrasi tinggi, dan biasanya pemurnian protein dilakukan pada pH mendekati netral dengan menggunakan larutan buffer tertentu. Setelah diperoleh larutan yang berisi beberapa macam protein maka proses selanjutnya ialah fraksinasi, yaitu memisahkan masing-masing protein dalam campuran secara fraksi demi fraksi. Dua cara yang biasa digunakan untuk proses fraksinasi ini yaitu pengendapan dan kromatografi (Poedjiadi, 1994).

Proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menggunakan amoniumsulfat berkonsentrasi tinggi atau larutan jenuh. Beberapa protein berbeda kelarutannya dalam konsentrasi garam yang berbeda. Cara ini digunakan terutama

bila diinginkan satu macam protein saja, sedangkan protein lain tidak diperlukan (Poedjiadi, 1994). Fraksinasi dengan cara penambahan amoniumsulfat disebut proses salting out, yaitu mengendap karena adanya garam (Sudarmadji dkk, 2003). Selain dengan garam, proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menyesuaikan titik isolistrik protein yang diinginkan. Pada titik isolistrik, kelarutan protein berkurang hingga minimum dan protein yang diinginkan akan mengendap, sedangkan protein lain yang tidak diinginkan tetap dalam larutan. Penggunaan pelarut organik untuk mengendapkan protein juga dapat dilakukan namun untuk menghindari terjadinya denaturasi proses pengendapan dengan cara ini harus dilakukan pada suhu yang rendah (Poedjiadi, 1994).

#### **2.6.4 Dialisis**

Dialisis adalah suatu metode pemisahan molekul besar (seperti pati atau protein) dari molekul kecil (seperti glukosa atau asam amino) dengan difusi selektif melalui membran semipermeabel. Misalnya, jika larutan campuran pati dan glukosa dimasukkan dalam wadah tertutup terbuat dari bahan semipermeabel (seperti selofan), lalu direndam dalam gelas piala berisi air, maka molekul glukosa yang lebih kecil akan melewati membran menuju ke air, sedangkan molekul besar yaitu pati akan tertinggal di dalam wadah (Daintith, 1994).

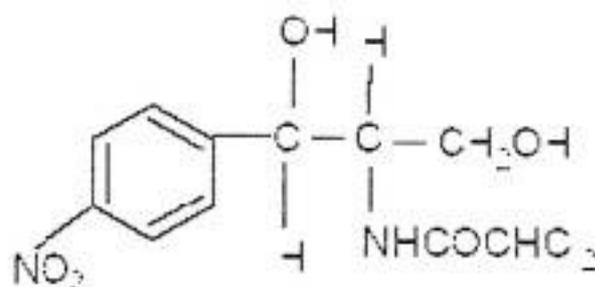
### **2.7 Agen Antibakteri yang digunakan**

#### **2.7.1 Kloramphenikol**

Kloramphenikol berupa hablur halus berbentuk jarum atau lempeng memanjang yg berwarna putih sampai kelabu atau putih kekuningan dan tidak berbau serta berasa sangat pahit (Dirjen POM RI, 1995).

Kloramfenikol adalah jenis antibakteri yang mempunyai aktifitas bakteriostatik, dan pada dosis tinggi bersifat bakterisida. Aktivitas antibakterinya dengan menghambat sintesa protein yang merupakan langkah penting dalam pembentukan ikatan peptida. Kloramfenikol efektif terhadap bakteri aerob gram-positif, termasuk *Streptococcus pneumoniae*, dan beberapa bakteri aerob gram-negatif, termasuk *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas mallei*, *Ps. cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Brucella* dan *Shigella*.

Pada bakteri, kloramfenikol dengan mudah berpenetrasi melewati membran luar sel, karena ukuran molekul lebih kecil. Kloramfenikol juga dapat masuk ke sel eukariotik dan menghambat sintesa protein mitokondria yang dengan cepat dapat mencegah perkembangan (proliferasi) sel hewan dan manusia, dalam hal ini dapat menimbulkan anemia aplastik yang berakibat fatal bagi manusia. Penggunaan kloramfenikol dapat menginduksi terjadinya apa yang disebut sebagai blood dyscrasias yang berarti sel darah abnormal diproduksi atau dapat menghentikan produksi sel darah normal. Adapun rumus struktur dari kloramfenikol ini dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Rumus Struktur Kloramfenikol (Dirjen POM RI, 1995).

## BAB III METODE PENELITIAN



### 3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah spons *Clathria reinwardtii*, biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*, buffer A (0,1 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3, 2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, β-mercaptoetanol 1 %, Triton X-100 0,5 %), buffer B (0,1 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3; 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>), buffer C (0,01 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3, 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>), aquades, medium Nutrien Agar (NA), medium Muller Hinton Agar (MHA), Kloramphenicol, BSA (Bovine Serum Albumin), amonium sulfat, lowry A (Larutan asam phosphotungstat-phosphomolybdat dengan aquades 1:1), lowry B (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 %, NaOH 0,1 N, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1 %, Natrium kalium tartrat 2 %), kapas, aluminium foil, aquades, pasir laut dan tissue roll.

### 3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: Neraca analitik, Spektronik 20D+, inkubator, autoklaf, homogeneiser, pH meter, lemari pendingin, sentrifuse dingin, botol semprot, penangas air, magnetik stirer fisher, cawan petri, kasa steril, pisau, mistar geser, pencadangan dan alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni 2008 di laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Unhas, Laboratorium Bioteknologi Pusat Kegiatan Penelitian (PKP) dan pengambilan sampel spons dilakukan di sekitar Pulau Barang Lompo Sulawesi Selatan.

### 3.4 Penyiapan dan Perlakuan Sampel

Perlakuan terhadap sampel *Clathria reinwardtii* adalah :

1. Pengambilan dan persiapan sampel spons yang diawetkan dalam wadah berisi es batu (*Cool Box*).
2. Ekstraksi dan identifikasi protein bioaktif spons dalam Buffer A
3. Pengujian daya hambat protein bioaktif spons dalam Buffer A terhadap beberapa spesies bakteri (*Staphilococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli*).

### 3.5 Metode Kerja

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

Isolasi protein bioaktif spons menggunakan prosedur dari metode sebelumnya yang dimodifikasi (Schroder dkk., 2003) sebagai berikut. Spesies dari spons yang telah dikoleksi dipotong-potong kecil lalu ditimbang sebanyak 500 g berat segar, dihaluskan dengan blender dengan menggunakan 500 mL pelarut Buffer A disaring dengan menggunakan kain kasa. Kemudian filtrat yang di peroleh dibeku cairkan sebanyak 2-3 kali sebelum uji bioktivitas dan perlakuan selanjutnya.

### **3.5.2 Fraksinasi**

Fraksi yang mengandung protein dan diperkirakan memiliki aktifitas antibakteri difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing: 0 – 20 % , 20 – 40 % , 40 – 60 % dan 60 – 80 % , kemudian disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm.

### **3.5.3 Dialisis**

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat ditambahkan buffer B dan selanjutnya didialisis dalam sejumlah buffer C. Masing-masing fraksi protein tersebut dimasukkan dalam kantong selofan dengan dipastikan bahwa kantong selofan itu tidak bocor atau rusak. Selofan yang telah diisi dengan fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C lalu diaduk dengan pengaduk magnetik stirer. Dialisis terus dilakukan sampai larutan buffer tidak berwarna lagi.

### **3.6 Penentuan Kadar Protein**

Untuk penentuan kadar protein setiap fraksi digunakan metode Lowry dengan bovine serum albumin (BSA) sebagai larutan standar.

### **3.7 Pembuatan Medium**

#### **3.7.1 Medium Pertumbuhan Bakteri Uji**

##### **3.7.1.1 Pembuatan Medium Nutrien Agar (NA)**

Medium yang digunakan adalah medium Nutrien Agar (NA). Adapun komposisinya dalam 1000 mL aquades yaitu : Ekstrak daging 3 gram, pepton 5 gram, agar-agar 15 gram.

Cara Membuatnya:

Bahan ditimbang sebanyak yang dibutuhkan, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades. Setelah larut, medium tersebut diatur pH-nya hingga 7,0 kemudian di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama ± 15 menit.

### **3.7.1.2 Pembuatan Medium Muller Hinton Agar (MHA)**

Medium yang digunakan adalah medium Muller Hinton Agar (MHA). Adapun komposisinya dalam 1000 mL aquades yaitu: Meat Infusion 300 gram, Casein hydrolysatel 17,5 gram, starch 1,5 gram, agar-agar 17,0 gram.

Cara membuatnya :

Bahan ditimbang sebanyak yang dibutuhkan, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades. Setelah larut, medium diatur pH-nya hingga 7,0 kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama ± 15 menit.

## **3.8 Penyiapan Bakteri Uji**

### **3.8.1 Peremajaan Bakteri Uji**

Bakteri *Staphilococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, dan *Escherichia coli* yang berasal dari biakan murninya, masing-masing diambil sebanyak satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digores pada medium Nutrien Agar (NA) miring. Kultur bakteri pada masing-masing agar miring diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam.

### **3.8.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Bakteri *Staphilococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, dan *Escherichia coli* yang telah diremajakan selama 18-24 jam, masing-masing diambil satu ose lalu disuspensikan ke dalam larutan NaCl fisiologis 0,9

% steril kemudian dilakukan pengenceran suspensi bakteri uji hingga diperoleh transmittan 25 % terhadap blanko larutan NaCl 0,9 % steril pada panjang gelombang 580 nm dengan menggunakan kuvet berdiameter 13 mm.

### **3.9 Pembuatan Larutan Kontrol**

#### **3.9.1 Pembuatan Larutan Kontrol Positif Bakteri Uji**

Larutan kontrol positif yang digunakan adalah larutan kloramphenikol dengan konsentrasi 30 ppm. Sebanyak 0,03 g kloramphenikol dilarutkan dalam 100 mL aquades (diperoleh larutan dengan konsentrasi 300 ppm). Dari larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan aquades hingga volume larutan 10 mL.

#### **3.9.2 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif**

Larutan kontrol negatif yang digunakan adalah Bovine Serum Albumin (BSA) 4 mg/mL.

