

Skripsi

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR
L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION SPONS DAN
APLIKASINYA SEBAGAI ANTIMIKROBA**

RISKA

H31110260



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2017**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR
L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION SPONS DAN
APLIKASINYA SEBAGAI ANTIMIKROBA**

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

Oleh :

RISKA

H311 10 260



**MAKASSAR
2017**

SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI EKSTRAK KASAR
L-ASPARAGINASE DARI BAKTERI SIMBION SPONS DAN
APLIKASINYA SEBAGAI ANTIMIKROBA**

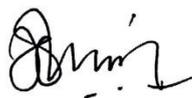
Disusun dan diajukan oleh:

RISKA

H311 10 260

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing Utama



Dr. Hj. Hasnah Natsir, M. Si
NIP. 19620320 198711 2 001

Pembimbing Pertama



Dr. Hj. Seniwati Dali, M.Si
NIP.195812311988032 003

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkah dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Ekstrak Kasar L-asparaginase dari Bakteri Symbion Spons dan Aplikasinya Sebagai Antimikroba**”. Penyelesaian tugas ini sebagai syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia Fakultas Ilmu Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari bahwa betapa banyaknya hambatan dan beratnya menyelesaikan tugas ini. Tugas ini tidak akan selesai tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak dan ibu tercinta, adik-adik tersayang serta keluarga besar Candoko.
2. Ibu Dr. Hasnah Natsir, M. Si selaku pembimbing pertama serta Dr. Seniwati Dali, M. Si selaku pembimbing pertama yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam mengarahkan penulis mulai dari proposal, penelitian, hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Ir. Abd Hayat Kasim, MT. Selaku penasehat akademik yang telah mendukung penulis selama menempuh pendidikan di kimia Unhas.
4. Ketua Jurusan Kimia, Ibu Dr. Indah Raya, M. Si dan Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Unhas yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan studi, memberikan banyak ilmu dan kisah, serta seluruh staf jurusan kimia Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.
5. Seluruh analis Jurusan Kimia Unhas, khususnya kak Mahdaliah selaku analis Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Unhas, serta seluruh peneliti di

Laboratorium Biokimia Unhas. Terima kasih atas bantuan dan kerja samanya terutama pada saat penulis melakukan penelitian.

6. Saudara-saudara tercinta Kimia 2010, khususnya canci, yani, tuti, putri, sukma, ririn, dan Shinta. Serta, adik-adik kimia angkatan 2011 dan 2012. Terima kasih atas segala tawa, airmata, doa dan kebaikan kalian.

Penulis hanyalah manusia biasa yang tidak luput dari kesalahan sehingga penulis menyadari bahwa apa yang penulis sajikan ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak.

Penulis,

2017

ABSTRAK

L-asparaginase (*L-asparagin amino hydrolase*, E.C.3.5.1.1) adalah enzim yang mengkatalisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim L-asparaginase yang berasal dari mikroba simbiosis spons dan berpotensi sebagai bahan antimikroba. L-asparaginase diisolasi dari bakteri simbiosis spons menggunakan metode tuang dan gores. Isolat bakteri simbiosis spons penghasil L-asparaginase diidentifikasi dengan pewarnaan gram dan uji biokimia. Pemurnian awal L-asparaginase dari bakteri simbiosis spons yaitu metode fraksinasi dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%, selanjutnya L-asparaginase tersebut didialisis dengan membran selofan. Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri simbiosis spons DA51(3) penghasil L-asparaginase memiliki karakteristik yang mirip dengan bakteri *Klebsiella sp* yang merupakan bakteri gram negatif. Waktu produksi optimum L-asparaginase yaitu pada jam ke-72 dengan aktivitas sebesar 30,374 U/mL. L-asparaginase menghasilkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat L-asparagin 0,015 µg/mL sebesar 19,208 U/mL pada suhu inkubasi 37 °C dan pH 8. Aktivitas antimikroba terbesar pada fraksi 40-60% terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 5,6 mm.

Kata kunci : Antimikroba, *Klebsiella sp*, L-asparaginase, Spons

ABSTRACT

L-asparaginase (*L-amino asparagin hydrolase*, E.C. 3.5.1. 1) is an enzyme that catalyzes of L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia. This study aims to determine the L-asparaginase enzymes derived from microbial symbionts sponge potential as antimicrobial materials. L-asparaginase was isolated from bacterial symbionts sponge method and scratch resistant castings. Bacterial isolates sponge symbiont largest producer of L-asparaginase identified by gram staining and biochemical tests. Initial L-asparaginase that has been isolated from bacterial symbionts sponge fractionated with ammonium sulphate at saturation levels of 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100%, then the L-asparaginase subsequently dialysis with a cellophane membrane. Antimicrobial activity test was carried out by the agar diffusion method using a paper disc. The results of gram staining and biochemical tests have been performed on a sponge symbiont bacteria DA51(3) producing L-asparaginase and greatest antimicrobial activity showed characteristics similar to *Klebsiella sp* bacteria that are gram-negative bacteria. Optimum production time of L-asparaginase was on hour-72 which is resulted in the activity of 30.374 U/mL. The highest activity of L-asparaginase was generated at substrate concentrations of L-asparagine 0.015 µg/mL at 19.208 U/mL at an incubation temperature of 37 °C and pH 8. The Largest antimicrobial activity of the fraction of 40-60% against *Staphylococcus aureus* at 5.6 mm.

Keywords: Antimicrobial, *Klebsiella sp*, L-asparaginase, Sponge

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
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 Tinjauan Umum Enzim.....	5
2.1.1 Klasifikasi Enzim.....	5
2.1.2 Enzim L-asparaginase.....	6
2.2 Tinjauan Umum Bakteri.....	10
2.2.1 Morfologi Bakteri.....	10

2.3 Tinjauan Umum Spons.....	11
2.4 Hubungan spons dan bakteri simbion.....	13
2.5 Penyakit yang disebabkan oleh bakteri.....	15
2.6 Tinjauan Umum Antimikroba.....	16
2.7 Fraksinasi Enzim.....	17
BAB III METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Bahan Penelitian.....	19
3.2 Alat Penelitian.....	19
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
3.4 Prosedur Penelitian	20
3.4.1 Preparasi Sampel.....	20
3.4.2 Pembuatan Media.....	20
3.4.2.1 Media Nutrient Broth (NB)	20
3.4.2.2 Media Agar (Media Padat)	20
3.4.2.3 Pembuatan Media Inokulum.....	21
3.4.2.4 Pembuatan Media Produksi.....	21
3.4.2.5 Penyegaran Sampel Dalam Media Nutrient Broth.....	21
3.4.3 Isolasi Bakteri Simbion Penghasil L-asparaginase dari Spons.....	22
3.4.4 Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	22
3.4.5 Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	22
3.4.6 Penyiapan Inokulum.....	23
3.4.7 Penentuan waktu produksi optimum Enzim L-asparaginase..	23
3.4.8 Pengaruh Konsentrasi Substrat Enzim L-asparaginase Optimum dalam Produksi L-asparaginase.....	24

3.4.9 Produksi L-asparaginase.....	24
3.5 Penentuan Kadar Protein.....	24
3.6 Pengukuran Aktivitas L-asparaginase.....	25
3.6.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase.....	26
3.6.2 Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase.....	26
3.7 Fraksinasi.....	26
3.8 Dialisis.....	26
3.9 Pengujian Aktivitas Antimikroba.....	27
3.9.1 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri.....	27
3.9.1.1 Media Nutrient Agar (NA).....	27
3.9.1.2 Media Muller Hilton Agar (MHA).....	27
3.9.2 Penyiapan Bakteri Uji.....	27
3.9.2.1 Peremajaan Bakteri Uji.....	27
3.9.2.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	27
3.9.3 Pembuatan Larutan Kontrol.....	28
3.9.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Isolasi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim L-asparaginase.....	30
4.2 Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	31
4.3 Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	32
4.4 Penentuan Waktu Produksi Optimum L-asparaginase.....	35
4.5 Pengaruh Konsentrasi Substrat Terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase.....	37

4.6 Pengaruh Suhu Inkubasi Terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase.....	38
4.7 Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase.....	39
4.8 Aktivitas dan Kadar Protein L-asparaginase Hasil Fraksinasi dan Dialisis.....	40
4.9 Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kasar dan Fraksi.....	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Berbagai Mikroorganisme Penghasil Enzim L-asparaginase.....	8
2. Perbedaan Suhu Aktivitas Enzim L-asparaginase.....	10
3. Identifikasi Bakteri yang Berasal dari Spons.....	15
4. Isolat Bakteri Hasil Inokulasi.....	31
5. Hasil Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Simbion terhadap <i>E.coli</i> dan <i>S. aureus</i>	32
6. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Isolat DA51(3).....	34
7. Data Hasil Penentuan Wakt Produksi Optimum L-asparaginase dari Bakteri <i>Klebsiella sp</i> DA51(3).....	36
8. Data Pengukuran Aktivitas L-asparaginase masing-masing Fraksi dan Ekstrak Kasar pada [S] yaitu 0,015µg/mL; suhu 37 °C; dan pH 8	42
9. Pengukuran Zona Hambatan Ekstrak Kasar L-asparaginase dan Hasil Fraksinasi (F1-F5).....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme Pemecahan L-asparagin oleh L-asparaginase.....	7
2. Bakteri Gram Negatif dan Bakteri Gram Positif.....	11
3. Struktr Morfologi Spons.....	13
4. Hasil Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Simbion Terhadap <i>E.coli</i> dan <i>S. aureus</i>	33
5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>Klebsiella sp.</i>	35
6. Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Aktivitas L-asparaginase yang Diproduksi oleh Bakteri <i>Klebsiella sp</i> DA51(3)	37
7. Grafik Aktivitas L-asparaginase pada Penentuan Konsentrasi Substrat L-asparagin Optimum.....	39
8. Grafik Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase	40
9. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase	41

DAFTAR SINGKATAN

BSA	: <i>Bovine Serum Albumin</i>
Butt	: Bagian bawah media (letaknya pada dasar tabung)
Uji Indol	: Untuk menentukan kemampuan bakteri dalam memecah asam amino triptofan
Uji Motility	: uji untuk mengetahui gerak bakteri
MRVP	: <i>Methyl Red-Voger Proskaur</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
SIM	: <i>Sulfit Indol Motility</i>
Slant	: Bagian atas media (permukaan media)
TSIA	: <i>Triple Sugar Iron Agar</i>
U	: Unit

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i>	52
2. Bagan Kerja Isolasi Bakteri dari Spons.....	52
3. Bagan Kerja Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba.....	53
4. Pembuatan Media Inokulum.....	54
5. Pembuatan Media Produksi.....	54
6. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum dan Produksi L-asparaginase..	55
7. Pengukuran Aktivitas L-asparaginase.....	58
8. Penentuan Kadar Protein.....	58
9. Penentuan Protein dengan Metode Lowry	59
10. Bagan Kerja Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase dari Isolat Bakteri <i>Klebsiella sp.</i> DA51 (3).....	60
11. Bagan Kerja Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase.....	61
12. Bagan Kerja Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Enzim L-Asparaginase.....	61
13. Bagan Kerja Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	62
14. Bagan Kerja Dialisis.....	63
15. Pengujian Aktivitas Antimikroba.....	64
16. Data Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Penentuan Waktu Produksi Optimum.....	65
17. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase dan Kadar Proteinnya untuk Penentuan Waktu Produksi Optimum.....	65
18. Data Uji Aktvitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan Suhu Inkubasi Optimum.....	70

19. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan Suhu Inkubasi Optimum.....	72
20. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan pH Optimum.....	72
21. Data Aktivitas Ekstrak Kasar dan Hasil Fraksinasi.....	72
22. Data Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar dan Hasil Fraksinasi...	73
23. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.....	73
24. Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba pada Berbagai pengenceran.....	74
25. Hasil Uji Biokimia.....	74
26. Hasil Uji Aktivitas L-asparaginase dari <i>Klebsiella sp.</i>	75
27. Hasil Uji Aktivitas L-asparaginase dari <i>Klebsiella sp.</i>	75
28. Hasil Uji Daya Hambatan Masing-masing Fraksi dan Ekstrak Kasar	75

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki wilayah laut yang sangat luas dan memiliki sumber daya alam hayati laut yang besar. Satu diantara sumber daya alam hayati laut adalah spons yang dapat berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif. Spons merupakan salah satu invertebrata laut yang hidup pada terumbu karang. Selain itu, spons memiliki potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan dalam berbagai keperluan, terutama obat-obatan. Spons laut tergolong ke dalam filum Porifera yang merupakan hewan multiseluler paling sederhana dengan bentuk tubuh dan warna yang beraneka ragam (Asro dkk., 2013).