### **3.10 Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Pengujian daya hambat protein bioaktif terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi agar yang menggunakan pencadangan silinder besi dengan diameter dalam 6 mm, diameter luar 8 mm dan tinggi 10 mm. Medium Muller Hilton Agar (MHA) steril didinginkan pada suhu 40°C - 45°C. Kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan memadat sebagai lapisan dasar atau "base layer". Setelah memadat dimasukkan suspensi bakteri uji masing-masing sebanyak 1 mL ke dalam 10 mL medium MHA kemudian dihomogenkan dan dituang diatas lapisan base layer dan

dibiarkan setengah padat sebagai "seed layer". Setelah itu 7 buah pencadang diletakkan secara aseptis dengan menggunakan pinset steril pada permukaan seed layer. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam pencadang sebanyak 250  $\mu$ L. Cawan petri diberi label untuk membedakan sampel yang diuji. Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan mistar geser.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Ekstraksi, Isolasi dan Penentuan Konsentrasi Protein dari Spons

Ekstraksi dan isolasi protein bioaktif spons menggunakan prosedur dari metode (Schroder *et al.*, 2003; Ely *et al.*, 2004). Spons dipotong-potong kecil lalu ditimbang sebanyak 500 g berat segar, dihomogenisasi dengan blender menggunakan pelarut buffer A, dimaksudkan untuk memecahkan sel-sel sehingga protein yang terdapat dalam sel bisa larut dalam pelarut buffer. Proses pemecahan sel dibantu dengan penambahan Triton X-100 dimana secara kimia dapat membantu proses lisis sel dengan menegangkan plasma sehingga dengan gesekan fisik sedikit saja sel akan terpecah. Selanjutnya disaring kain penyaring untuk memisahkan antara ampas sel/jaringan dengan filtrat, kemudian filtrat yang di peroleh dibeku-cairkan sebanyak 2 – 3 kali, hal ini perlu dilakukan agar semua sel bisa pecah dengan sempurna, lalu disentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm 4°C, selama 20 menit supaya sisa pecahan sel bisa terpisah lebih sempurna.

Penentuan kadar protein spons *Clathria reinwardtii* berdasarkan metode Lowry (Colowick dan Kaplan, 1957) menggunakan bovine serum albumin (BSA) sebagai standar. Kurva standar protein dapat dilihat pada Lampiran 9. Hasil pengukuran kadar protein yang telah dilakukan menunjukkan bahwa konsentrasi protein dari ekstrak kasar spons *Clathria reinwardtii* yaitu 2,04 mg/mL dengan total protein yaitu 1224 mg dari volume ekstrak kasar sebanyak 600 mL. Ekstrak kasar difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing : 0 – 20 %, 20 – 40 %, 40 – 60 % dan 60 – 80 %. Hal ini bertujuan untuk memisahkan jenis protein berdasarkan tingkat kelarutan dan

jumlah gugus-gugus hidrofob yang terdapat pada asam-asam amino penyusun protein.

Penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi menyebabkan pada setiap tingkat fraksi, berbeda juga jenis protein yang mengendap. Penambahan amonium sulfat yang lebih tinggi konsentrasinya menyebabkan gugus-gugus hidrofob banyak dinetralkan oleh garam amonium sehingga air tidak bisa berikatan lagi, akibatnya kelarutan protein dalam air menurun yang menyebabkan ia mengendap. Jadi semakin banyak gugus hidrofob yang terkandung pada asam amino penyusun protein maka semakin tinggi kejenuhan yang dibutuhkan untuk mengendapkannya.

Endapan protein yang diperoleh setelah fraksinasi pada berbagai tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dengan sejumlah buffer B (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M), sampai tersuspensi sempurna. Selanjutnya masing-masing suspensi protein tersebut dimasukkan dalam kantong selofan. Selofan yang telah diisi dengan suspensi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,01 M) hal ini dimaksudkan agar garam amonium sulfat dan garam lain yang ada dalam ekstrak bisa melewati membran selofan karena perbedaan konsentrasi pelarut yang ada di dalam dan diluar kantong selofan. Hal ini mengikuti prinsip difusi osmosis, sambil diaduk dengan pengaduk magnetik stirrer dimaksudkan untuk membantu mempercepat proses pemurnian protein dan dilakukan pada suhu 4°C dengan maksud agar protein yang ada dalam ekstrak tetap stabil.

Pola distribusi protein pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Pola distribusi protein pada fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  spons *Clathria reinwardtii*

No	Fraksi	Volume setiap fraksi (mL)	Konsentrasi protein (mg/mL)	Total protein (mg)
1.	0 – 20 %	38	4,32	164,16
2.	20 – 40 %	12	2,16	25,92
3.	40 – 60 %	9	2,52	22,68
4.	60 – 80 %	10,8	2,64	28,51

Tabel 1 di atas menunjukkan bahwa konsentrasi protein berbeda-beda pada tiap fraksi. Perbedaan konsentrasi protein tiap fraksi mengindikasikan adanya perbedaan kelarutan protein dalam air, protein yang kelarutannya kurang dalam air maka terlebih dahulu mengendap dibandingkan protein yang kelarutannya lebih tinggi dalam air. Konsentrasi protein tertinggi pada spons *Clathria reinwardtii* ditemukan pada fraksi 0-20 % yaitu sebesar 4,32 mg/mL.

#### 4.2 Uji Bioaktivitas Antibakteri Fraksi Protein Hasil Dialisis

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Pasteurella multocida* Sedangkan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*. Pengujian daya hambat protein bioaktif terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar berlapis. Sebelum dilakukan pengujian daya hambat, terlebih dahulu bakteri diinokulasi pada media Nutrien Agar (NA) miring dalam tabung reaksi. Inokulasi dimaksudkan untuk meremajakan kultur bakteri murni supaya pertumbuhan dalam media uji optimal. Bakteri yang telah diremajakan disuspensikan ke dalam NaCl 0,9% steril, hal ini bertujuan untuk

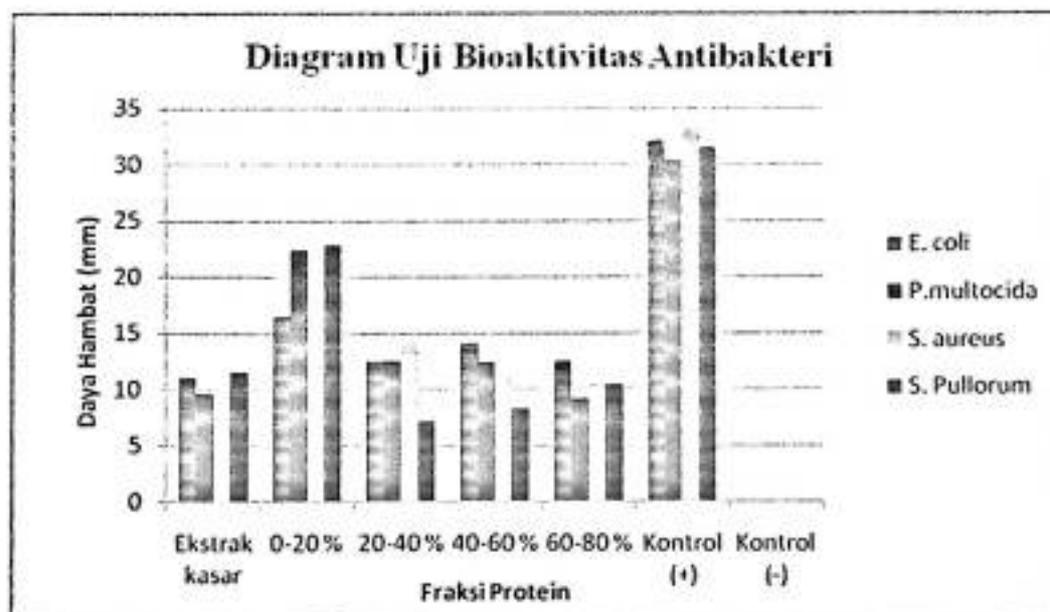
menjaga kondisi fisiologi bakteri uji. Kontrol positif yang digunakan pada pengujian bioaktivitas antibakteri yaitu Kloramphenicol sedangkan yang digunakan sebagai kontrol negatif yaitu BSA (bovine serum albumin).

Dari hasil pengukuran diameter hambatan ekstrak kasar dan fraksi protein spons *Clathria reinwardtii* terhadap empat bakteri uji setelah masa inkubasi 24 jam dan 48 jam diperoleh hasil seperti yang tercantum pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Diameter hambatan rata-rata dari fraksi protein *Clathria reinwardtii* terhadap beberapa bakteri uji selama 24 jam dan 48 jam

No.	Fraksi Protein	Rata-rata Diameter Hambatan (mm)							
		<i>S. pullorum</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. multocida</i>	
		1 x 24 jam	2 x 24 jam	1 x 24 jam	2 x 24 jam	1 x 24 jam	2 x 24 jam	1 x 24 jam	2 x 24 jam
1	0 - 20 %	22,85	22,91	16,45	16,6	17,80	17,85	22,40	22,45
2	20 - 40 %	7,2	7,45	12,6	12,35	14,15	14,3	12,6	12,2
3	40 - 60 %	8,3	8,45	14,15	13,7	11,1	11,03	12,45	12,2
4	60 - 80 %	10,4	10,42	12,6	12,35	10,4	10,25	9,15	9,3
5	Ekstrak kasar	11,5	11,65	11,1	10,85	9,2	9,1	9,7	9,45
6	Kontrol (+)	31,50	31,6	32,10	32,45	33,15	33,45	30,30	30,35
7	Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0	0	0

Jika data pada Tabel 2 diplotkan dalam bentuk histogram, hasilnya seperti pada gambar 7 berikut :



Gambar 7. Diagram zona hambatan antibakteri dari ekstrak kasar dan fraksi protein dari spons *Clathria reinwardtii* pada beberapa bakteri uji selama 24 jam

Berdasarkan data pada Tabel 2 di atas, diameter hambatan terbesar untuk bakteri *Escherichia coli* terdapat pada fraksi 0-20 % yaitu sebesar 16,45 mm sedangkan diameter hambatan terkecil terdapat pada ekstrak kasar yaitu 11,1 mm. Kontrol (+) menunjukkan diameter hambatan sebesar 32,10 mm. Setelah masa inkubasi 1x24 jam kemudian dilanjutkan 2 x 24 jam, ternyata terjadi peningkatan diameter zona hambatan terhadap bakteri *Escherichia coli* pada fraksi 0-20 %. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa protein bioaktif yang terkandung dalam fraksi protein 0-20 % tersebut bersifat bakterisida yaitu pada dosis biasa dapat berkhasiat mematikan kuman (Tan dan Kirana, 2002). Sedangkan untuk fraksi yang lain terjadi penurunan diameter zona hambatan yang menunjukkan bahwa protein bioaktif tersebut bersifat bakteriostatik yakni menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak memamatkannya.

Diameter hambatan terbesar pada bakteri *Pasteurella multocida* terdapat pada fraksi 0-20 % yaitu sebesar 22,40 mm dan diameter hambatan terkecil

terdapat pada fraksi 60-80 % sebesar 9,15 mm. Adanya perbedaan daya hambat fraksi protein dari spons setelah difraksinasi diduga karena senyawa aktif pada spons tersebut terbagi-bagi dalam fraksi yang diperoleh. Pengaruh ini dapat bersifat aditif (menambahkan) atau sinergis (menghambat) di antara senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar. Setelah masa inkubasi 2x24 jam terlihat bahwa fraksi yang bersifat bakterisida yang ditandai dengan peningkatan zona bening yaitu 0-20 % dan 60-80 % sedangkan fraksi lainnya bersifat bakteriostatik.

Adapun untuk bakteri *Staphylococcus aureus* aktivitas tertinggi ditunjukkan oleh fraksi 0-20 % dengan diameter hambatan sebesar 17,80 mm dan diameter hambatan terkecil terdapat pada ekstrak kasar yaitu 9,2 mm. Setelah masa inkubasi 2x24 jam fraksi yang bersifat bakterisida yaitu pada fraksi 0-20 % dan 20-40 %. Sedangkan untuk bakteri *Salmonella pullorum* diameter hambatan terbesar terdapat pada fraksi 0-20 % yaitu 22,85 mm dan diameter terkecil terdapat pada fraksi 20-40 % yaitu 7,2 mm. Setelah masa inkubasi 2x24 jam terlihat bahwa semua fraksi menunjukkan peningkatan diameter hambatan terhadap bakteri *Salmonella pullorum* sehingga semua fraksi tersebut bersifat bakterisida.

Secara umum, fraksi protein yang memiliki aktivitas terkuat terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri uji terdapat pada fraksi 0-20% yaitu untuk bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* dan *Pasteurella multocida* sehingga dapat diduga bahwa jenis protein yang aktif menghambat pertumbuhan ketiga bakteri uji tersebut merupakan protein yang kelarutannya kecil dalam air.

Dari Tabel 2 dan gambar 7 diatas, dapat kita lihat bahwa yang memberikan efek inhibisi terbesar terdapat pada fraksi 0-20 % terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida* yaitu masing-masing sebesar 22,85 mm dan 22,40 mm. Menurut Cappucino (1987), aktivitas bahan antibakteri akan tepat atau efektif penggunaannya apabila diameter zona hambatan dari bahan tersebut adalah  $\geq 17$  mm untuk bakteri gram negatif, sedangkan untuk bakteri *Staphylococcus aureus* bernilai  $\geq 29$  mm. Adanya diameter hambatan yang jauh lebih besar dan didukung oleh hasil pengumpulan data oleh Cappuccino (1987), maka dapat dikatakan protein bioaktif dari spons *Clathria reinwardtii* pada fraksi 0-20 % dengan daya hambat 22,85 mm dan 22,40 mm efektif sebagai bahan antibakteri khususnya terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida* walaupun, daya hambatnya lebih kecil daripada daya hambat kontrol positifnya.

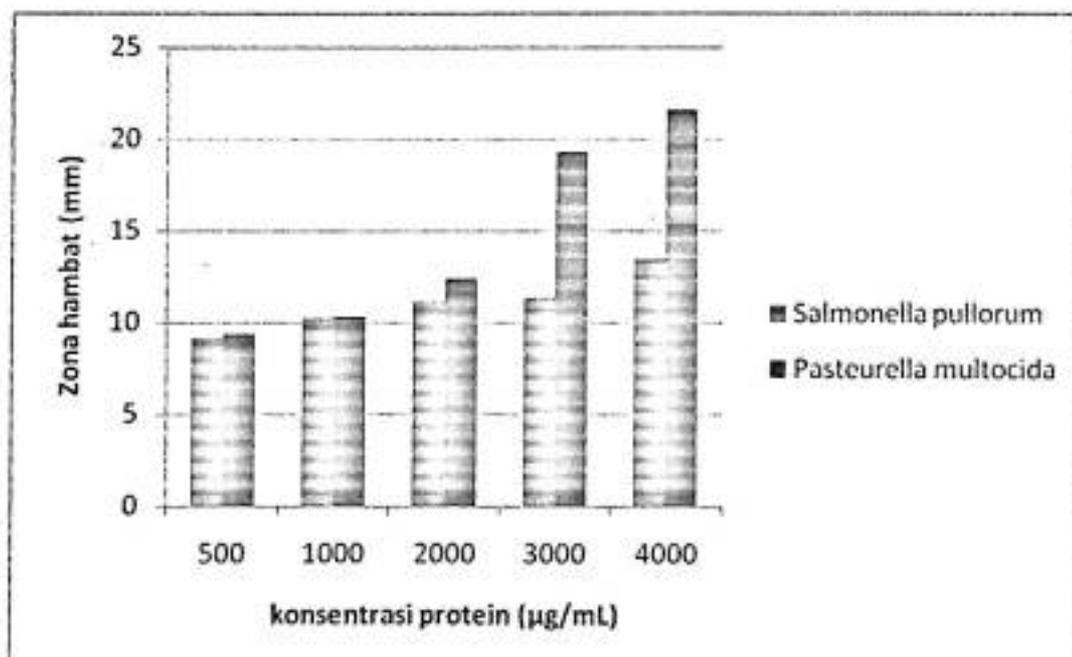
Adapun besarnya daya hambat kontrol positif disebabkan karena kloramphenikol yang digunakan memiliki spektrum daya hambat yang sangat luas baik untuk bakteri gram positif maupun gram negatif.

#### **4.3 Uji Inhibisi dengan berbagai konsentrasi protein bioaktif pada fraksi Optimal**

Dari Gambar 7 terlihat bahwa protein aktif (fraksi amonium sulfat 0-20%) yang diisolasi dari spons *Clathria reinwardtii* menunjukkan aktivitas terkuat dengan zona hambatan 22,85 mm terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan 22,40 mm untuk bakteri *Pasteurella multocida*. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi protein pada fraksi tersebut terhadap aktivitas antibakteri dilakukan uji inhibisi pada berbagai konsentrasi protein 4000, 3000, 2000, 1000 dan 500  $\mu\text{g/mL}$ , dan hasilnya dapat dilihat pada tabel 3 di bawah ini :

**Tabel 3.** Bioaktivitas berbagai konsentrasi dari fraksi protein 0-20 % terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida*

Konsentrasi protein (µg/mL)	Diameter Zona Hambatan (mm) <i>Clathria reinwardtii</i> fraksi 0 - 20%	
	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
500	9,15	9,4
1000	10,25	10,35
2000	11,1	12,35
3000	11,35	19,3
4000	13,45	21,6



Gambar 8. Diagram Zona hambatan terhadap *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida* pada beberapa variasi konsentrasi protein dari fraksi optimal spesies spons *Clathria reinwardtii*.

Dari tabel diatas, dapat dilihat bahwa pembentukan zona hambat terbesar terdapat pada konsentrasi protein sebesar 4000 µg/mL. Hal ini dapat diasumsikan bahwa fraksi protein 0-20 % dengan konsentrasi yang lebih kecil dari

konsentrasi sebenarnya yaitu 4320  $\mu\text{g/mL}$  masih memberikan daya hambat yang cukup besar. Hal ini sejalan dengan paparan Gan (1989), dan Wattimena (1991) yang menyatakan bahwa suatu antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi bila konsentrasi minimum untuk inhibisi (KMI) terjadi pada kadar antibakteri yang rendah tetapi memiliki daya bunuh atau daya hambat yang besar. Selain itu, efektivitas senyawa antibakteri dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain, senyawa antibakteri, suhu, waktu, sifat fisik bakteri, jenis bakteri, jumlah bakteri, umur, dan latar belakang kehidupan bakteri, serta kimia substrat seperti pH, kadar air, jenis, dan jumlah zat terlarut (Frazier, 1979).

Pada tabel 3 diatas, untuk Fraksi 0-20 % pada konsentrasi 4000  $\mu\text{g/mL}$  mengalami penurunan daya hambat dari konsentrasi awalnya sebesar 4320  $\mu\text{g/mL}$ , faktor-faktor yang mungkin menyebabkan terjadinya penurunan daya hambat disebabkan oleh beberapa faktor seperti penyimpanan sampel sebelum dilakukan variasi konsentrasi dan karakteristik dari bakteri uji itu sendiri yang resisten terhadap konsentrasi yang lebih kecil sehingga zona bening yang terbentuk mengalami penurunan.

BAB V  
KESIMPULAN DAN SARAN



### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Semua fraksi-fraksi protein yang telah diisolasi menunjukkan adanya senyawa protein bioaktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum*, dan *Escherichia coli*, khususnya untuk bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida*
2. Bioaktivitas antibakteri terbesar dari fraksi protein spons *Clathria reinwardtii* terdapat pada fraksi 0-20 % terhadap *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida* dengan diameter zona hambatan masing-masing adalah 22,85 mm dan 22,40 mm dan variasi konsentrasi yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan aktivitas antibakteri terkuat pada konsentrasi 4000 µg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 13,45 mm dan 21,6 mm.