Kemampuan spons dalam menghasilkan senyawa bioaktif disebabkan oleh hubungan simbiotik dengan mikroorganisme dalam hal ini bakteri. Hubungan ini mencakup penyediaan nutrisi dengan membantu translokasi metabolisme termasuk nitrifikasi, fiksasi nitrogen, fotosintesis dan membantu pertahanan kimiawi serta berperan dalam biofouling. Berdasarkan peranan ini maka bakteri yang bersimbiosis dengan spons diduga memiliki potensi yang besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang selama ini diisolasi dari spons (Lee dkk., 2001). Berkaitan dengan pemanfaatannya, spons menghasilkan senyawa bioaktif yang mempunyai peranan sebagai bahan antibiotik, antijamur, antitumor, dan lain-lain (Rani dan Haris, 2004).

Di antara organisme laut, jumlah terbesar dari metabolit sekunder yang terisolasi sejak tahun 1965 berasal dari spons dan spons juga telah menjadi sumber utama dari molekul biologis aktif. Kegiatan biologis utama metabolit

sekunder dari spons sebagai agen sitotoksik dan antimikroba (Pedradap dkk., 2010).

Organisme laut seperti spons, seringkali hidup berasosiasi dengan bakteri yang menghasilkan senyawa antimikroba. Eksplorasi spons sebagai penghasil senyawa bioaktif juga telah banyak dipublikasikan namun penggunaan produk alami laut yang bersifat antibiotik dan antifungi sebagai hasil metabolit sekunder dari bakteri simbiosis spons, lebih menguntungkan dibandingkan dengan mengisolasi dari inangnya. Pertumbuhan spons yang relatif lambat, selanjutnya membawa implikasi pada keterbatasan pasokan biomassa untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekundernya. Penggunaan bakteri yang hidupnya berasosiasi dengan spons dalam bentuk simbiosis lebih baik karena dapat dimurnikan dan dikultur dalam skala laboratorium sehingga tidak perlu mengoleksinya dari alam, dapat diperbanyak dalam waktu yang cepat dan mudah dimanipulasi dengan menggunakan teknologi molekuler (Abubakar dkk., 2011).

L-asparaginase adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis dari asam amino non esensial L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia yang penting untuk menghambat pertumbuhan sel-sel tumor. Dengan adanya L-asparaginase, sel-sel tumor bisa kehilangan pola pertumbuhan yang merupakan faktor penting sehingga tidak dapat bertahan hidup. Hal ini menunjukkan bahwa perkembangan enzim L-asparaginase berguna sebagai anti tumor atau anti leukimia (Shinha dkk., 2013).

Beberapa senyawa aktif seperti enzim yang diisolasi dalam spons juga ditemukan dalam bakteri simbiosis spons. Oleh sebab itu, beberapa peneliti berpendapat bahwa bakteri terlibat dalam biosintesis senyawa aktif tertentu dalam spons. Adanya hubungan antara produksi senyawa aktif oleh mikroba simbiosis

dengan spons telah diteliti oleh Narshina dan Anil (2000), yang melaporkan bahwa senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis spons (*proteobacterium* MBIC 3368, *Idiomarina sp*, dan *Pseudomonas sp*) sangat dipengaruhi oleh protein rekombinan yang terikat dan terdapat pada biota inang *Suberites domunculla*. Penelitian tersebut memperkuat adanya hubungan kerjasama dalam biosintesis metabolit sekunder antara mikroba simbiosis dan spons (Murniasih dan Rasyid, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Murniasih dan Rasyid (2010) tentang potensi bakteri yang berasosiasi dengan spons sebagai sumber bahan antibakteri, dapat disimpulkan bahwa persentase jumlah koloni tertinggi (100%) bakteri penghambat bakteri patogen diperoleh dari spons *Aaptos sp.*, *Melophlus sarassinorum* dan *Callyspongia sp.*, selanjutnya sebesar 90% dari spons *Clathria sp.*

Penelitian yang dilakukan oleh Abubakar dkk (2011) menunjukkan bahwa bakteri simbiosis spons *Jaspis sp.* menghasilkan senyawa antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan EPEC K-11 serta khamir *Candida albicans* dan *C. tropicalis*.

Berdasarkan beberapa hasil penelitian tersebut, penelitian ini dimaksudkan untuk mengisolasi senyawa bioaktif yaitu L-asparaginase yang berasal dari bakteri simbiosis spons yang berpotensi sebagai bahan antimikroba.

1.2 Perumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Spesies bakteri apa yang dapat menghasilkan L-asparaginase ?
2. Berapa waktu produksi optimum L-asparaginase ?

3. Bagaimana karakteristik L-asparaginase yang diisolasi dari bakteri simbion spons ?
4. Bagaimana aktivitas L-asparaginase dalam menghambat pertumbuhan mikroba ?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan mengkarakterisasi bakteri simbion spons sebagai penghasil L-asparaginase ekstraseluler yang berpotensi sebagai antimikroba.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun yang menjadi tujuan dalam penelitian ini adalah :

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbion spons penghasil L-asparaginase.
2. Menentukan waktu produksi optimum L-asparaginase.
3. Mengkarakterisasi kondisi optimum produksi L-asparaginase seperti suhu, pH, dan konsentrasi substrat.
4. Mengukur aktivitas dari L-asparaginase yang menghambat pertumbuhan mikroba.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai L-asparaginase yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal dan efektif, sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat antimikroba yang baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Enzim

Enzim adalah biokatalisator organik yang dihasilkan organisme hidup di dalam protoplasma, yang terdiri atas protein atau suatu senyawa yang berikatan dengan protein. Apabila enzim dipisahkan satu sama lainnya menyebabkan enzim tidak aktif. Namun keduanya dapat digabungkan menjadi satu, yang disebut holoenzim. Kedua bagian enzim tersebut yaitu apoenzim dan koenzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

Substrat adalah senyawa yang bereaksi dengan bantuan enzim. Contoh enzim yang menguraikan urea (substrat) dinamakan urease. Kelompok enzim yang mempunyai fungsi sejenis diberi nama menurut fungsinya, misalnya hidrolase adalah kelompok enzim yang mempunyai fungsi sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis. Oleh sebab itu, *Commision on Enzymes of the International Union of Biochemistry* telah menetapkan tata nama yang sistematis, disesuaikan dengan pembagian atau penggolongan enzim berdasarkan fungsi enzim (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

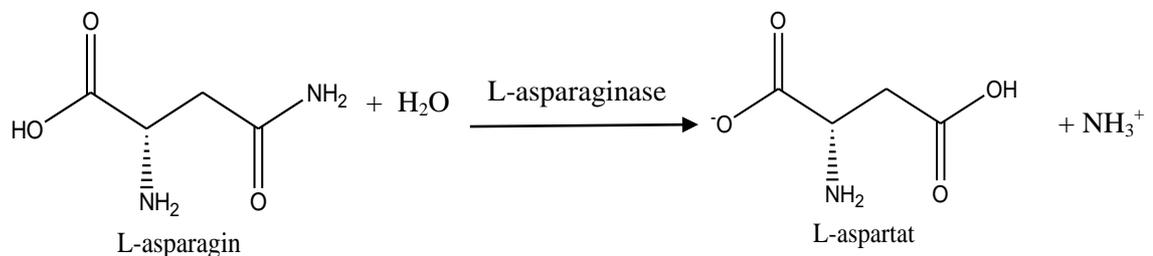
2.1.1 Klasifikasi Enzim

Enzim diklasifikasikan berdasarkan tipe reaksi katalisnya, sedangkan masing-masing enzim diberi nama menurut nama substratnya. *Commision on Enzymes of the International Union of Biochemistry* membagi enzim menjadi enam golongan yaitu oksideruktase (reaksi redoks), transferase (transfer atom atau

gugus), hidrolase (hidrolisis), liase (pengeluaran atom atau gugus), isomerase (isomerasi), ligase (penggabungan dua molekul) (Poedjiadi dan Supriyanti, 2005).

2.1.2 Enzim L-asparaginase

L-asparaginase (*L-asparagin amino hydrolase*, E.C. 3.5.1.1) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan amonia (Savitri dkk., 2003). Enzim L-asparaginase memiliki peran yang penting dalam bidang industri farmasi dan industri makanan (Kumar dkk., 2014). L-asparaginase memiliki potensi sebagai enzim terapi untuk leukemia limfoblastik akut (Didik, 2007). Fungsi lain dari enzim L-asparaginase juga terbukti dapat menurunkan kandungan akrilamida di dalam makanan. L-asparaginase mencegah pembentukan akrilamida dengan mengkonversi asam amino L-asparagin sebagai prekursor menjadi bentuk asam amino lain yaitu asam aspartat yang umum terdapat dalam makanan (Antara, 2009).



Gambar 1. Mekanisme Pemecahan L-asparagin oleh L-asparaginase (Sumber : Shinha dkk., 2013)

L-asparaginase dapat ditemukan pada berbagai hewan, tanaman, dan mikroorganisme. Menurut Savitri dkk (2003), organisme seperti bakteri, jamur, ragi dan actinomycetes merupakan produsen penghasil enzim L-asparaginase yang sangat efisien. Tabel 1 memperlihatkan berbagai mikroorganisme penghasil enzim L-asparaginase.

Tabel 1. Berbagai mikroorganisme penghasil enzim L-asparaginase
(Sumber : Shinha dkk., 2013)

ORGANISME	REFERENSI
BAKTERI	
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Joner.,1976
<i>Bacillus sp.</i>	Mohapatra et al., 1995
<i>B.mesentericus</i>	Tiul Panova et al., 1972
<i>B.polymyxa</i>	Nefelova., 1977
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Mesas et al., 1990
<i>Escherichia coli</i>	Netrval., 1977
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Mukherjee., 2000
<i>E.cloaceae</i>	Nawaz et al., 1988
<i>Erwinia aroideae</i>	Tiwari and Dua., 1996
<i>E.cartovora</i>	Maladkar et al., 1993
<i>Serratia marcescens</i>	Rowly and Wriston., 1967
<i>Staphylococcus sp.</i>	Mikucki et al., 1977
<i>S.aureus</i>	Rozalska and Mikucki., 1992
<i>Streptococcus albus</i>	Reddy and Reddy., 1990
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Tsirka., 1990
<i>Thermus thermophilus</i>	Pritsa et al., 2001
<i>T.aquaticus</i>	Curran et al., 1986
<i>P.stutzeri</i>	Manna et al., 1995
<i>E.chrysanthemi</i>	Moola et al., 1994
<i>Helicobacter pylori</i>	Stark et al., 1997
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Reddy and Reddy.,1990
<i>Mycobacterium phlei</i>	Pasterzak & Szymona.,1976
<i>Bacillus licheniformis</i>	Patta dkk., 2013
YEAST	
<i>Candida utilis</i>	Kil et al., 1995
<i>C.guilliermondii</i>	Stepanyan & Davtyan., 1988
<i>Pichio polymorpha</i>	Foda et al., 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bon et al., 1997
ACTINOMYCETES	
<i>Streptomyces karnatakensis</i>	Mostafa., 1979
<i>S.venezuelae</i>	Mostafa., 1979
<i>S.collinus</i>	Mostafa and Salama., 1979
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Mostafa and Ali., 1983
FUNGI	
<i>Aspergillus nidulans</i>	Drainas & Drainas., 1985
<i>A. terreus</i>	Ali et al., 1994
<i>Cylindrocapon obtusisporum</i>	Raha et al., 1990
<i>Mucor sp.</i>	Mohapatra et al., 1997

Sumber yang paling baik untuk memproduksi L-asparaginase adalah mikroba. Mikroba merupakan sumber yang paling mudah untuk dikultur, diekstraksi, dan dimurnikan dalam produksi skala besar. Mikroorganisme paling ekonomis dan umum yang digunakan untuk memproduksi L-asparaginase adalah *Erwinia caratova*, *Bacillus sp.*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Escheria coli* (Savitri dkk., 2003).

Savitri dkk (2003) melaporkan bahwa L-asparaginase dari *E. Coli* memiliki efektifitas sebagai penghambat pertumbuhan tumor. Selain dapat menghambat pertumbuhan tumor, penelitian yang dilakukan oleh Patro dan Gupta (2012) menunjukkan L-asparaginase dari *Penicillium sp.* memiliki efektifitas sebagai antioksidan dan memiliki aktivitas sitotoksik.

L-asparaginase telah dilaporkan dari berbagai sumber mikroba. Produksi L-asparaginase dari berbagai mikroba menggunakan media fermentasi sebagai sumber karbon dan nitrogennya (Shina dkk., 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sivasankar dkk (2013) untuk produksi L-asparaginase dari isolat *Streptomyces sp.*, sumber karbon yang paling baik untuk produksi enzim adalah maltosa, yang menghasilkan 22 IU enzim. Selain itu, sumber nitrogen yang paling baik adalah kedelai yang menghasilkan 25,7 IU enzim.

L-asparaginase memiliki berbagai variasi berat molekul dari berbagai mikroba. Zhang dkk (2004) melaporkan berat molekul L-asparaginase yang diisolasi dari *Escherichia coli* adalah 138 kD. Sedangkan berat molekul L-asparaginase dari *Helicobacter Pylori* adalah 140 kD (Cappelletti dkk., 2008)

L-asparaginase dari berbagai sumber menunjukkan stabilitas pH yang berbeda. L-asparaginase ekstraseluler dari *Cyberlindnera jadinii* stabil pada pH 4 dengan suhu 50 °C selama 10 menit dan tetap stabil sampai 20 jam pada suhu

37 °C (Sakamoto dkk., 1997). Enzim murni dari *Pseudomonas stutzeri* MB 405 memiliki aktivitas optimum pada pH 9 dan pada suhu 37 °C menunjukkan stabilitas maksimum pada kisaran pH 7,5-9,5 (Manna dkk., 1995). Sedangkan enzim berasal dari *Helicobacterium pylori* J99 stabil pada pH 10 tetapi cepat kehilangan aktivitas ireversibelnya pada pH diatas 10 (Gladilina dkk., 2009). Amena dkk (2010) melaporkan enzim dari *Streptomyces gulbargensis* lebih stabil pada pH basa dan mempertahankan 80% aktivitasnya di pH kisaran 7-10.

Enzim L-asparaginase memiliki pengaruh suhu yang berbeda-beda tergantung dari organismenya. Tabel 2 menunjukkan perbedaan suhu dari berbagai organisme.

Tabel 2. Perbedaan Suhu Aktifitas Enzim L-asparaginase

Organisme	Rentang suhu	Suhu optimum	Referensi
<i>Bacillus coagulans</i>	-	55	Law et al., 1972
<i>Escherichia coli</i>	30-60	60	Li et al, 2007; Zhang et al., 2004
<i>Erwinia aroidea</i>	41-50	41	Liu et al., 1972
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	37	Kumar et al., 2007
<i>Proteus vulgaris</i>	32-62	57	Tosa et al., 1972
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25-60	35	E-I Bessoumy et al., 2004
<i>Pyrococcus furiosus</i>	55-85	80	Bansal et al., 2011
<i>Streptomyces sp.</i>	30-75	50	Basha et al., 2009

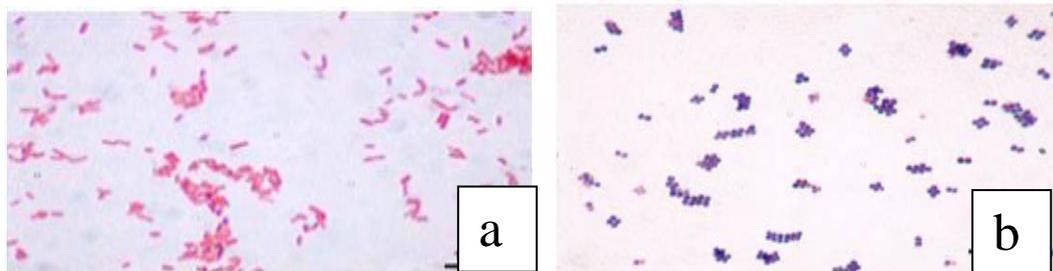
2.2 Tinjauan Umum Bakteri

2.2.1 Morfologi Bakteri

Bakteri adalah sebuah kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan konfigurasi selular prokariotik (tidak mempunyai selubung inti). Bakteri memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. Bakteri berukuran antara 0,5-1,0 μm dan lebar 0,5-2,5 μm (Irianto, 2006).

Bakteri memiliki struktur dasar yang meliputi dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom dan granula penyimpanan. Tetapi beberapa bakteri dengan jenis tertentu memiliki struktur tambahan yang meliputi kapsul (lapisan lendir), flagelum (bulu cambuk), pilus, fimbria, klorosom, vakuola gas dan endospora (Pelczar, 2007).

Bakteri dapat diklasifikasikan dengan berbagai cara. Berdasarkan bentuknya, sel bakteri memiliki berbagai macam bentuk seperti bulat (kokus), batang (basil), dan spiral (spirilia) serta terdapat bentuk antara kokus dan basil yang biasa disebut kokobasil. Salah satu klasifikasi yang sering digunakan adalah pewarnaan gram. Berdasarkan pewarnaan gram bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan pada gram negatif adalah merah. Sedangkan pada gram positif akan menunjukkan warna ungu (Dwidjoseputro, 1998).



Gambar 2. (a) Bakteri Gram Negatif, (b) Bakteri Gram Positif (Jewyner, 2013)

Karakteristik bakteri laut ialah untuk pertumbuhannya memerlukan air laut atau kadar garam, sehingga bakteri laut digolongkan ke dalam kelompok bakteri halofilik (NaCl). Berdasarkan toleransi kadar garamnya, bakteri laut hanya dibagi dua yaitu bakteri halofilik moderat yaitu bakteri yang untuk pertumbuhannya memerlukan 1% hingga 20% NaCl sedangkan bakteri halofilik ekstrim yaitu bakteri yang memerlukan konsentrasi NaCl lebih dari 15% hingga 31% (Lisdayanti, 2013).

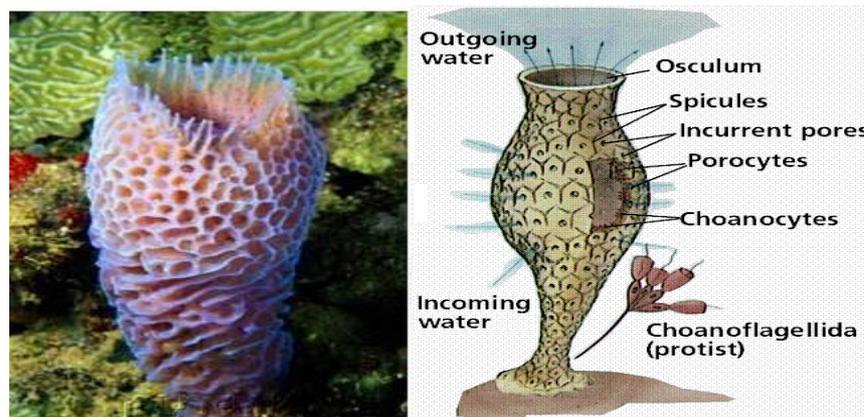
Bakteri mampu berinteraksi dengan berbagai organisme laut, sehingga tidak ada satupun organisme laut yang bebas dari interaksi dengan bakteri. Salah satu bentuk interaksi bakteri ialah interaksi hubungan trofik yaitu interaksi bakteri baik yang hidup bebas maupun yang berada dalam partikel merupakan sumber makanan organisme laut mulai dari ciliata, spons, coelenterata hingga *polychaeta*, moluska, *crustacea*, *holothuria* dan *tunicata* (Rizka, 2013).

2.3 Tinjauan Umum Spons

Salah satu jenis organisme yang berpotensi cukup besar dan berpeluang mengandung senyawa aktif adalah spons. Spons merupakan binatang laut yang hidup di kedalaman sampai dengan 50 meter di bawah permukaan laut. Di dunia diduga terdapat sekitar 10.000 spesies spons dan diperkirakan sekitar 200 spesies hidup di ekosistem terumbu karang Asia Tenggara (Dahuri, 2003). Jumlah spesies spons di Indonesia diperkirakan sebanyak 830 spesies (Sujatmiko, 2000).

Spons termasuk dalam filum porifera yang dibagi dalam tiga kelas yaitu : kelas Hexactinellida, kelas Calcarea, dan kelas Demospongiae. Morfologi luar spons laut dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada dilingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung

pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dan jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam, spons cenderung memiliki bentuk tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal. Secara fisiologis, proses metabolisme hewan spons juga dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan seperti temperatur, kekeruhan, kekuatan arus, cahaya, salinitas serta faktor-faktor kimiawi lainnya (Amir dan Budiyanto, 1996).



Gambar 3. Struktur Morfologi Spons (Farabee, 2007)

Spons sebagaimana organisme hidup lainnya menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang berfungsi sebagai pertahanan tubuhnya terhadap pengaruh buruk lingkungannya. Metabolit-metabolit sekunder yang dihasilkan antara lain berupa senyawa terpen, peptida, dan lain-lain serta memiliki aktivitas biologis dan farmakologis. Penelitian umumnya dilakukan untuk mencari substansi aktif yang memiliki aktivitas antikanker, antivirus, anti-HIV, antibakteri serta bioaktivitas lainnya (Rachmaniar, 2003).

Aktivitas biologis diperiksa dalam 36 ekstrak spons yang dikumpulkan dari Laut Andaman. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas biologis selektif

terhadap *M. tuberculosis* (11,1%), aktivitas sitotoksik terhadap sel Vero (2,8%), anti-malaria (2,8%) dan aktivitas antimikroba (66,7%), sehingga menunjukkan bahwa spons Laut Andaman menyediakan sumber penting dari metabolit sekunder biologis aktif. Beberapa ekstrak spons yang menjanjikan untuk diisolasi lebih lanjut sebagai anti-infeksi dan metabolit sekunder sitotoksik, terutama *Axinyssa sp.*, *Halichondria sp.*, *Phakellia ventilabrum* dan *Chondrosia reticulata* (pedpradab dkk., 2010).

Hasil metabolit sekunder dari beberapa spons terbukti mengandung senyawa-senyawa aktif sebagai "*lead compound*" dalam pengembangan obat antibiotik, antikanker, antivirus dan lain-lain. Hal ini membuktikan bahwa spons sangat potensial dalam pengembangan industri farmasi, mengingat senyawa-senyawa aktif yang dihasilkan mempunyai perbedaan dengan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan darat yang selama ini merupakan sumber utama bahan obat-obatan (Muniasih, 2003).

2.4 Hubungan Spons dan Bakteri yang Bersimbiosis

Perairan laut merupakan salah satu tempat hidup berbagai mikroorganisme dan makroorganisme. Antara mikroorganisme dan makroorganisme akan terjadi interaksi seperti bakteri yang bersimbiosis dengan organisme yang hidup di perairan seperti plankton, ikan, tunikata dan lain sebagainya (Alcamo,1995).

Beberapa senyawa aktif yang diisolasi dalam spons ditemukan dalam bakteri yang bersimbiosis dengannya, oleh sebab itu beberapa peneliti berpendapat bahwa bakteri terlibat sebagian maupun keseluruhan dalam biosintesa senyawa aktif tertentu dalam spons. Beberapa senyawa baru yang mempunyai aktivitas farmakologi telah ditemukan. Salah satu senyawa

antimikroba *norharman* telah diisolasi dari bakteri *Pseudoalteromonas piscicida* yang berasosiasi dengan spons *Hymeniacida perleve*. Komunitas bakteri yang berasosiasi dengan spons sebagian besar adalah *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* dan *Actinomycetes* (Murniasih dan Rasyid, 2010).

Kelimpahan jenis bakteri yang bersimbiosis pada spons diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Identifikasi Bakteri yang Berasal dari Spons

Nama Spons	Spesies Bakteri	Referensi
	<i>Pseudomonas sp.</i> ,	
	<i>Aeromonas, Vibrio sp.</i> ,	Rheinhemer,1991
<i>Microcionia prolifera</i>	<i>Achoromobacter,</i> <i>Flavobacterium,</i> <i>Corynebakterium</i>	
<i>Callyspongia sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	
<i>Jaspis sp</i>	<i>Flavobacterium</i>	Murniasih, 2010
<i>Aplisina sp</i>	<i>Aeromonas sp</i>	

Spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia sp.* diketahui memiliki kemampuan menghasilkan senyawa bioaktif yang potensial. Sebagai hewan metazoan dengan struktur tubuh yang sederhana, morfologi dan asosiasi yang dibentuk oleh spons dengan bakteri simbion dapat mempengaruhi tipe dan aktivitas senyawa bioaktifnya, seperti halnya adaptasi spons terhadap habitatnya (Ismet dkk., 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Tinambunan (2012), membuktikan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan spons berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S. aureus*.

2.5 Penyakit yang Disebabkan oleh Bakteri

Bakteri patogen merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia, hewan, dan juga pada tumbuhan (Pelczar dan Chan, 1988). Beberapa Jenis bakteri patogen yang umum menjadi penyebab masalah kesehatan manusia, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* (Nurhayati dkk., 2006). Resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik-antibiotik yang ditemukan telah menjadi masalah besar bagi kesehatan. Pencarian suatu antibakteri sangat perlu dilakukan untuk menghambat dan membunuh bakteri-bakteri patogen (Tinambunan dkk., 2012).