### 5.2 Saran

1. Senyawa protein antibakteri yang diperoleh perlu dikarakterisasi lebih lanjut guna mendapat informasi yang jelas baik jenis asam amino maupun protein penyusunnya.
2. Perlunya isolasi dan identifikasi jenis bakteri, baik dari habitat pada lokasi pengambilan sampel maupun yang bersimbiosis dengan spons *Clathria reinwardtii*

## DAFTAR PUSTAKA

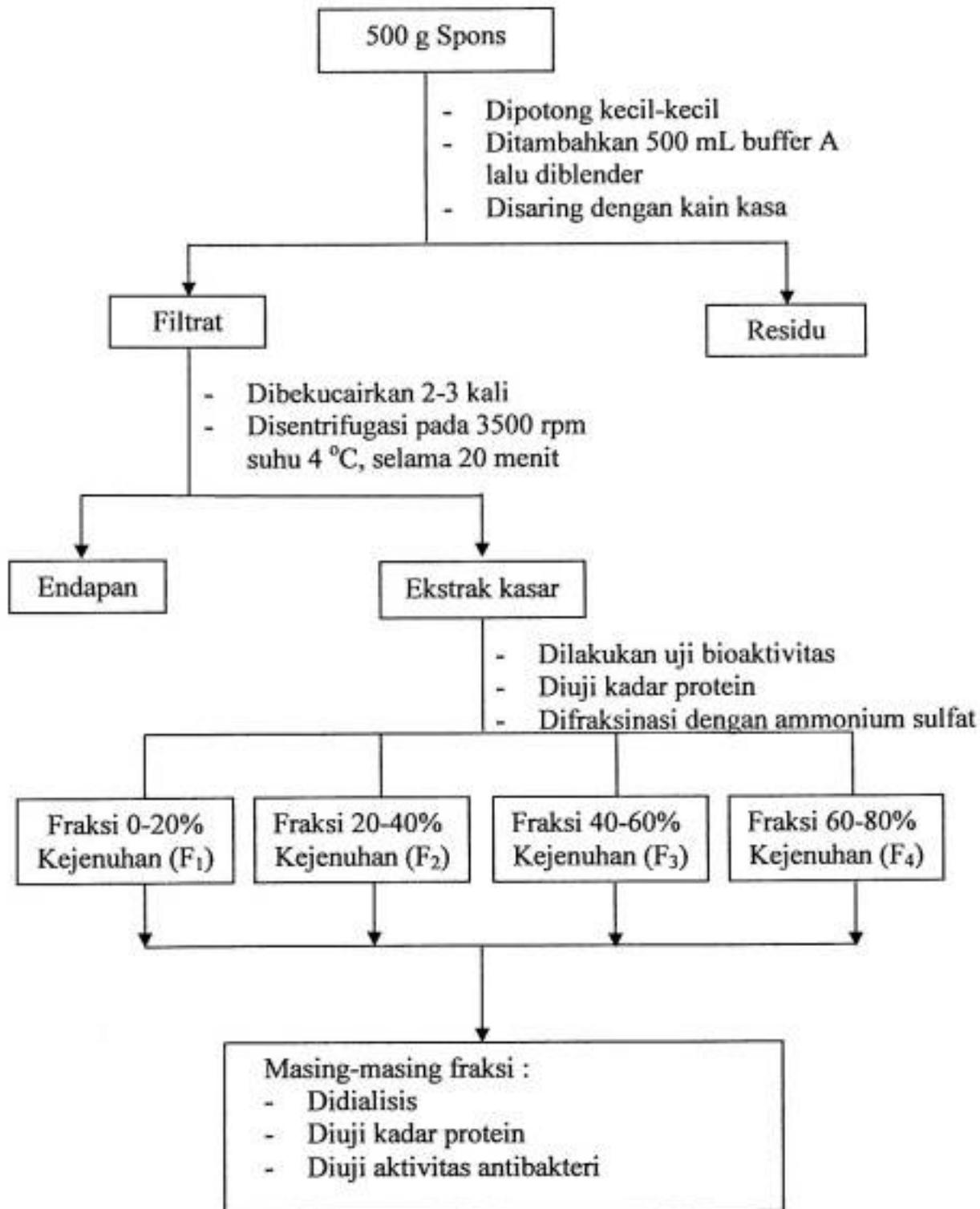
- Ahmad, A., Budi, P., dan Salama, D., 2006, *Bioaktivitas Antimikroba dan Antikanker Fraksi Protein yang Diisolasi dari Beberapa Spesies Makroalga di Pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan*, laporan akhir research grand TPSDP, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Amir, I. dan A. Budiyanto, 1996. *Mengenal Spons Laut (Demospongiae) secara Umum*, *Oceana*, **21**(2), 15-30.
- Anonim, 2006, *Mencari Obat Mujarab Laut*, (online), (<http://www.Forek.or.id>, diakses pada tanggal 2 Februari 2008).
- Anonim, 2007, *Porifera*, <http://id.wikipedia.org/wiki/porifera> (Online), diakses 22 Februari 2008.
- Barnes, J.H., 1990, *Antibiotics Their Use And Abuse In Aquaculture, Aquaculture 20*, University of The New York, New York, 122-136
- Budi, T. A., 1993, *Manual Kesehatan Unggas*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Cappuccino, 1987, *Microbiology A Laboratory Manual*, Rockland Community College, Suffern, New York, 250.
- Cappucino, J.G dan Sherman., 1992, *Microbiology A Laboratory Manual*, Eddison Wesley Company, Menk Park, California
- Daintith, J., 1994, *Kamus Lengkap Kimia*, Erlangga, Jakarta, 144.
- Darwis, 2007, *Bioaktivitas Antibakteri dan Antifungi Dari Spons Ianthella flabelliformis*, Skripsi tidak dipublikasikan, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Dirjen POM RI, 1995, *Farmakope Indonesia Edisi IV*, Departeman Kesehatan RI, Jakarta.
- Effendi, H., 2002, *Tantangan Baru dalam Eksploitasi Laut Nusantara*, (Online), (<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0208/19/ipitek/tent31.htm> diakses 15 Maret 2008).
- Entjang, I., 2003, *Mikrobiologi & Parasitologi*, PT. Citra Aditya Bakti, Bandung, 100-101, 103-104, 107, 118
- Eru Wibowo, A., dkk., 2005, *Studi Eksplorasi Senyawa Metabolit Sekunder dari biota Laut*, Pusat Pengkajian dan penerapan Teknologi Farmasi dan Medika. <http://www.Iptek.com>, diakses 12 April 2008.

- Erhardt, H., dan Moosleitner, H., 1995, *Meerwater Atlas Band 2*, Mergus, Jerman.
- Frazier, W. C., 1979, *Food Microbiology*, Second Edition, Mcgraw Hill Book Company, Newyork.
- Gan, S. (ed), 1989, *Farmakologi dan Terapi, Edisi Ketiga*, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Hooper, J. N. A., 1997, *Guide to Sponge Collection and Identification*, Version Merch, Queensland Museum South Brisbane, Queensland.
- Kelly, M., 2001, *A Course Guide to The Sponge Taxonomy Workshop*, Departement of Pharmacognocny Biological Field Station University of Mississipi and NIWA, New Zealand.
- Kennish, M. J., 1989, *Practical Handbook of Marine Science*, CRC Press, Florida.
- Kobayashi, M., Rachmaniar, R., 1999, *Overview Of Marine Natural Product Chemistry Prosidings Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia 1998*, Jakarta 14-15 Oktober 1998, 151-158.
- Koen, W. (ed.), 1985, *Kehidupan di Dalam Air*, Terjemahan oleh M. Abe dan S. Kosuga, Penerbit Tira Pustaka, Jakarta.
- Konig, G. M., and Wright, A. D., 1999, *Cymbastella Hoopert and Amphimedon Terpenensis: Where Do They Really Belong? Memoir of The Queensland Museum*, **44**, 281-288.
- Kozloff, E. N., 1990, *Invertebrates*, Sounders College Publishing, Philadelphia.
- Muliani, Suryati E, Tompo A, Parenrengi A, Rosmiati, 1998, *Isolasi Bioaktif Bunga Karang Sebagai Fungisida Pada Benur Udang Windu *Penaeus Monodon**, *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, **4** (2), 13-23.
- Murniasih, T., 2005, *Substansi Kimia Untuk Pertahanan Diri Dari Hewan Laut Tak Bertulang Belakang*, *Oseana 2005*, **30** (2), Jakarta, 19-27.
- Munro, M. H. G., Luibrand, R. T., and Blunt, J. W., 1989, *The Search for Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisms*, in Scheuer PJ (ed), *Bioorganic Marine Chemistry*, **1**, 194-176.
- Naim, R. 2003, *Ada protein Antimikroba dalam sekantong susu*, (Online), (<http://www.poultryindonesia.com/modules.php>, diakses 22 Februari 2008).