Infeksi *Staphylococcus aureus* pada manusia dapat ditularkan secara langsung melalui selaput mukosa yang bertemu dengan kulit. Bakteri ini dapat menyebabkan endokarditis, osteomielitis akut hematogen, meningitis, ataupun infeksi paru-paru. Sedangkan bakteri *Escherichia coli* adalah bagian flora normal gastrointestinal manusia (Jawetz dkk., 2005). Pada kondisi tertentu bakteri *Escherichia coli* menyebabkan penyakit diare, infeksi saluran kemih, pneumonia dan meningitis pada bayi baru lahir serta infeksi luka dalam (Josodiwondo dkk.,1993). *Pseudomonas aeruginosa* menginfeksi darah, kulit, telinga, mata, saluran kemih, pada luka bakar akan menyerang darahnya menghasilkan nanah, sedangkan *Streptococcus epidermidis* dan *Shigella flexneri* penyebab infeksi kulit dan usus (Karsinah dkk., 1994).

Widoranti (2008) melakukan penelitian mengenai udang yang terkontaminasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* bila masuk dalam tubuh manusia dapat menyebabkan infeksi gastrointestinal, yang ditandai dengan muntah-muntah, diare dan rusaknya pembuluh darah.

2.6 Tinjauan Umum Antimikroba

Antimikroba adalah suatu bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme. Pemakaian bahan antimikroba merupakan suatu usaha untuk mengendalikan bakteri maupun jamur, yaitu segala kegiatan yang dapat menghambat, membasmi, atau menyingkirkan mikroorganisme. Tujuan utama pengendalian mikroorganisme untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan dan kerusakan oleh mikroorganisme (Pelczar & Chan, 1988).

Antimikroba menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara bakteriostatik atau bakterisida. Hambatan ini terjadi sebagai akibat gangguan reaksi yang esensial untuk pertumbuhan. Reaksi tersebut merupakan satu-satunya jalan untuk mensintesis makromolekul seperti protein atau asam nukleat, sintesis struktur sel seperti dinding sel atau membran sel dan sebagainya. Antibiotik tertentu dapat menghambat beberapa reaksi, reaksi tersebut ada yang esensial untuk pertumbuhan dan ada yang kurang esensial (Suwandi, 1992).

Pengujian aktivitas bahan antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan melalui dua cara. Cara pertama yaitu metode dilusi, cara ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum dan kadar bunuh minimum dari bahan antimikroba. Prinsip dari metode dilusi menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi medium cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Selanjutnya masing-masing tabung diisi dengan bahan antimikroba yang telah diencerkan secara serial, kemudian seri tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan konsentrasi terendah bahan antimikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada

pertumbuhan jamur merupakan konsentrasi hambat minimum). Biakan dari semua tabung yang jernih ditumbuhkan pada medium agar padat, diinkubasi selama 24 jam, dan diamati ada tidaknya koloni jamur yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan pada medium padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan jamur adalah merupakan konsentrasi bunuh minimum bahan antimikroba terhadap jamur uji (Tortora dkk., 2001).

Cara kedua yaitu metode difusi cakram (Uji Kirby-Bauer). Prinsip dari metode difusi cakram adalah menempatkan kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba tertentu pada medium lempeng padat yang telah dicampur dengan jamur yang akan diuji. Medium ini kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam, selanjutnya diamati adanya zona jernih disekitar kertas cakram. Daerah jernih yang tampak di sekeliling kertas cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Jamur yang sensitif terhadap bahan antimikroba akan ditandai dengan adanya daerah hambatan disekitar cakram, sedangkan jamur yang resisten terlihat tetap tumbuh pada tepi kertas cakram (Tortora dkk., 2001).

2.7 Fraksinasi Enzim

Pada umumnya ada beberapa langkah yang dilakukan dalam pemurnian enzim yaitu fraksinasi dengan garam atau pelarut organik dan dialisis. Pengendapan dengan garam anorganik atau pelarut organik bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi enzim. Amonium sulfat merupakan garam yang umumnya digunakan dalam fraksinasi karena memiliki daya larut yang tinggi dalam air, tidak mengandung zat yang bersifat toksik, protein stabil di dalam larutan amonium sulfat 2-4 M, protein terlindungi dari denaturasi, dan membatasi

pertumbuhan bakteri serta relatif tidak mahal (Scope, 1987 dalam Natsir dkk, 2010).

Prinsip pengendapan dengan amonium sulfat berdasarkan pada kelarutan protein yang merupakan interaksi antara gugus polar dengan molekul air, interaksi ionik protein dengan garam dan daya tolak menolak protein yang bermuatan sama. Kelarutan pH dan suhu tertentu akan meningkat saat konsentrasi garam meningkat sampai pada konsentrasi tertentu (*salting in*). Penambahan garam dengan konsentrasi tertentu menyebabkan kelarutan protein akan menurun (*salting out*). Molekul air yang berikatan dengan ion-ion garam semakin banyak sehingga terjadi penarikan air yang mengelilingi permukaan protein. Pengendapan ini mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi, dan mengendap (Scope, 1987 dalam Natsir, 2010).

Dialisis dilakukan bertujuan untuk menghilangkan senyawa kecil dan kelebihan garam amonium sulfat yang turut mengendap bersama dengan protein. Proses dialisis terjadi karena konsentrasi garam lebih tinggi di dalam membran dialisis daripada di luar membran, sehingga menyebabkan larutan penyangga atau air masuk ke dalam dialisat. Hal ini terjadi pada proses awal dialisis. Selanjutnya garam akan keluar melalui membran hingga tercapai kondisi keseimbangan. Tetapi setelah proses dialisis biasanya terjadi penurunan aktivitas enzim yang kemungkinan disebabkan oleh hilangnya ion penting yang dapat berfungsi mengaktifkan enzim atau disebut sebagai kofaktor (Plummer, 1979 dalam Natsir, 2010).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel spons, biakan murni bakteri *Escherichia coli* (Bakteri Gram Negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Bakteri Gram Positif) (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin), media *Nutrien Broth* (NB), media Nutrien Agar (NA), media Muller Hilton Agar (MHA), ekstrak yeast, pepton, glukosa, L-asparagin p.a, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p.a, KH_2PO_4 p.a, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a, NaCl fisiologis, alkohol 70%, klorampenikol, buffer A (Tris (hidroksimetil) amino metana 0,1 M pH 8.4, NaCl 2 M, CaCl_2 0,01 M, β -merkaptotanol 1%, Triton X-100 0,5%), buffer B (Tris (hidroksimetil) amino metana 0,1 M pH 8.4, NaCl 0,2 M, CaCl_2 0,01 M), buffer C (Tris (hidroksimetil) amino metana 0,01 M pH 8.4, NaCl 0,2 M, CaCl_2 0,01 M), lowry A (Larutan asam folin-ciocalteus dengan akuades 1:1), lowry B (Na_2CO_3 2%; NaOH 0,1 N $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1%, Natrium kalium tartrat 2%), indikator fenol merah, akuades, TCA 1,5 M, reagen Nessler, BSA (*Bovine serum albumin*), bakto agar, NH_4Cl , tris(hidroksimetil)-aminometan p.a, KI, MgCl_2 p.a, NaOH p.a, kertas pH universal, air laut, kapas, spiritus, aluminium foil, *cling wrap*, dan kertas saring.

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, *sentrifuse* dingin, spektronik 20D+, neraca analitik, *hotplate*, *magnetic stirrer*, termometer, *shaker incubator*, inkubator, autoklaf, oven, *vortex*, enkas, mikropipet, pinset,

cawan petri, jarum ose, pH meter, lemari pendingin, penangas air, mistar geser, botol gelas, dan alat gelas lainnya yang umum di laboratorium.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Mei 2015 di Laboratoium Biokimia, jurusan Kimia FMIPA, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Sedangkan pengambilan sampel penelitian dilakukan di perairan Pulau Barang Lompo, Sulawesi Selatan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel spons diambil di perairan Pulau Barang Lompo Makassar Sulawesi Selatan pada kedalaman sekitar \pm 10-20 M. Spons kemudian dicuci dengan air laut steril dan disimpan di dalam *ice box* dan dibawa ke laboratorium (Pastra dkk, 2012 dan Rizka, 2013).

3.4.2 Pembuatan Media

3.4.2.1 Media Nutrient Broth (NB)

Media *Nutrient Broth* dibuat dengan melarutkan *Nutrient Broth* 8 g/L dalam 60 mL air laut. Selanjutnya media diatur pH-nya hingga 7,0 dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama \pm 15 menit (Sartika, 2014).

3.4.2.2 Media Agar (Media Padat)

Media agar atau media padat yang digunakan sebagai wadah tempat pertumbuhan bakteri yang akan diisolasi dibuat dengan melarutkan 3 g/L pepton, 5 g/L L-asparagin, 0,75 g/L KH_2PO_4 , 20 g/L bakto agar, 0,8 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L gram NaCl, 1,0 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, dan 0,05 g/L fenol *red* dalam 100 mL

akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 2 atm selama ± 15 menit (Yulianti dkk, 2012 dan Natsir dkk, 2010).

3.4.2.3 Pembuatan Media Inokulum

Medium inokulum dibuat dengan melarutkan 3,0 g/L pepton, 5,0 g/L L-asparagin, 1,0 g/L ekstrak yeast, 6,0 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 3,0 g/L KH₂PO₄, 0,49 g/L MgSO₄, 0,05 g/L NaCl, 0,002 g/L CaCl₂ dalam akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan disterilkan selama 30 menit di dalam autoklaf, media yang telah disterilkan disimpan dalam erlenmeyer untuk proses selanjutnya (Yulianti dkk, 2012).

3.4.2.4 Pembuatan Media Produksi

Medium produksi dibuat dengan melarutkan 3,0 g/L pepton, 5,0 g/L L-asparagin, 1,0 g/L ekstrak yeast, 6,0 g/L Na₂HPO₄·2H₂O, 3,0 g/L KH₂PO₄, 0,49 g/L MgSO₄, 0,05 g/L NaCl, 0,002 g/L CaCl₂, dilarutkan dalam akuades. Selanjutnya larutan dipanaskan dan disterilkan selama 30 menit ke dalam autoklaf, didinginkan kemudian dituang ke dalam erlenmeyer steril (Yulianti dkk, 2012).

3.4.2.5 Penyegaran Sampel Dalam Media Nutrient Broth

Sebanyak 15 gram sampel spons dibilas dengan 30 mL air laut steril. Kemudian air bilasan dimasukkan ke dalam 30 mL media NB lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam. Sedangkan bagian utuh spons dihaluskan menggunakan blender dan dimasukkan ke dalam 20 mL media NB lalu dikocok menggunakan *shaker* pada suhu kamar selama 24 jam (Sartika, 2014).

3.4.3 Isolasi Bakteri penghasil L-asparaginase dari Spons

Sampel yang telah disegarkan pada media NB diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-5} . Setelah itu masing-masing pengenceran dimasukkan ke dalam 20 mL medium pertumbuhan dan kemudian diaduk menggunakan *waterbath shaker* pada 100 rpm selama 24 jam pada suhu 37 °C. Sampel selanjutnya diinokulasikan dalam cawan petri sebanyak 50 µL secara aseptik dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator selama 1-3 hari dan dilakukan pengamatan setiap hari. Produksi L-asparaginase oleh bakteri akan melepaskan amoniak sehingga meningkatkan pH medium pembiakan. Perubahan pH membentuk warna pink dan diameter zona merah muda di sekitar koloni yang memproduksi L-asparaginase (Sartika, 2014; Rizka, 2013; Pastra dkk, 2012; Patta dkk, 2013; Nathiya dkk, 2011).

3.4.4 Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Seleksi isolat yang menghasilkan senyawa antimikroba dilakukan secara kualitatif, dengan menggores atau menotolkan isolat pada permukaan media yang telah disebar dengan bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aerus*). Selanjutnya diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37 °C. Isolat yang menghasilkan senyawa antimikroba ditandai dengan adanya zona bening dan isolat yang membentuk zona bening dengan aktivitas tertinggi setelah tiga kali pengulangan dipilih untuk penelitian selanjutnya (Sartika, 2014).

3.4.5 Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Isolat yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar diidentifikasi. Identifikasi yang dilakukan meliputi pewarnaan gram dan pengujian biokimia. Pewarnaan gram dimulai dengan isolat bakteri diletakkan di atas kaca preparat

kemudian ditambahkan NaCl fisiologis. Preparat diangin-anginkan pada suhu kamar dilanjutkan dengan fiksasi panas. Setelah itu, ditambahkan kristal violet, didiamkan selama 1 menit. Kaca preparat dibilas dengan air mengalir, lalu ditambahkan dengan larutan lugol dan didiamkan selama 30 detik, kemudian dibilas kembali dengan air mengalir. Selanjutnya, preparat ditambahkan dengan alkohol selama 2 detik dan dibilas kembali dengan air mengalir. Kemudian ditambahkan larutan safranin lalu didiamkan selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir lalu preparat dikeringkan. Setelah kering, preparat ditetesi dengan minyak imersi kemudian diamati dengan mikroskop (Sartika, 2014).

Uji Biokimia terdiri dari uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfit Indol Motility*), uji fermentasi gula-gula, sitrat, urea, VP-MR (*Methyl Red-Voger Proskaur*) (Sartika, 2014).

3.4.6 Penyiapan Inokulum

Isolat mikroba yang telah ditumbuhkan diambil 2-3 ose kemudian dimasukkan ke dalam medium inokulum yang telah disiapkan sebelumnya. Biakan mikroba tersebut *dishaker* panas dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam pada suhu 37 °C (Limbu, 2013).

3.4.7 Penentuan Waktu Produksi Optimum Enzim L-asparaginase

Penentuan waktu produksi optimum dilakukan pada proses fermentasi dalam medium yang mengandung L-asparagin sebagai substrat. Inokulum yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, diambil sebanyak 10 % untuk diinokulasikan ke dalam medium produksi dengan volume total sebanyak 150 mL. Sampel dikocok menggunakan *shaker* pada suhu 37 °C selama 1-4 hari untuk mengetahui waktu produksi optimum enzim L-asparaginase. dan setiap 24 jam dilakukan sampling untuk pengukuran pertumbuhan mikroba yang dikenal

dengan pengukuran OD (*Optical Density*) pada panjang gelombang maksimum. Kemudian diukur aktivitasnya serta ditentukan kadar proteinnya (Sartika, 2014 dan Limbu, 2013).

3.4.8 Pengaruh Konsentrasi Substrat L-asparagin Optimum dalam Produksi L-asparaginase

Penentuan konsentrasi substrat L-asparagin optimum dilakukan setelah didapatkan waktu produksi optimum. Penentuan konsentrasi substrat L-asparagin optimum dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi substrat L-asparagin yaitu 0,005 µg/mL; 0,010 µg/mL; 0,015 µg/mL; 0,020 µg/mL; dan 0,025 µg/mL (Yulianti dkk, 2012).

3.4.9 Produksi L-asparaginase

Apabila waktu produksi optimum enzim telah diketahui, maka dilakukan produksi L-Asparaginase dalam jumlah (volume) yang besar sekitar 250 mL pada kondisi optimal tersebut. Media produksi yang mengandung kultur disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat dan sel. Filtrat yang merupakan ekstrak kasar enzim disimpan dalam lemari es untuk proses selanjutnya (Sartika, 2014 dan Limbu, 2013).

3.5 Penentuan Kadar Protein

Kadar protein diukur dengan menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal. Sebanyak 1 mL larutan sampel (ekstrak kasar enzim L-asparaginase), 1 mL larutan standar dan 1 mL akuades sebagai blanko dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2,75 mL reagen Lowry B lalu campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 10-15 menit. Setelah itu ditambahkan 0,25 mL reagen Lowry A, lalu didiamkan

pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimal (Limbu, 2013).

3.6 Pengukuran Aktivitas L-asparaginase

L-asparaginase yang diproduksi pada fermentasi yang mengubah L-asparagin menjadi asam L-aspartat dan melepaskan amoniak. Amoniak ini kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan reagen Nessler. Campuran reaksi terdiri dari 0,05 mL ekstrak kasar enzim, 0,85 mL L-asparagin, 0,1 mL buffer tris-Cl 0,1 M pH 8, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi selanjutnya ditambahkan 0,25 mL TCA 1,5 M. Kemudian campuran disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm 0,25 mL supernatan diencerkan hingga 4,25 mL menggunakan akuabides kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Nessler. Amonia yang dilepaskan oleh hidrolisis enzim L-asparaginase bereaksi dengan reagen Nessler. Lalu ditentukan kadarnya menggunakan standar amonium klorida pada panjang gelombang 400 nm. Satu unit L-asparaginase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk melepaskan atau mengkatalisis 1,0 µmol amoniak per menit pada kondisi pengujian (Patta dkk, 2013; Nathiya dkk, 2011; Yulianti dkk, 2012).

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y-b}{a} \times \frac{V. \text{ Total}}{V. \text{ Analisis}} \times \frac{1}{V. \text{ Enzim}} \times \frac{1}{t. \text{ Inkubasi}}$$

Dimana :

y = Absorbansi

a = Slope

b = intersept

V. Total = Volume enzim + substrat + buffer + TCA (1,25 mL)

V. Analisis = Volume total yang di analisis (0,25 mL)

V. Enzim = Volume enzim yang dianalisis (0,05 mL)

t. inkubasi = 30 menit

3.6.1 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase

Aktivitas L-asparaginase dievaluasi pada pH yang beragam. Penentuan pH optimal dilakukan dengan menginkubasi ekstrak kasar enzim menggunakan larutan buffer fosfat dan bufer tris-Cl berkisar 6 sampai 10 (Yulianti dkk, 2012).

3.6.2 Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase

Aktivitas L-asparaginase dievaluasi pada temperatur yang beragam pada suhu optimum. Ekstrak kasar enzim diinkubasi pada rentang suhu 30 sampai 60 °C dengan interval 10 °C (Yulianti dkk, 2012).

3.7 Fraksinasi

Ekstrak kasar enzim difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan masing-masing: 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 %, 80-100 %.

3.8 Dialisis

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah buffer (Tris-Hcl 0,1 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M) 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 (Tris-Hcl 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M) lalu diaduk dengan *magnetic stirrer*. Dialisis terus dilakuakn sampai larutan buffer tidak berwarna lagi.

3.9 Pengujian Aktivitas Antimikroba

3.9.1 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri

3.9.1.1 Media Nutrient Agar (NA)

Media nutrient Agar dibuat dengan melarutkan 0,46 mg media NA dengan 20 mL akuades sambil dipanaskan di atas penangas air hingga mendidih. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama \pm 15 menit. Selanjutnya media tersebut didinginkan pada suhu kamar dan dimiringkan kurang lebih 45 ° (Sartika, 2014).

3.9.1.2 Media Muller Hilton Agar (MHA)

Media Muller Hilton Agar (MHA) dibuat dengan melarutkan 7,8 g media MHA dengan 200 mL akuades. Setelah larut media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121 °C, tekanan 2 atm selama \pm 15 menit (Sartika, 2014).

3.9.2 Penyiapan Bakteri Uji

3.9.2.1 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murninya, masing-masing diambil sebanyak 1 ose lalu diinokulasikan dengan cara digores pada media NA miring. Kultur bakteri pada masing-masing agar miring diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam (Sartika, 2014).

3.9.2.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* 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 fisiologis 0,9% steril (Sartika, 2014).

3.9.3 Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol positif digunakan kloramfenikol dengan konsentrasi 300 ppm, dibuat dengan cara melarutkan 0,03 g kloramfenikol dalam 100 mL akuades (diperoleh larutan kloramfenikol dengan konsentrasi 300 ppm). Larutan tersebut dipipet sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan akuades hingga volume larutan 10 mL. Sedangkan larutan kontrol negatif digunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebanyak 1 mg/ml (Sartika, 2014).

3.9.4 Pengujian Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode penapisan difusi agar *paper disc* ukuran 6 mm. Media MHA steril didinginkan pada suhu 40-45 °C. Kemudian dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL dan dimasukkan suspensi bakteri uji sebanyak 0,5 mL. Setelah itu, Sebanyak 15 µL sampel, kontrol (+), dan kontrol (-) ditetaskan di atas *paper disc* 6 mm, kemudian diletakkan di atas permukaan media nutrisi agar yang sebelumnya sudah diinokulasi bakteri bioindikator (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*). Inkubasi dilakukan pada suhu 30 °C selama 24-48 jam lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan mistar geser. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar *paper disc* (Murniasih dan Rasyid, 2010).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri Symbion Spons Penghasil Enzim L-asparaginase

Penelitian ini dilakukan isolasi bakteri simbiosis spons *Callispongia sp* yang diambil dari pulau Barang Lompo, Sulawesi Selatan. Bakteri simbiosis spons yang diisolasi baik dari bagian luar dan bagian dalamnya bertujuan untuk mengetahui bagian mana pada bakteri simbiosis yang memiliki kemampuan yang baik dalam menghasilkan senyawa antimikroba. Selanjutnya, dilakukan pengenceran bertingkat dari 10^{-1} hingga 10^{-5} , hal ini didasarkan pada perkiraan jumlah mikroba yang tersuspensi dalam cairan.

Hasil inokulasi dengan metode agar tuang sangat bervariasi pada setiap pengenceran setelah pengamatan selama 3 hari. Koloni bakteri hasil inokulasi pada pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3} baik dari air bilasan spons dan spons sangat padat dan berbentuk gerombolan, Sedangkan pada pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} tidak begitu padat dan bentuk koloninya tunggal besar. Hal ini menunjukkan pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} memiliki kriteria paling ideal untuk mewakili hasil inokulasi.

Hasil inokulasi diberi kode LA untuk bakteri yang diisolasi dari air bilasan spons dan DA untuk bakteri yang diisolasi dari spons tersebut. Berdasarkan hasil inokulasi bakteri pada Tabel 4, DA4 dan DA5 akan dilanjutkan untuk pemurnian koloni bakteri. Pemurnian koloni bakteri hasil inokulasi diberi kode DA41(1), DA41(2), DA41(3), DA42(1), DA42(2), DA42(3), DA51(1), DA51(2), DA51(3), DA52(1), DA52(2), DA52(3).

Tabel 4. Isolat Bakteri Hasil Inokulasi

Kode Isolat	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
LA1(1)	++	+++	+++
LA1(2)	++	+++	+++
LA2(1)	+	+	+
LA2(2)	+	+	+
LA3(1)	+	+	+
LA3(2)	++	++	++
LA4(1)	-	-	-
LA4(2)	-	-	-
LA5(1)	-	-	-
LA5(1)	-	-	-
DA1(1)	+++	+++	+++
DA1(2)	+++	+++	+++
DA2(1)	+++	+++	+++
DA2(2)	+++	+++	+++
DA3(1)	+++	+++	+++
DA3(2)	+++	+++	+++
DA4(1)	++	++	++
DA4(2)	++	++	++
DA5(1)	+	+	+
DA5(2)	+	+	+

Keterangan : - Tidak ada + Sedikit
++ Banyak +++ Sangat Banyak

Bakteri simbiosis spons yang dapat menghasilkan enzim L-asparaginase dapat diketahui dengan mengamati perubahan warna yang terjadi pada media padat pertumbuhan bakteri. Bakteri yang memproduksi L-asparaginase akan melepaskan amoniak sehingga meningkatkan pH medium yang ditandai dengan perubahan warna dari kuning menjadi merah muda dan terbentuk koloni bakteri. (Lampiran 23).

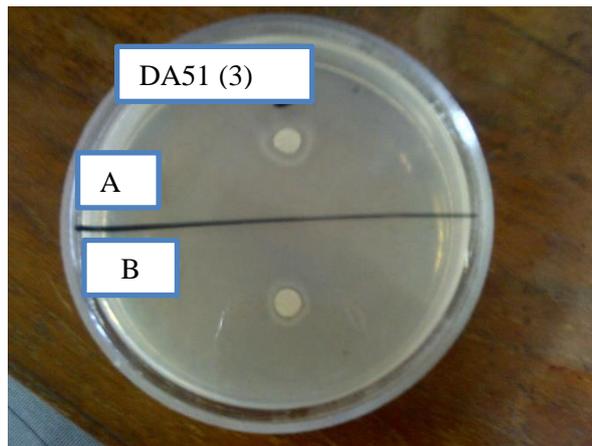
Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa terdapat 4 isolat dengan aktivitas pertumbuhan yang baik dalam menghasilkan L-asparaginase, keempat isolat tersebut yaitu DA4(1), DA4(2), DA5(1), dan DA5(2). Sehingga keempat isolat tersebut digunakan untuk seleksi isolat penghasil senyawa antimikroba.

4.2 Seleksi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan senyawa antimikroba dapat diketahui dengan melakukan uji aktivitas antimikroba secara kualitatif dengan cara menggores atau menotolkan isolat bakteri uji (*Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*) pada permukaan media yang telah mengandung bakteri hasil inokulasi dan pemurnian kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37 °C. Pemilihan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri uji karena masing-masing bakteri mewakili sifat dari bakteri Gram negatif (*E. coli*) maupun bakteri Gram positif (*S.aureus*).