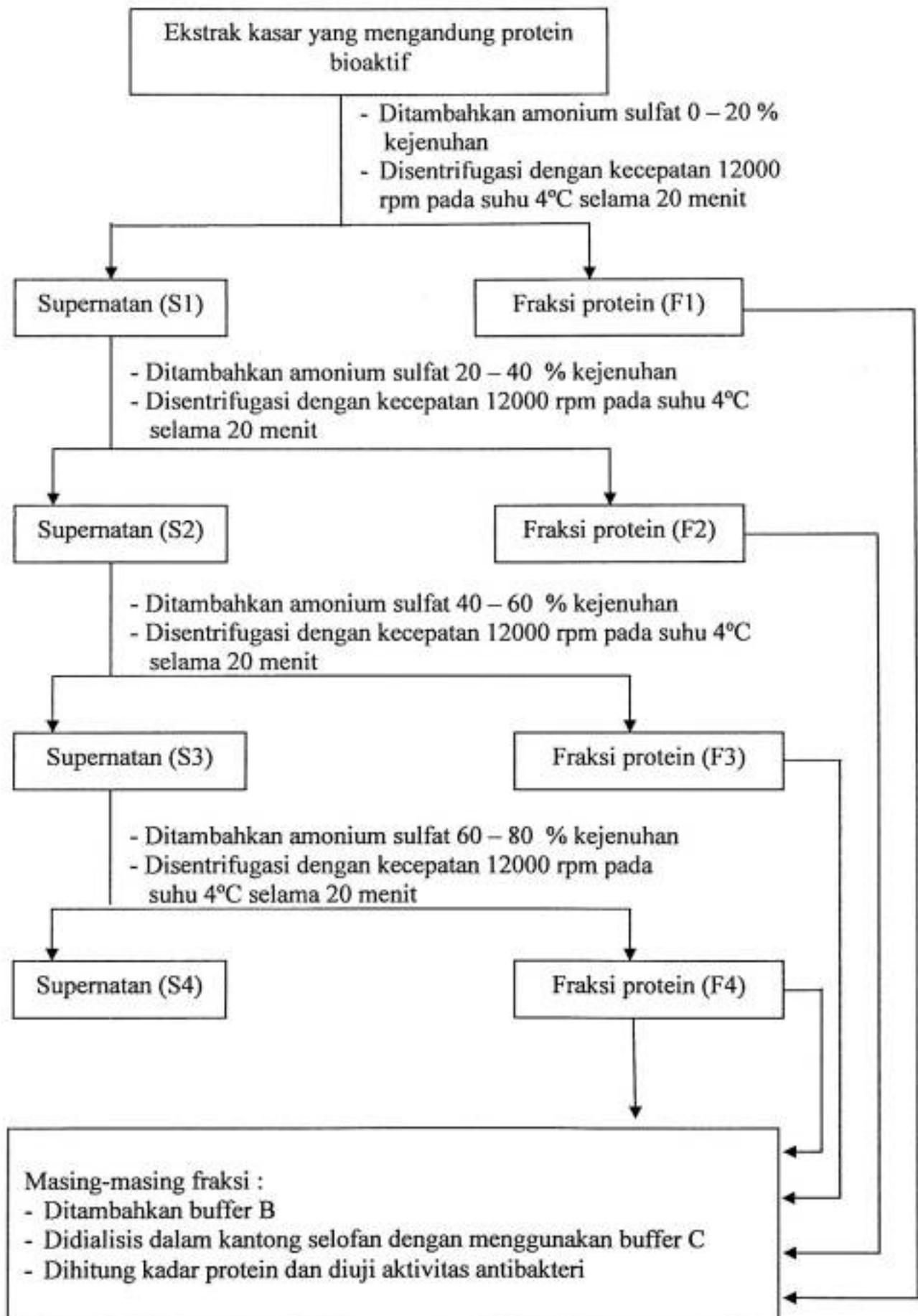
- Nybakken, J. W., 1993, *Marine Biology*, Third Edition, Harper Collins College Publisher.
- Poedjiadi, 1994, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI Press, Jakarta.
- Proksch, P., 1999, *Pharmacological Active Natural Product from Marine Invertebrate and Associated Microorganism*, Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan I tahun 1998, Lembaga Ilmu Pengetahuan, Jakarta 14-15 Oktober 1998, 33-40.
- Rahman, R, Abd dan Ahmad ridhay, 2004, *Penapisan senyawa Antimikroba dari Beberapa Jenis Bunga Karang (Porifera)*, .Tesis tidak diterbitkan, Jurusan Farmasi Univeritas Hasanuddin, Makassar.
- Riseley, R. A., 1971, *Tropical Marine Aquaria*, The Natural System, Ruskin House Museum Street, London.
- Romihmohtarto, K. dan Juwana S., 1999, *Biologi Laut*, Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi-LIPI, Jakarta, 115 – 128.
- Ruzin A, Singh G, Severin A, Yang Y, Dushin RG, Sutherland AG, Minnick A, Greenstein M, May MK, Shlaes DM, Bradford PA, 2004, *Mechanism of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycinresistant Gram-positive bacteria*, *Antimicrob Agents Chemother*, **48**,728-738.
- Sauvani, J., 2005, *Infeksi Bakteri* (Online), (<http://www.glory-farm.com/kami7/hubungi.htm>, diakses 15 Maret 2008, jam 21.00 WITA).
- Setiono, P., 2002, *Infeksi Bakteri Intraselular Pada Anak*, (Online), [http://www.pediatrik.com/kanalpkb/34/01/Infeksi Bakteri Intraseluler Parwati\\_SB.pdf](http://www.pediatrik.com/kanalpkb/34/01/Infeksi_Bakteri_Intraseluler_Parwati_SB.pdf) (Diakses pada tanggal 4 Maret 2008).
- Soediro, 1999, Produk Alam Hayati Bahari dan Prospek Pemanfaatan di Bidang Kesehatan dan Kosmetik, *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia*, Jakarta 14 – 15 Oktober 1995, 41 – 52.
- Sudarmadji, S., Bambang, H., Suhardi, 2003, *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian*, Liberty, Yogyakarta, 72-73.
- Soest, R. W. M., and Braekman, J. C., 1999, *Chemosystematics of Porifera: A Review*, *Memoir of the Queensland Museum*, **44**, 569-589.
- Suparno, 2005, *Kajian Bioaktif Spons Laut (Forifera: Demospongia) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Bidang Farmasi*, Makalah Pribadi Falsafah Sains, Pascasarjana IPB, Bogor.

- Supriyono, A., 2000, Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Hymenidin dan Oroidin Dari Spons *Axinella carteri* Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2000, **2** (2), Jakarta.
- Tan, T. H., dan Kirana R, 2002, *Obat-Obat Penting: Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya*, Edisi ke V Cetakan I, Dirjen POM Depkes RI, Jakarta.
- Wattimena, 1991, *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*, Universitas Gadjah Mada Press, Yogyakarta, 274-279.
- Yuliani, S., 2001, *Prospek Pengembangan Obat Tradisional menjadi Obat Fitofarmaka*, *Jurnal Litbang Pertanian Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, **20**, 3.

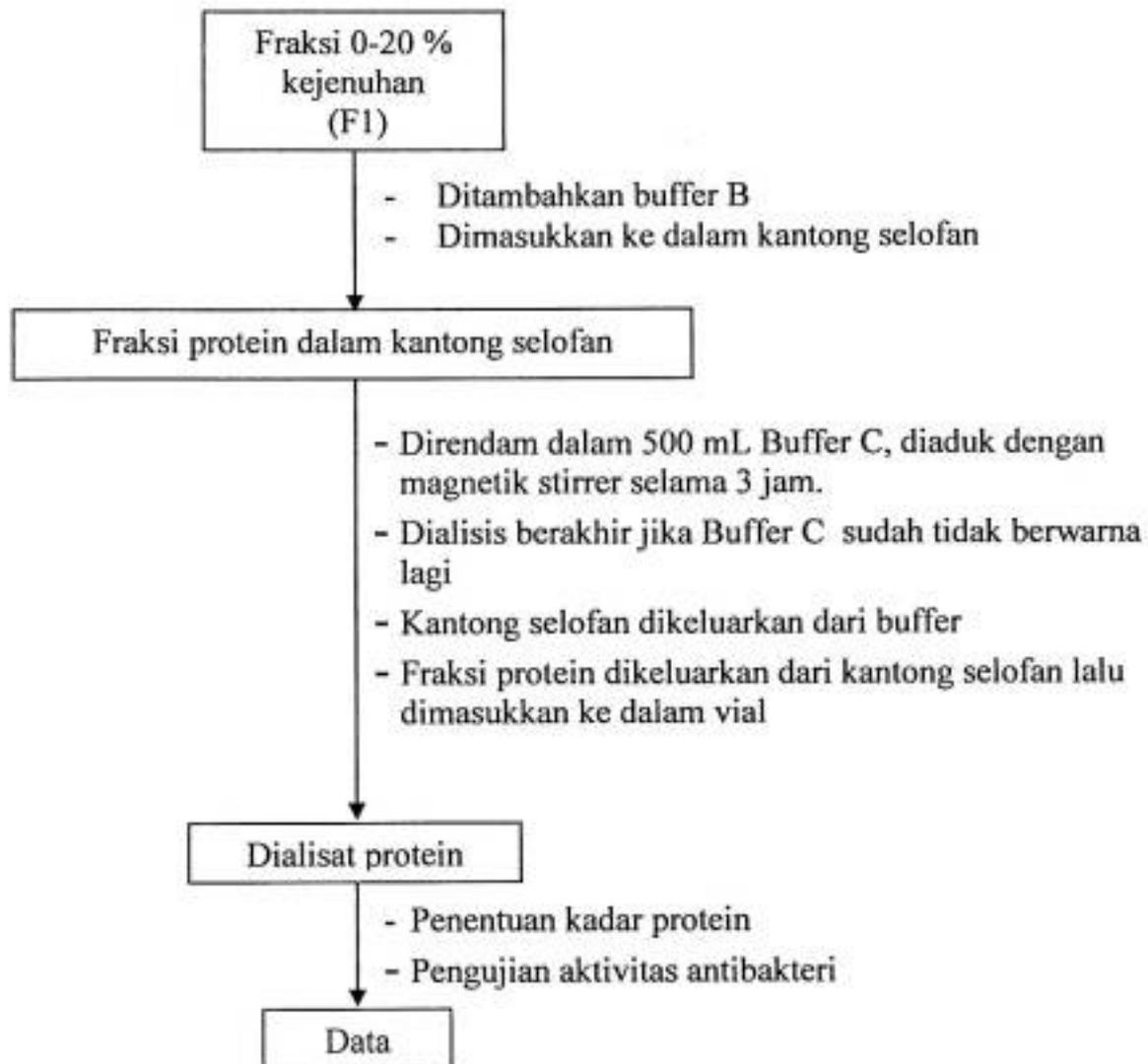
**Lampiran 1.** Bagan kerja isolasi, pemurnian dan uji bioaktivitas protein bioaktif dari spons



**Lampiran 2. Skema kerja fraksinasi protein bioaktif dengan amonium sulfat**

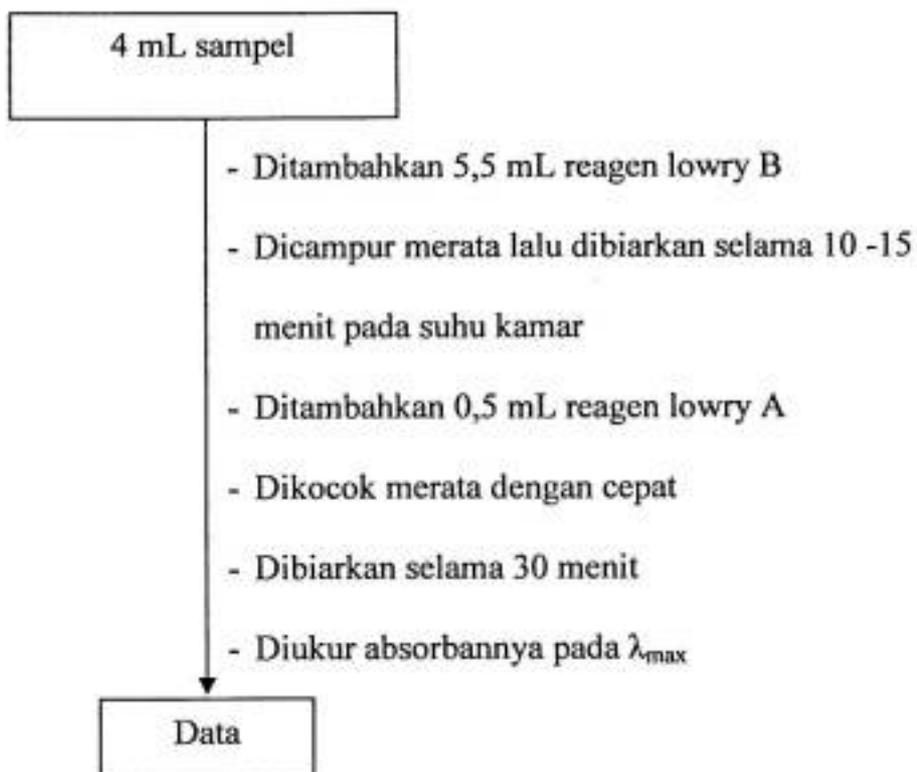


### Lampiran 3. Skema kerja dialisis

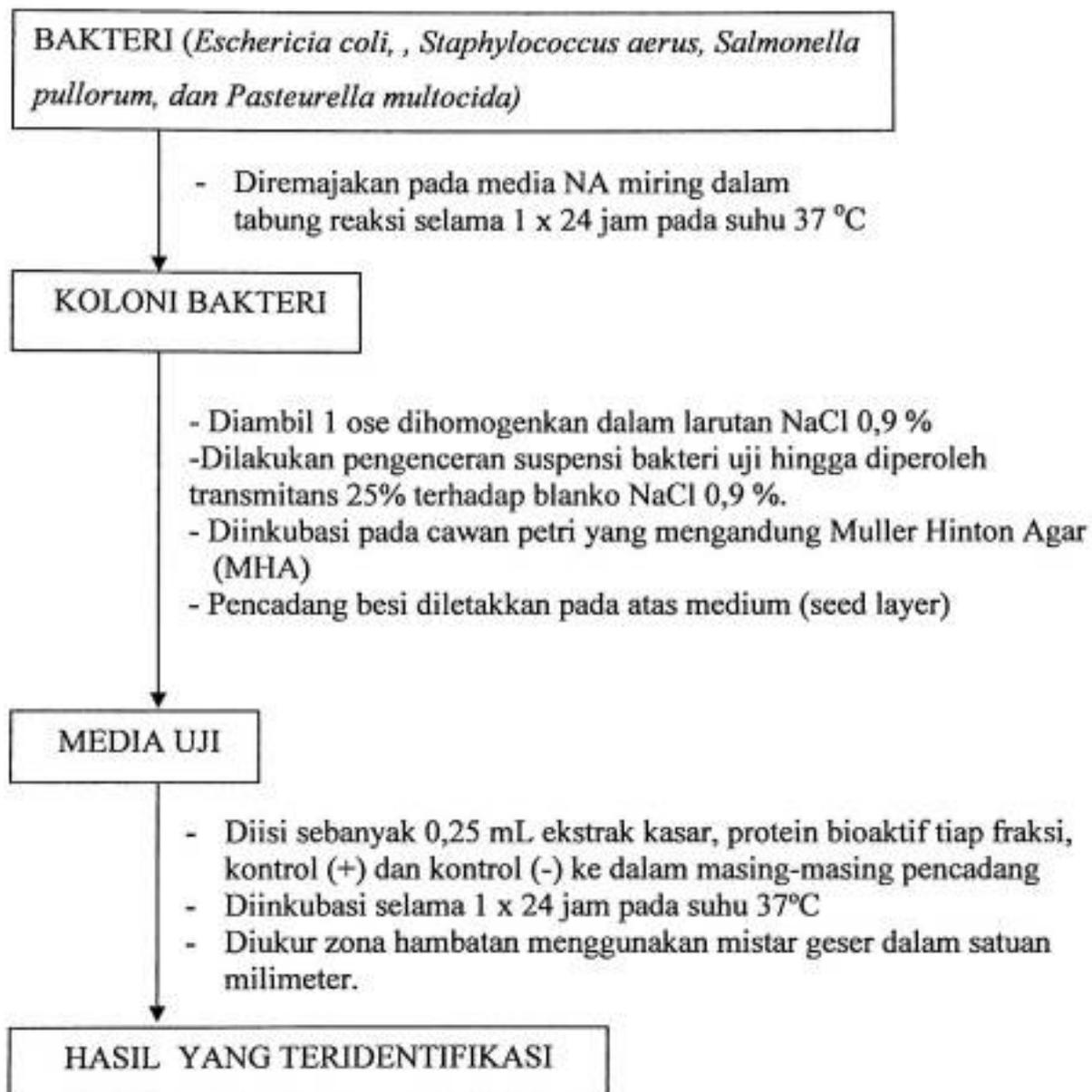


Catatan : perlakuan yang sama untuk F2, F3, dan F4

#### Lampiran 4. Prosedur pengujian kadar protein sampel



**Lampiran 5.** Skema kerja uji antibakteri



## Lampiran 6. Penentuan protein dengan metode *Lowry*

### Pereaksi :

#### 1. Pereaksi Lowry A

Pada pembuatan Lowry A yakni dengan pencampuran antara folin cloaltheus dan akuades dengan perbandingan 1 : 1. Dan dibuat sebanyak 4 mL.

#### 2. Pereaksi Lowry B

Pada pembuatan Lowry B yakni dengan pencampuran antara  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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% 1 mL. Kemudian dihomogenkan.

### Larutan Contoh

- Di pipet 0,1 mL suspensi protein diencerkan sampai 12 mL (untuk fp = 120 X), diambil 4 mL larutan sampel ditambahkan 5,5 mL Lowry B, dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit.
- Ditambahkan 0,5 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; 0,06; 0,08; 0,10 dan 0,12 mg/mL.
- Perlakukan larutan standar tersebut seperti pada larutan contoh.

## Lampiran 7. Pembuatan Larutan Buffer

### A. Pembuatan larutan buffer A (0,1 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3, 2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, β-mercaptoetanol 1 %, Triton X-100 0,5 %)

Prosedur pembuatan larutan :

1. Ditimbang 6,05 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan aquades 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 58,5 gram dan 0,555 gram CaCl<sub>2</sub>, β-mercaptoetanol 5 mL dan triton X-100 2,5 mL dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan aquades.

### B. Pembuatan larutan buffer B (0,1 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3, 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>)

Prosedur pembuatan larutan :

1. Ditimbang 6,05 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan aquades 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 gram dan 0,555 gram CaCl<sub>2</sub> dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan aquades.

**C. Pembuatan larutan buffer C (0,01 M Tris (hidroksimetil) amino metana pH 8,3, 0,2 M NaCl, 0,01 M CaCl<sub>2</sub>).**

Prosedur pembuatan larutan :

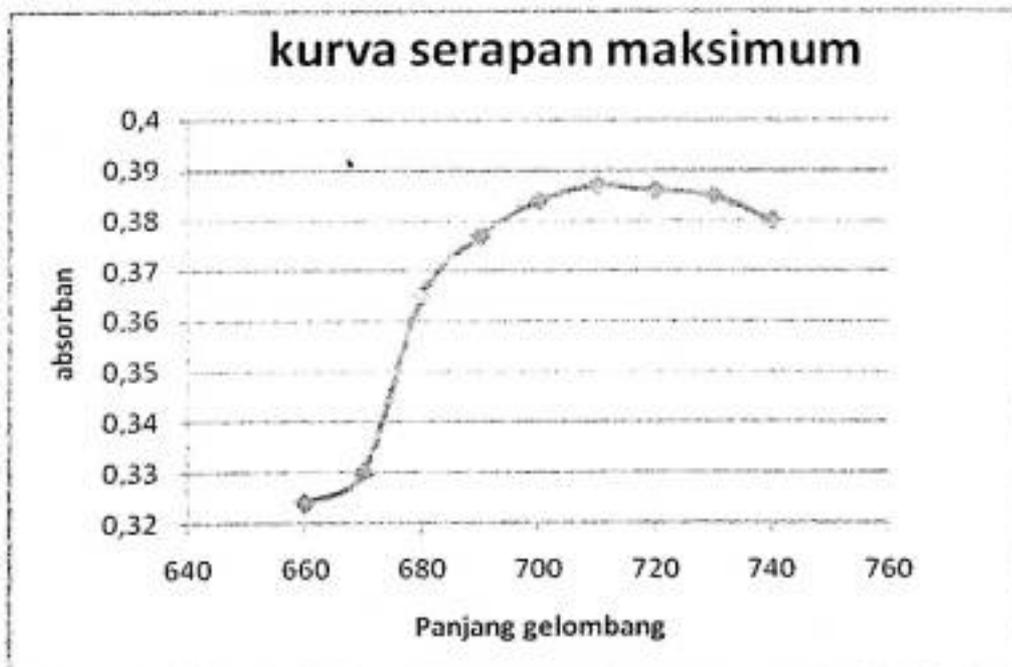
1. Ditimbang 0,605 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan aquades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana 0,04 M ditambahkan HCl 2 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya sampai mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 gram dan 0,555 gram CaCl<sub>2</sub> dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan aquades.