Tabel 5. Hasil Uji Daya Hambat Isolat Bakteri Symbion terhadap *E. coli* dan *S. aureus*

Kode Isolat	Diameter Hambat Bakteri uji			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
DA41 (1)	-	-	-	-
DA41 (2)	-	-	-	-
DA41 (3)	-	4,5 mm	-	1,35 mm
DA42 (1)	-	-	-	-
DA42 (2)	-	3,5 mm	-	4,4 mm
DA42 (3)	-	-	-	-
DA51 (1)	0,75 mm	5,2 mm	1,55 mm	2,6 mm
DA51 (2)	0,6 mm	2,5 mm	0,45 mm	3,1 mm
DA51 (3)	3 mm	6,4 mm	3,05 mm	9,2 mm
DA52 (1)	0,6 mm	6,2 mm	1,3 mm	4,1 mm
DA52 (2)	1 mm	3,5 mm	0,7 mm	4,2 mm
DA52 (3)	2 mm	5,5 mm	0,4 mm	4,2 mm



Gambar 4. Hasil uji daya hambat isolat bakteri simbion terhadap *E. coli* (B) dan *S. aureus* (A)

Menurut Nofiani dkk (2009) terbentuknya zona hambat (bening) pada koloni isolat bakteri yang diuji menandakan bahwa isolat bakteri yang diuji memiliki aktivitas antimikroba. Berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk dari keempat isolat ternyata yang menghasilkan zona bening yang terbesar yaitu isolat DA51(3) sebesar 3,5 mm selama 24 jam dan 9,2 mm selama 48 jam untuk bakteri uji *S. aureus* dan 3 mm selama 24 jam dan 6,4 mm selama 48 jam untuk bakteri uji *E. coli*, sehingga isolat DA51(3) yang diisolasi dari spons digunakan sebagai isolat terpilih untuk diidentifikasi dan produksi ekstrak kasar enzim L-asparaginase.

4.3 Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba

Isolat DA51(3) yang memiliki aktivitas antimikroba terbesar diidentifikasi dengan cara pewarnaan Gram dan uji biokimia sederhana meliputi uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), SIM (*Sulfit Indol Motility*), MRVP (*Methyl Red-Voger Proskaur*), sitrat, urea, dan uji fermentasi gula-gula (glukosa, laktosa, sukrosa, dan manitol). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 6.

Hasil pewarnaan Gram yang diamati secara mikroskopis memperlihatkan bahwa isolat bakteri DA51(3) merupakan bakteri Gram negatif yang ditunjukkan dengan sel yang berwarna merah dan berbentuk basil atau batang saat pengamatan dengan menggunakan mikroskop.

Tabel 6. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana Isolat DA51(3)

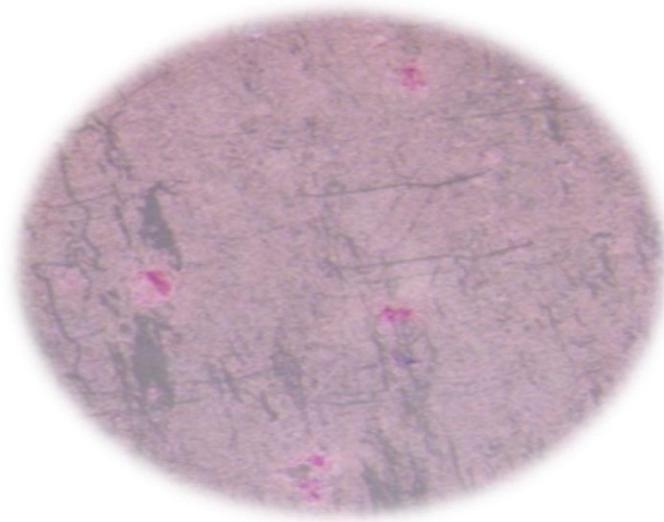
Pengujian		Hasil
Pewarnaan Gram	Bentuk Gram	Basil (Batang) kokoh Negatif
TSIA	Slant	+ (Acid)
	Butt	+ (Acid)
	H ₂ S	-
	Gas	+
SIM	Indol	-
	Motility	-
	H ₂ S	-
MR-VP	MR	+
	VP	-
Sitrat		+
Urea		+
Uji Gula-gula	Glukosa	+
	Laktosa	+
	Sukrosa	+
	Mannitol	+

Dari Tabel 6, hasil uji biokimia sederhana dengan media TSIA menunjukkan hasil positif. Media TSIA merupakan media yang mengandung tiga jenis gula yaitu glukosa, laktosa, dan sukrosa. Hasil inkubasi menunjukkan bahwa karbohidrat dalam medium mengalami fermentasi. Hal ini ditunjukkan dari perubahan warna media dari merah muda menjadi kuning, yang berarti kondisi media dalam lingkungan asam.

Isolat bakteri tersebut tidak menghasilkan H₂S karena tidak terbentuk endapan hitam tetapi menghasilkan gas yang ditandai dengan timbulnya retakan di media pada bagian ujung tabung reaksi. Uji SIM (*Sulfit Indol Motility*) memberikan hasil bahwa isolat bakteri tersebut tidak bersifat motil.

Hasil uji sitrat menunjukkan bahwa bakteri memiliki kemampuan dalam memfermentasi sitrat yang ditandai adanya perubahan warna media dari hijau menjadi biru. Sedangkan uji urea menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan urease yang dapat menghidrolisis urea yang ditandai terbentuknya warna merah muda.

Asam yang dihasilkan dari hasil fermentasi berupa asam campuran (metilen glikon) yang ditandai dengan warna kuning menjadi merah pada uji *Methyl Red*. Isolat bakteri ini tidak mampu menggunakan fermentasi butanadiol melalui uji *Voges-Proskauer* karena tidak membentuk cincin yang berwarna merah.



Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram bakteri *Klebsiella sp*

Berdasarkan beberapa pengujian yang telah dilakukan baik pewarnaan Gram dan Uji biokimia sederhana serta didukung oleh ciri morfologi dan fisiologi, isolat DA51(3) yang diisolasi dari spons menunjukkan karakteristik yang mirip pada bakteri *Klebsiella sp*, oleh karena itu isolat bakteri simbion DA51(3) selanjutnya diberi nama *Klebsiella sp* DA51(3).

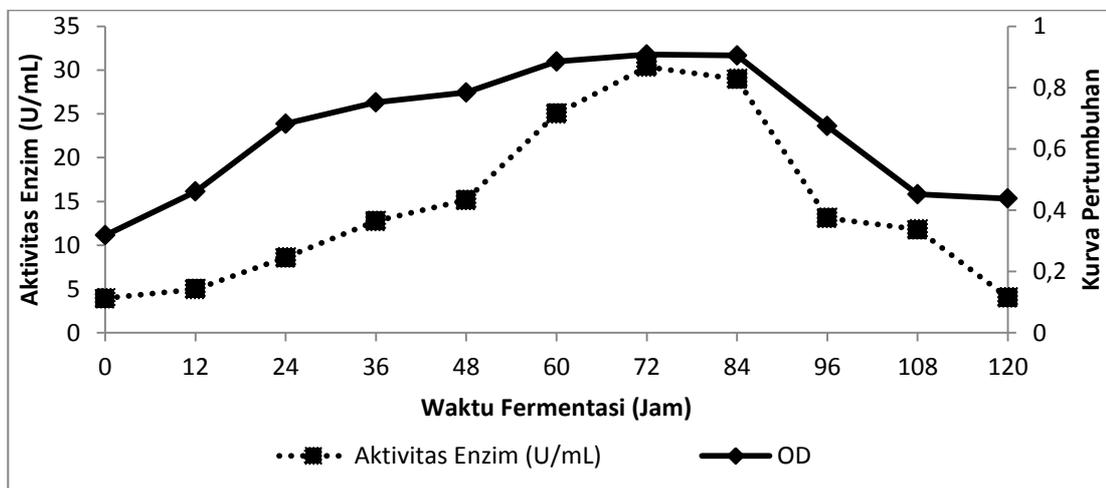
4.4 Penentuan Waktu Produksi Optimum L-asparaginase

Tahap awal produksi L-asparaginase adalah menyiapkan inokulum aktif yang mengandung L-asparagin sebagai substrat dari bakteri *Klebsiella sp* DA51(3). Inokulum tersebut difermentasi pada suhu 37 °C selama 1-5 hari. Setiap 12 jam dilakukan *sampling* untuk menentukan waktu produksi optimum L-asparaginase dengan mengukur kurva pertumbuhan bakteri (OD) pada panjang gelombang 660 nm, mengukur aktivitas enzim pada panjang gelombang 460 nm, dan menentukan kadar protein pada panjang gelombang 640 nm.

Tabel 7. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum L-asparaginase dari Bakteri *Klebsiella sp* DA51(3)

Waktu Fermentasi (jam)	OD	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Enzim (U/mL)
0	0,318	0,119	3,939
12	0,461	0,113	4,976
24	0,682	0,131	8,604
36	0,752	0,136	12,751
48	0,784	0,140	15,169
60	0,885	0,144	25,018
72	0,908	0,184	30,374
84	0,905	0,174	28,991
96	0,674	0,123	13,096
108	0,452	0,105	11,800
120	0,438	0,074	4,026

Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 7, pada jam ke-0 sampai jam ke-48 terjadi fase lamban (lag) dimana pada fase ini bakteri masih beradaptasi dengan lingkungannya, pada fase ini diperoleh nilai OD yang tidak beraturan. Pada jam ke-48 sampai jam ke-60 merupakan fase logaritma (eksponensial), dimana pada fase ini terjadi peningkatan jumlah bakteri disebabkan dari pembelahan bakteri yang meningkat karena telah beradaptasi dengan lingkungannya serta nutrisi yang dibutuhkan tersedia dalam media dan mencukupi untuk kelangsungan hidup dan perkembangbiakan bakteri. pada jam ke-60 sampai jam ke-72 terjadi fase stasioner, dimana pada akhir fase tersebut kadar protein dan aktivitas enzim yang dihasilkan merupakan yang paling tinggi jika dibandingkan dengan waktu fermentasi lainnya. Pada jam ke-84 sampai jam ke-120 terjadi fase kematian yang ditandai dengan menurunnya jumlah bakteri akibat dari berkurangnya jumlah nutrisi dalam media.

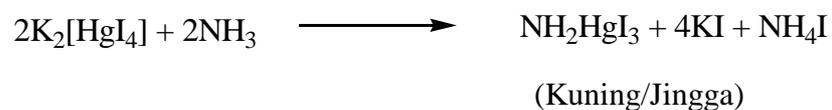


Gambar 5. Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Aktivitas L-asparaginase yang diproduksi oleh bakteri *Klebsiella sp* DA51(3)

Aktivitas L-asparaginase menunjukkan peningkatan seiring dengan lamanya waktu fermentasi dan jumlah bakteri dalam media. Pada jam ke-0 sampai

jam ke-72, jumlah L-asparaginase yang diperlukan untuk mengkatalisis 1 μmol amoniak per menit mengalami peningkatan. Pada jam ke-72 aktivitas enzim yang diperoleh merupakan aktivitas tertinggi, dimana aktivitas enzim yang didapatkan yaitu sebesar 30,3738 U/mL. Pada jam ke-84 sampai jam ke-120, aktivitas enzim mengalami penurunan. Hal tersebut sesuai dengan laju pertumbuhan bakteri. Pengukuran aktivitas L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan reagen Nessler dengan amonium klorida (NH_4Cl) sebagai larutan standar (Lampiran 7). Berdasarkan Gambar 5 diketahui bahwa pada jam ke-72 didapatkan aktivitas tertinggi oleh karena itu, waktu produksi yang digunakan untuk tahap produksi enzim yaitu selama 72 jam.

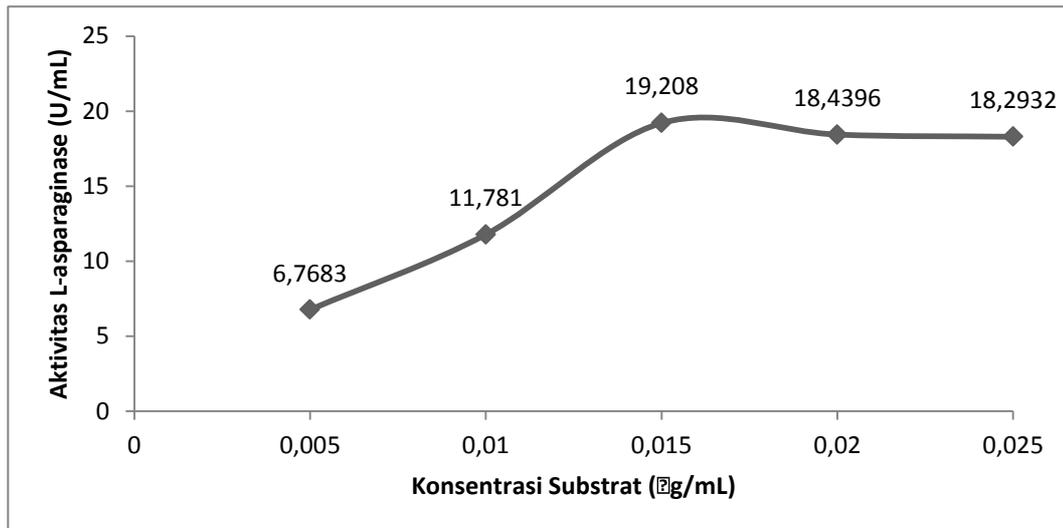
Adapun reaksi antara reagen Nessler dengan amoniak yang terlepas sebagai berikut (Bassett dkk., 2002):



Sehingga reaksi ini dapat digunakan untuk mendeteksi amoniak yang terlepas sebagai hasil samping dari reaksi hidrolisis substrat L-asparagin.