### Lampiran 8. Penentuan serapan maksimum ( $\lambda$ maksimum)

Serapan Maksimum ( $\lambda$  maksimum) pada konsentrasi BSA 0,06 mg/mL

No	Panjang Gelombang ( $\lambda$ )	Absorban (A) <sup>#</sup>
1.	660	0,324
2.	670	0,330
3.	680	0,365
4.	690	0,377
5.	700	0,384
6.	<b>710</b>	<b>0,387</b>
7.	720	0,386
8.	730	0,385
9.	740	0,380

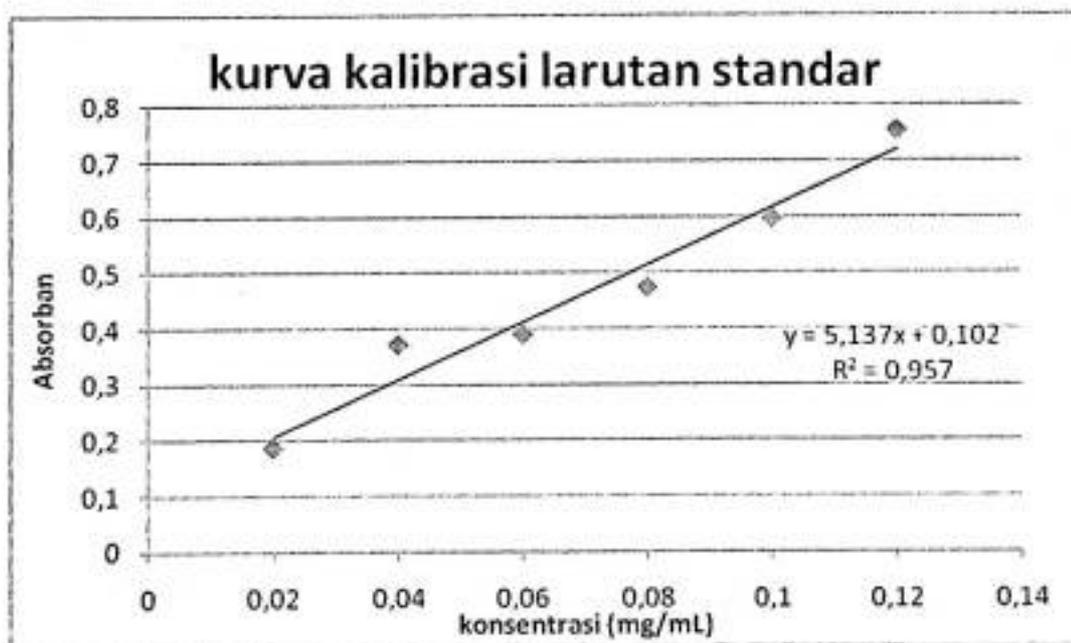
Ket: #) Data rata-rata dari dua kali pengukuran



**Lampiran 9. Kurva kalibrasi larutan standar (BSA) pada panjang gelombang 710 nm**

No	Konsentrasi Standar [BSA] (mg/mL)	Absorban (A) <sup>#</sup>
1.	0,02	0,187
2.	0,04	0,372
3.	0,06	0,390
4.	0,08	0,474
5.	0,10	0,596
6.	0,12	0,755

Ket: #) Data rata-rata dari dua kali pengukuran



**Lampiran 10. Pengukuran Kadar Protein pada Setiap Tahap Pemurnian Spons *Clathria reinwardtii***

No	Frakasi protein	Absorban (Y)	X (mg/mL)	Faktor Pengenceran	X sebenarnya (mg/mL)
1	Ekstrak kasar	0,190	0,017	120 x	2,04
2	0-20%	0,285	0,036	120 x	4,32
3	20-40%	0,196	0,018	120 x	2,16
4	40-60%	0,212	0,021	120 x	2,52
5	60-80%	0,216	0,022	120 x	2,64

Dari hasil regresi kurva larutan standar diperoleh persamaan garis:

$$Y = 5,137x + 0,102$$

Maka data pada tabel di atas diperoleh dengan cara :

$$Y = 5,137x + 0,102$$

$$5,137 X = Y - 0,102$$

$$X_1 = \frac{Y_1 - 0,102}{5,137} = 0,017$$

$$X_2 = \frac{Y_2 - 0,102}{5,137} = 0,036$$

$$X_3 = \frac{Y_3 - 0,102}{5,137} = 0,018$$

$$X_4 = \frac{Y_4 - 0,102}{5,137} = 0,021$$

$$X_5 = \frac{Y_5 - 0,102}{5,137} = 0,022$$

**Lampiran 11. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai tingkat kejenuhan.**

No	Fraksi	Volume setiap fraksi (mL)	Konsentrasi protein (mg/mL)	Total protein (mg)
1.	0 – 20 %	38	4,32	164,16
2.	20 – 40 %	12	2,16	25,92
3.	40 – 60 %	9	2,52	22,68
4.	60 – 80 %	10,8	2,64	28,51

Penentuan total protein dengan rumus:

**Total Protein = Volume setiap Fraksi (mL) x Konsentrasi Protein (mg/mL)**

Fraksi 0-20 % = 38 mL x 4,32 mg/mL = 164,16 mg

Fraksi 20-40 % = 12 mL x 2,16 mg/mL = 25,92 mg

Fraksi 40-60 % = 9 mL x 2,52 mg/mL = 22,68 mg

Fraksi 60-80 % = 10,8 mL x 2,64 mg/mL = 28,51 mg

**Lampiran 12. Jumlah amonium sulfat yang ditambahkan dan volume suspensi endapan yang diperoleh pada setiap fraksi spons *Clathria reinwardtii***

No	Fraksi	Bobot Amonium sulfat (gram)	Volume suspensi endapan (mL)
1	0-20 %	63,6	38
2	20-40 %	66,67	12
3	40-60 %	69,84	9
4	60-80 %	74,18	10,8

Penambahan Amonium sulfat :

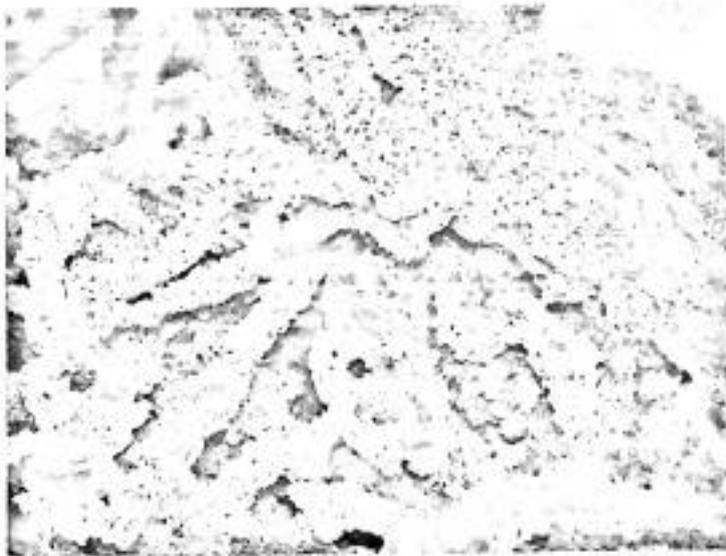
$$0-20\% = \frac{600\text{mL}}{1000\text{ mL}} \times 106\text{ gram} = 63,6\text{ gram}$$

$$20-40\% = \frac{590\text{ mL}}{1000\text{ mL}} \times 113\text{ gram} = 66,67\text{ gram}$$

$$40-60\% = \frac{582\text{mL}}{1000\text{ mL}} \times 120\text{ gram} = 69,84\text{gram}$$

$$60-80\% = \frac{575\text{mL}}{1000\text{ mL}} \times 129\text{ gram} = 74,18\text{ gram}$$

Lampiran 13. Foto dan Klasifikasi Spons *Clathria reinwardtii*



Taksonomi dari *Clathrina reinwardtii* :

Filum : Porifera  
Kelas : Demospongiae  
Subkelas : Ceractinomorpha  
Ordo : Poeciloclerina  
Sub Ordo : Microcionina  
Family : Microcionidae  
Genus : Clathria  
Spesies : *Clathria reinwardtii*

( Erhardt dan Moosleitner, 1995) .

## Lampiran 14. Foto Lisis Sel dan Dialisis Sampel Spons *Clathria reinwardtii*

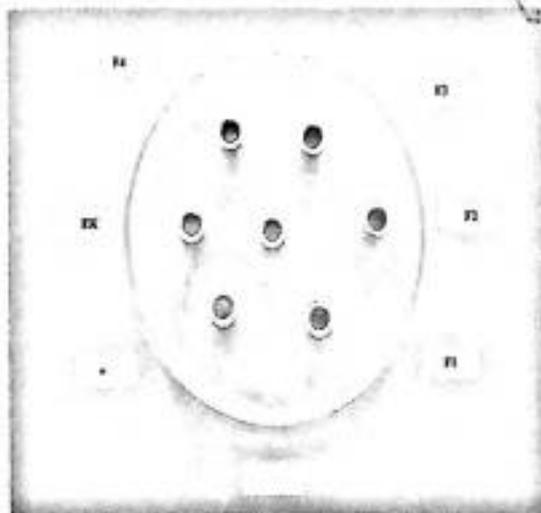
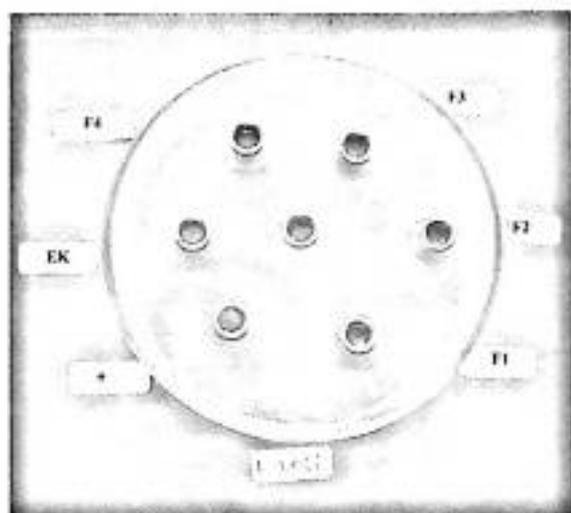
### Proses Lisis Sel



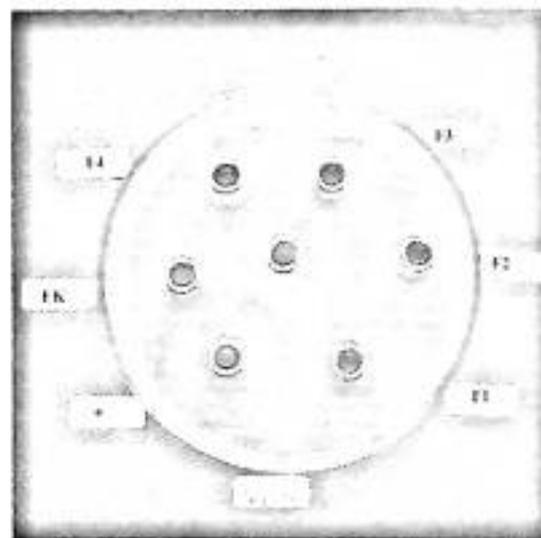
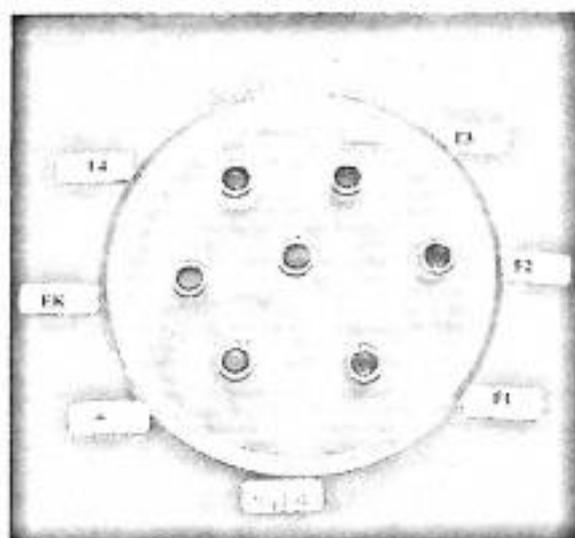
### Proses Dialisis



Lampiran 15. Foto Bioaktivitas Antibakteri dari Protein spons *Clathria reinwardtii* pada Beberapa Fraksi Amonium Sulfat



*Escherichia coli* ( Simplo dan duplo)



*Staphylococcus aureus* (Simplo dan Duplo)

Keterangan :

F1 = Fraksi 0-20 %

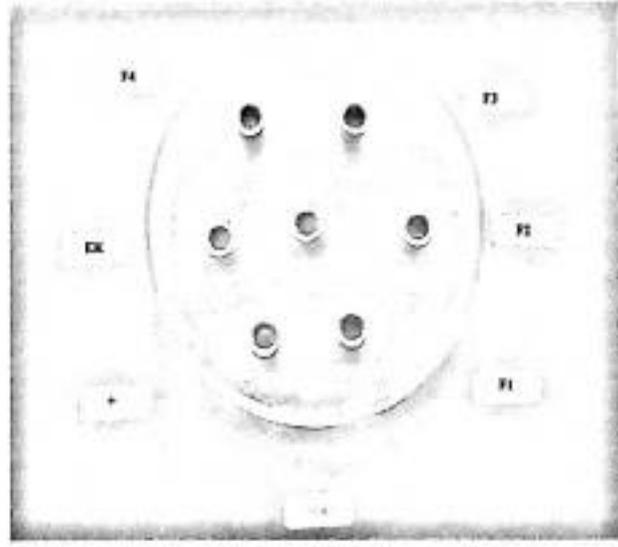
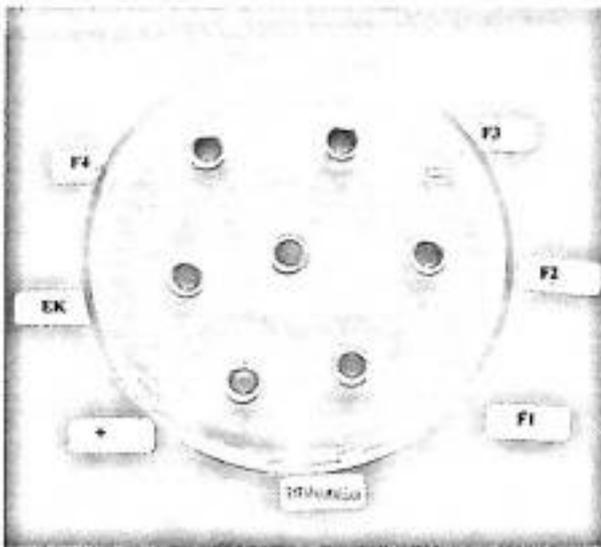
F2 = Fraksi 20-40 %

F3 = Fraksi 40-60 %

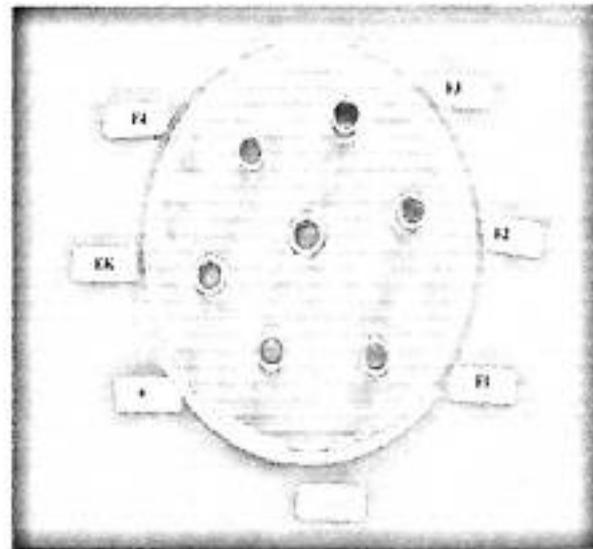
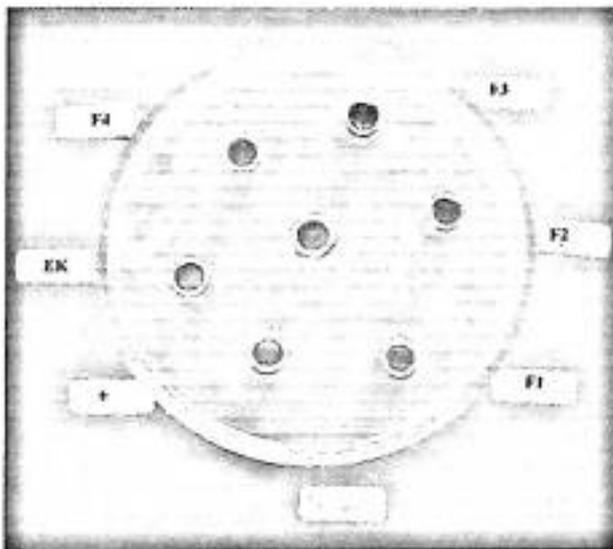
F4 = Fraksi 60-80 %

+ = Kontrol Positif (kloramphenikol)

- = Kontrol Negatif (BSA)



*Pasteurella multocida* (Simplo dan duplo)



*Salmonella pullorum* (Simplo dan duplo)

Keterangan :

F1 = Fraksi 0-20 %

F2 = Fraksi 20-40 %

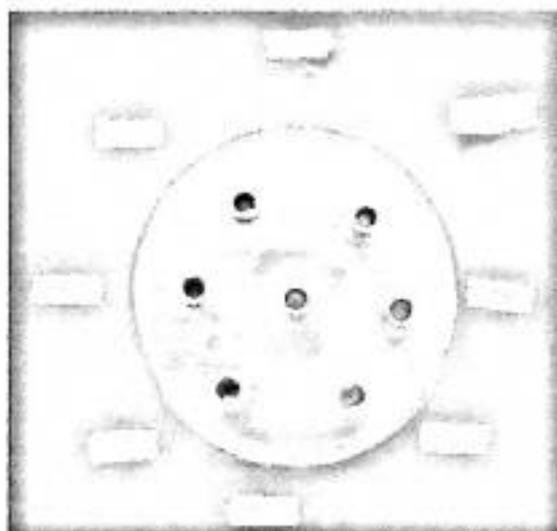
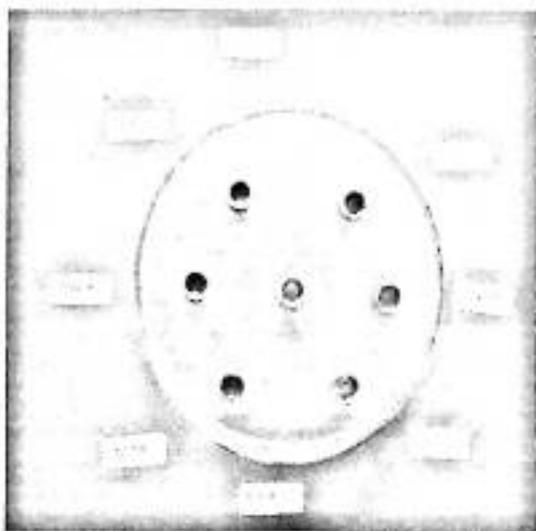
F3 = Fraksi 40-60 %

F4 = Fraksi 60-80 %

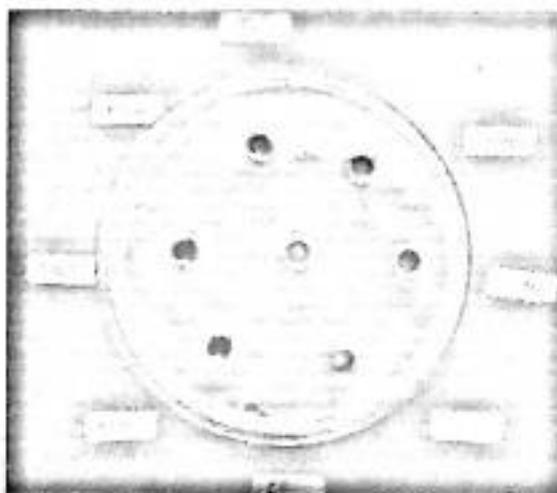
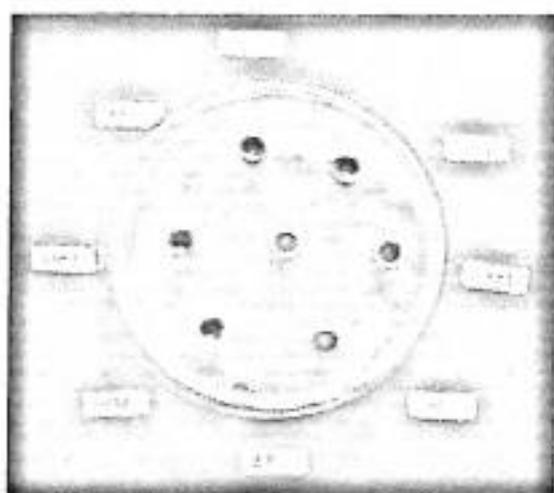
+ = Kontrol Positif (kloramphenikol)

- = Kontrol Negatif (BSA)

Lampiran 16. Foto Bioaktivitas Antibakteri dari Protein spons *Clathria reinwardtii* pada Fraksi Optimal terhadap bakteri *Salmonella pullorum* dan *Pasteurella multocida*.



*Pasteurella multocida* (simplo dan duplo)



*Salmonella pullorum* (Simplo dan duplo)

Keterangan :

F1 = Fraksi 0-20%

K+ = Kontrol Positif (kloramphenikol)

K- = Kontrol Negatif (BSA)

Lampiran 17. Tabel penambahan ammonium sulfat pada fraksinasi protein bioaktif

Kejenuhan Awal Dari Amonium Sulfat (% Pada 0 - 4°C)	% Kejenuhan Pada 0-4 °c																
	Penambahan Amonium sulfat kristal (gram) untuk pada 1 liter larutan																
	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	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	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
95																0	35
100																	0

Lampiran 18. Peta Lokasi Pengambilan Sampel Spons *Clathria reinwardtii*