4.5 Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase

Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa pada konsentrasi substrat L-asparagin 0,005 $\mu\text{g/mL}$ hingga 0,015 $\mu\text{g/mL}$ terjadi peningkatan aktivitas L-asparaginase dalam menghidrolisis substrat L-asparagin yaitu dari 6,768 U/mL menjadi 19,208 U/mL. Sedangkan pada konsentrasi substrat 0,02 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,025 $\mu\text{g/mL}$ terjadi penurunan aktivitas L-asparaginase, yaitu dari 18,439 U/mL menjadi 18,293 U/mL.

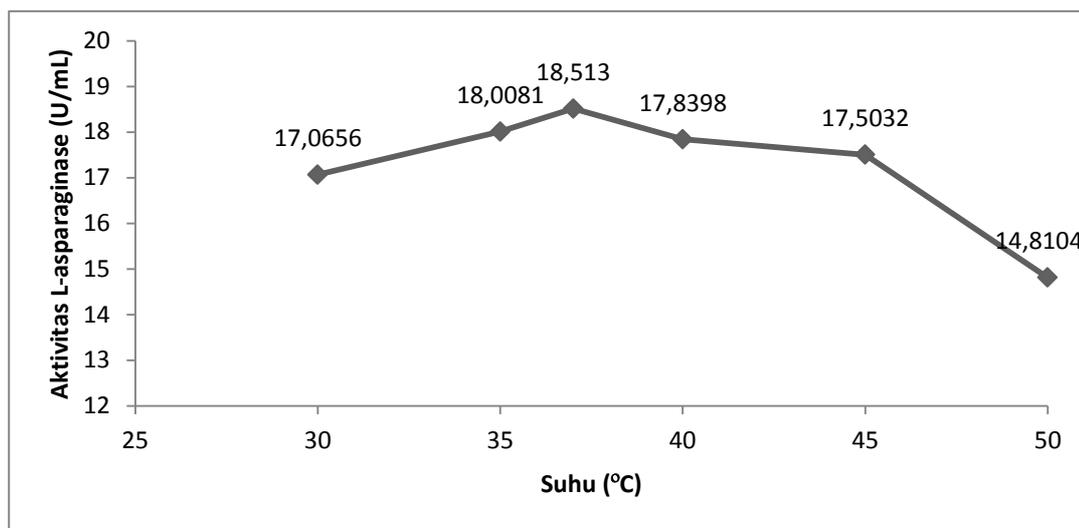


Gambar 8. Grafik Aktivitas L-asparaginase pada Penentuan Konsentrasi Substrat L-asparagin Optimum

Hal ini disebabkan pada batas konsentrasi substrat tertentu, semua bagian aktif enzim telah jenuh dengan substrat. Oleh karena itu, walaupun konsentrasi substrat semakin diperbesar tidak menyebabkan bertambah besarnya aktivitas yang dihasilkan. Berdasarkan dari Gambar 8, dapat diketahui bahwa konsentrasi substrat L-asparagin optimum yaitu 0,015 µg/mL sehingga konsentrasi L-asparagin dengan nilai tersebut digunakan dalam produksi enzim berikutnya.

4.6 Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase

Karakterisasi suhu inkubasi terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan variasi suhu yaitu 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, dan 50 °C selama 30 menit inkubasi.

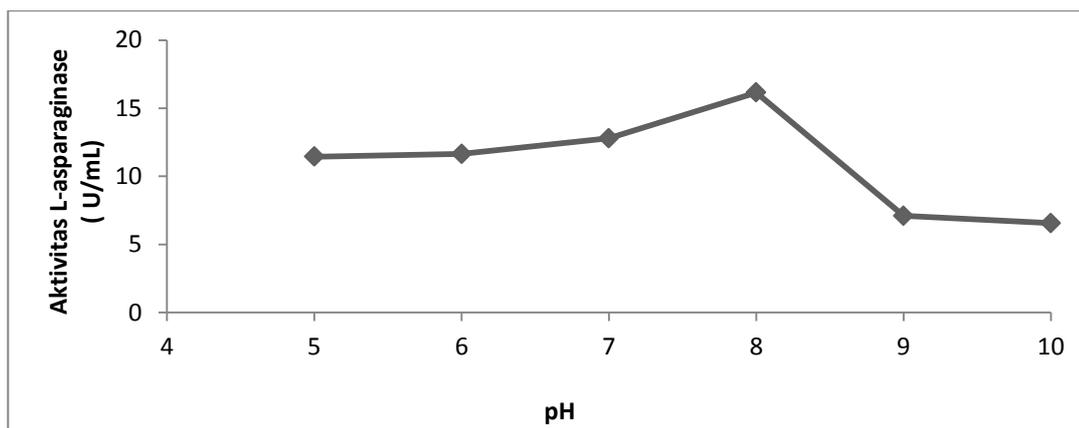


Gambar 9. Grafik Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase pada [S] yaitu 0,015 $\mu\text{g/mL}$

Berdasarkan grafik pada Gambar 9 dapat diketahui bahwa suhu inkubasi optimum ekstrak kasar L-asparaginase yaitu pada suhu 37 °C dengan menghasilkan aktivitas tertinggi sebesar 18,513 U/mL. Hal ini disebabkan pada suhu rendah reaksi kimia berlangsung lambat, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi reaksi enzimatik berlangsung lebih cepat hingga tercapai kondisi optimum. Kenaikan suhu suatu protein atau enzim dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi, jika terjadi proses denaturasi, maka bagian aktif enzim menjadi terganggu dan dengan demikian konsentrasi efektif enzim menjadi berkurang dan kecepatan reaksinya pun akan mengalami penurunan.

4.7 Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase

Karakterisasi pH terhadap aktivitas ekstrak kasar enzim L-asparaginase dilakukan dengan menggunakan variasi pH yaitu 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 selama 30 menit waktu inkubasi pada suhu optimum.



Gambar 10. Grafik Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase pada Kondisi Suhu 37 °C dan [S] yaitu 0,015 µg/mL,

Berdasarkan grafik pada Gambar 10 dapat diketahui bahwa pH optimum ekstrak kasar enzim L-asparaginase yaitu pada pH 8 dengan menghasilkan aktivitas tertinggi sebesar 16,156 U/mL. Hal ini disebabkan struktur ion enzim tergantung pada pH lingkungannya. Suatu enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*), sehingga perubahan pH lingkungan akan memberikan pengaruh terhadap efektifitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Selain itu, pH rendah atau pH tinggi dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi sehingga mengakibatkan turunnya aktivitas enzim.

4.8 Aktivitas dan Kadar Protein L-asparaginase Hasil Fraksinasi dan Dialisis

Ekstrak kasar L-asparaginase difraksinasi menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan : 0-20 % (F1), 20-40 % (F2), 40-60 % (F3), 60-80 % (F4), 80-100 % (F5). Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan perbedaan kelarutannya di dalam air. Penambahan garam amonium sulfat pada konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi pada setiap tingkat fraksi, menyebabkan

jenis protein yang mengendap pada tiap fraksi berbeda. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa setiap jenis protein memiliki kelarutan yang berbeda dalam air sehingga penambahan garam dengan kejenuhan tertentu dapat menyebabkan terjadinya pengendapan protein tertentu dengan tidak mengendapkan protein yang lainnya (Poedjiadi, 1994).

Endapan protein dari masing-masing fraksi F1, F2, F3, F4 dan F5 yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan buffer B yang volumenya sama tiap fraksi, kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan. Selofan yang telah diisi fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan buffer C lalu diaduk dengan pengaduk magnetik stirer untuk mempercepat proses pemurnian protein. Dialisis bertujuan untuk menghilangkan senyawa kecil dan kelebihan garam amonium sulfat yang turut mengendap bersama dengan protein. Proses dialisis terjadi berdasarkan prinsip osmosis dan dilakukan pada suhu rendah agar protein tidak rusak dan tetap dalam keadaan stabil (Lehninger, 1993).

Adapun aktivitas L-asparaginase yang diperoleh dari ekstrak kasar dan masing-masing fraksi dan kadar protein serta aktivitas spesifiknya terdapat dalam Tabel 11:

Tabel 11. Data Pengukuran Aktivitas L-asparaginase masing-masing Fraksi dan Ekstrak Kasar pada [S] yaitu 0,015 $\mu\text{g/mL}$; suhu 37 $^{\circ}\text{C}$; dan pH 7

Ekstrak Kasar dan Fraksi	Aktivitas Enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
EK	22,417	0,085	263,735
F1	14,406	0,067	215,021
F2	16,089	0,025	643,576
F3	9,896	0,014	706,857
F4	16,224	0,020	811,205
F5	12,791	0,016	799,425

Berdasarkan Tabel 11 terlihat bahwa aktivitas yang diperoleh dari masing-masing fraksi dan ekstrak kasar berbeda-beda. Aktivitas spesifik L-asparaginase tertinggi dari masing-masing fraksi dan ekstrak kasar didapatkan F3 sebesar 643,576 U/mg.

Aktivitas spesifik L-asparaginase didapatkan dengan membandingkan aktivitas yang di dapatkan terhadap kadar proteinnya. Berdasarkan Tabel 11, fraksi 60-80 % (F3) memiliki aktivitas spesifik tertinggi, hal ini dikarenakan perbedaan tingkat kelarutan protein dalam air sehingga protein yang mengendap juga berbeda. Protein yang memiliki tingkat kelarutan lebih rendah akan lebih dahulu mengendap jika dibandingkan dengan protein yang memiliki tingkat kelarutan lebih tinggi di dalam air. Kadar protein tertinggi yang didapatkan yaitu terdapat pada ekstrak kasar sebesar 0,85 mg/mL.

4.9 Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kasar dan Fraksi

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak kasar dan fraksi dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Metode ini merupakan metode yang relatif mudah, biaya murah dan sangat cocok untuk bakteri dengan pertumbuhan cepat. Bakteri yang digunakan terdiri dari bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* dan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*. Pada pengujian daya hambat digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol yang berfungsi sebagai pembanding aktivitas antimikroba dari sampel. Kloramfenikol mengandung senyawa antimikroba berspektrum luas yang dapat digunakan untuk bakteri gram positif dan negatif. Oleh karenanya sangat ideal penggunaannya sebagai kontrol positif (Brooks dkk., 2005). Sedangkan kontrol negatif digunakan BSA, yaitu suatu protein murni yang

diketahui tidak memiliki aktivitas antimikroba sehingga dapat digunakan untuk mengetahui apakah respon penghambatan benar-benar berasal dari sampel bukan disebabkan oleh faktor teknis perlakuan

Ekstrak kasar dan hasil fraksinasi (F1-F5) selanjutnya diuji aktivitas antimikrobanya. Aktivitas antimikroba tiap fraksi protein ditandai dengan adanya zona bening disekitar *paper disc*. Hasil pengukuran diameter paper disc dan zona hambatan dari ekstrak kasar dan hasil fraksinasi L-asparaginase DA51(3) dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Data Pengukuran Zona Hambatan Ekstrak kasar L-asparaginase dan hasil Fraksinasi (F1-F5)

Fraksi	Diameter Hambat Bakteri Uji	
	<i>E. coli</i> (48jam)	<i>S. aureus</i> (48 jam)
EK	-	1,45 mm
F1	-	-
F2	-	2,9 mm
F3	-	5,6 mm
F4	-	0,6 mm
F5	-	-
Kontrol +	26,9 mm	12,1 mm
kontrol -	-	-

Berdasarkan data yang diperoleh dari Tabel 12 bahwa F3 (fraksi 60-80%) memiliki aktivitas antimikroba terbesar terhadap bakteri *S. aureus* dengan zona hambatan sebesar 5,6 mm. Sedangkan Aktivitas antimikroba terhadap bakteri *S. aureus* yang terdapat pada F1 (fraksi 0-20%) dan F5 (fraksi 80-100%) tidak dapat diukur karena terkontaminasi. Aktivitas antimikroba pada ekstrak kasar dan hasil fraksinasi terhadap *E. coli* juga tidak dapat diukur. Hal ini disebabkan karena adanya kontaminasi atau bakteri uji telah resisten terhadap sifat bakteriostatik enzim L-asparaginase.

Menurut Wattimena (1991), suatu antimikroba dikatakan bakteriostatik jika antimikroba tersebut mampu untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji dan tidak mematikan kuman hingga dalam waktu 48 jam daerah hambatan kembali ditumbuhi bakteri. Kriteria antimikroba menurut David dan Stout dalam Rokhman (2007) adalah ≤ 5 mm (lemah), 5-10 mm (sedang), 10-20 (kuat), dan ≥ 20 (sangat kuat).

Fraksi-fraksi protein memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri, bahkan ada fraksi yang tidak memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan oleh resistensi bakteri terhadap substansi bioaktif, kadar substansi aktif, serta jumlah inokulum bakteri atau kepadatan bakteri uji (Putri, 2015). Selain itu, hal ini mungkin terjadi karena difusi bahan aktif pada medium yang berlangsung lambat dan rendahnya konsentrasi kandungan zat aktif, sehingga fraksi tersebut tidak dapat menghambat bakteri secara optimal (Cappucino dan Sherman, 1992).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan :

1. Isolat yang menghasilkan L-asparaginase berasal dari isolat bakteri simbion spons yang merupakan salah satu jenis bakteri Gram negatif yaitu jenis *Klebsiella sp.*
2. Waktu produksi optimum L-asparaginase yaitu pada jam ke-72, dimana pada jam tersebut dihasilkan aktivitas sebesar 30,374 U/mL.
3. L-asparaginase menghasilkan aktivitas tertinggi pada konsentrasi substrat L-asparagin 0,015 μ g/mL sebesar 19,208 U/mL; pada suhu inkubasi 37 °C sebesar 18,513 U/mL; dan pada pH 8 sebesar 16,157 U/mL.
4. Aktivitas antimikroba terbesar dari L-asparaginase setelah waktu inkubasi 48 jam terdapat pada fraksi 40-60 % terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 5,6 mm (kategori sedang).

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan identifikasi isolat bakteri berbagai simbion spons sehingga dapat diketahui jenis-jenis bakteri lain yang dapat menghasilkan L-asparaginase dan berpotensi sebagai antimikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A.T., dan Yuhana, M., 2011, Skrinning Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis sp.* sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba, *Ilmu Kelautan*, **16** (1), 35-40.
- Alcamo, I.E., 1995, *Biology: Cliffs Quick Review*, Cliffs Notes Inc., USA.
- Amena, S., Vishalkshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., Lingappa, K., 2010, Production, Purification, and Characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*, *Microbiol*, **41**, 173-178.
- Amir, I., dan Budiyanto, A., 1996, Mengenal Spons Laut (*Demospongiae*) Secara Umum, *Oseana*, **21** (2), 15-31.
- Antara, N.S., 2009, *Mengurangi Pembentukan Akrilamida dengan Menggunakan Enzim dan Mikroba pada Produk Pangan*, FTP, UNUD.
- Asro, M., Yusnaini., dan Halili., 2013, Pertumbuhan Spons (*Stylotella aurantium*) yang Ditransplantasikan pada Berbagai Kedalaman, *Jurnal Mina Laut Indonesia*, 1(1), 133-144.
- Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M., dan Ruby, S., 2009, Production of extracellular anti-leukemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and characterization, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (4), 353-360.
- Bintang, M., 2010, *Biokimia Teknik Penelitian*, Erlangga, Jakarta.
- Borkotaky, B., dan Bezbaruah, R.L., 2002, Production and Properties of Asparaginase from A New *Erwinia sp.*, *Microbiologica*, **47** (5), 473-476.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Stephen, A.M., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta.
- Cappelletti, D., Chiarelli, L.R., Paschetto, M.V., Stivala, S., Valentini, G., and Scotti, C., 2008, *Helicobacter pylori* L-asparaginase: A Promising Chemotherapeutic agent. *Biochem. Biophys*, 377, 1222-1226.
- Cappuccino, J.G dan Sherman, N., 1992, *Microbiology a Laboratory Manual, Rockland Community Collage*, Suffern, New York.
- Didik, A.H., 2007, *Isolasi Dan Karakterisasi Enzim L-Asparaginase Dari Rimpang Temulawak (Curcuma xanthorrhiza roxb.) Dalam Sediaan Utuh Dan Serbuk*, Skripsi, Jurusan Kimia, Universitas Diponegoro.

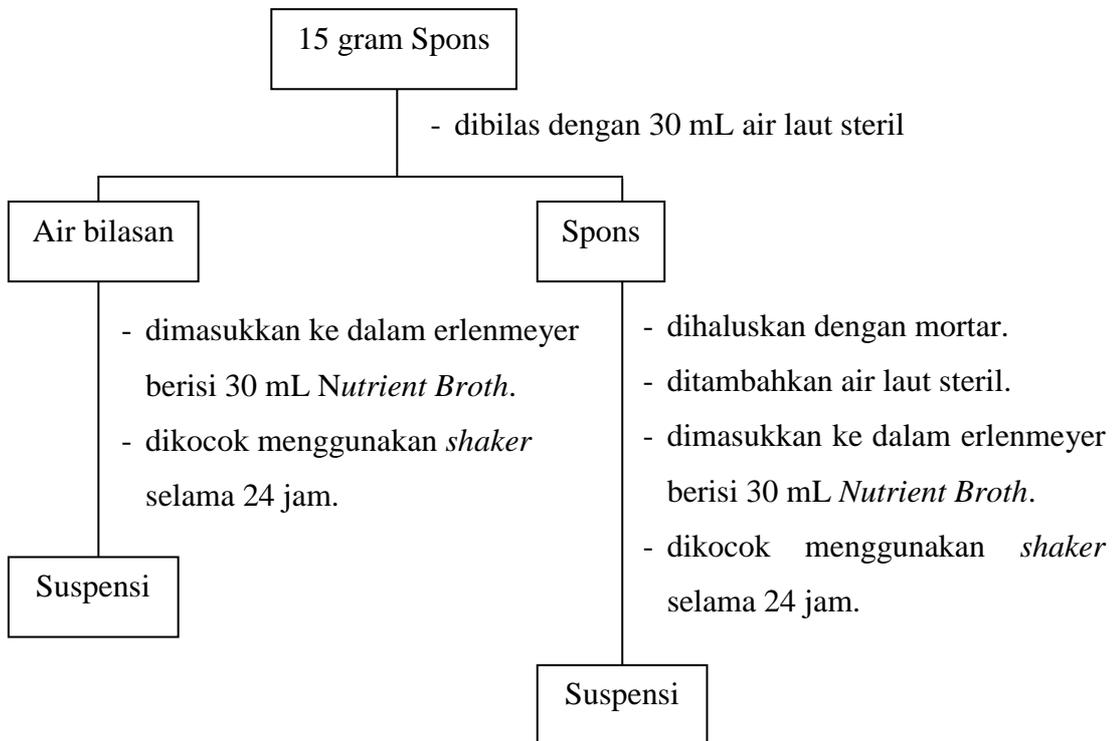
- Dwidjoseputro., 1998, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Penerbit Djambatan, Jakarta.
- El-Bessoumy A.A., Sarhan, m., dan Mansour, J., 2004, Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 Using Solid-State Fermentation, *J. Biochem. Mol. Biol*, **37** (4), 387-393.
- Gladilina, Y., Sokolov, N., and Krasotkina, 2009, Cloning, Expression, and Purification of *Helicobacter Pylori* L-asparaginase, *J. Microbiol*, **3**, 89-91.
- Irianto, K., 2006, *Mikrobiologi: Mengungkap Dunia Mikroorganisme* Jilid 2, CV. Yrama Pers, Jakarta.
- Ismet, M.S., Soedharma, D., dan Effendi, H., 2011, Morfologi dan Biomassa Sel Spons *Aaptos aaptos* dan *Petrosia sp.*, *Jurnal Ilmu dan Teknologi Tropis*, **3** (2), 153-161.
- Jawetz, E., Melnik G.E., dan Adelberg, C.A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh dr. Nani Widorini, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Josodiwondo, S., 1993, *Mikrobiologi Kedokteran*, Binarupa Aksara, Jakarta.
- Karsinah., Lucky, H.M., Suharto., dan Mardiasuti., 1994, *Bakteri Batang Gram Negatif*, Binarupa Aksara, Jakarta.
- Kumar, K., Kaur, J., Walia, S., Pathak, T., dan Aggrawal, D., 2014, L-Asparaginase: An Effective Agent In The Treatment Of Acute Lymphoblastic Leukemia, *Pubmed*, **55** (2), 256-262.
- Lee, Y.K., Lee, J.H., Lee ,H.K., 2001, Microbial Symbiosis in Marine Sponges, *J. Microbiol*, **39**, 254-264.
- Li, L., Xie, T., Li, H., Qing, C., Zhang, G., and Sun, M., 2007, Enhancing the Thermostability of *Escherichia coli* L-asparaginase II by substitution with Pro in predicted hydrogen-bonded turn structures, *Enzyme Microb. Technol*, **41**, 523-527.
- Limbu, E.N., 2013, *Isolasi dan Uji Aktivitas Enzim Amilase pada Mikroba Termofilik dari Sumber Air Panas Makula Tana Toraja Sulawesi Selatan*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam , Universitas Hasanuddin.
- Lisdayanti, E., 2013, *Potensi Antibakteri dari Bakteri Asosiasi Lamun (Seagrass) dari Pulau Bonebatang Perairan Kota Makassar*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin Makassar.
- Manna, S., Sinha, A., Sadhukhan, R., dan Chakrabaty, S.L., 1995, Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-Asparaginase Isolated from *Pseudomonas Stutzeri* MB-405, *Microbiol*, **30**, 291-298.

- Murniasih, T., 2003, Metabolit Sekunder dari Spons sebagai Bahan Obat-Obatan, *Oseana*, 27 (3), 27-33.
- Murniasih, T., dan Rasyid, A., 2010, Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Barrang Lompo (Makassar) sebagai Sumber Bahan Antibakteri, *Oceanologi dan Limnologi Indonesia*, 36 (3), 281-292.
- Narshina, L.T., dan Anil, A.C, 2000, Antibacterial Activity of the Sponge *Ircinia ramosa*: Importance of its surface-associated Bacteria, *J. Chem. Ecol*, 26 (1):57-71.
- Nathiya, K., Nath, S.S., Angayarkanni, J., dan Palaniswamy, M., 2011, Screening of A High Glutaminolytic Enzym Producing Strain and Its Extracellular Production by Solid State Fermentation, *Int. J. Pharma Bio. Sci*, 2 (3), 297-302.
- Natsir, H., 2010, *Kajian Enzim Kitinase Termotabil dari Bakteri Termofil Produksi, Pemurnian, Karakterisasi dan Aplikasinya Dalam Hidrolisis Kitin*, Disertasi, Program Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T dan Ahmad, A., 2010, Production and Characterization of Chitinase Enzyme from Sulili Hot Spring in South Sulawesi, *Bacillus sp.* HSA3-1a, *Indo J. Chem*, 10 (2), 263-267.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T dan Ahmad, A., 2013, Isolation and Purification of Thermostable Chitinase *Bacillus Licheniformis* Strain HSA3-1a From Sulli Hot Spring in South Sulawesi, Indonesia, *Int. J. Pharma Bio. Sci*, 4 (3), 1252-1259.
- Nofiani, R., Kadarisno., Daryati., dan Sapar, A., 2009, Karakteristik Ekstrak Bakteri Berasosiasi dengan *Eucheuma cottonii* Doty yang Memiliki Aktivitas Antimikroba, *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 12 (2), 144-153.
- Page, D., 1989, *Prinsip-Prinsip Biokimia*, Erlangga, Jakarta.
- Pastra, D.A., Melki., dan Surbakti, H., 2012, penapisan Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons Jenis *Aplysina sp.* sebagai Penghasil Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung, *Maspari Journal*, 4 (1), 77-82.
- Patro, K.R dan Gupta, N., 2012, Extraction, Purification and Characterization of L-asparaginase from *Penicillium sp.* by submerged fermentation, *Int. J. Biol, Mol*, 3 (3), 30-34.
- Patta, A.M., Ahmad, A., dan Natsir, H., 2013, *Produksi, Pemurnian Parsial dan Karakterisasi L-Asparaginase dari Bakteri Termofilik Bacillus Licheniformis strain HSA3-1a*, Tesis tidak diterbitkan, Magister Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.

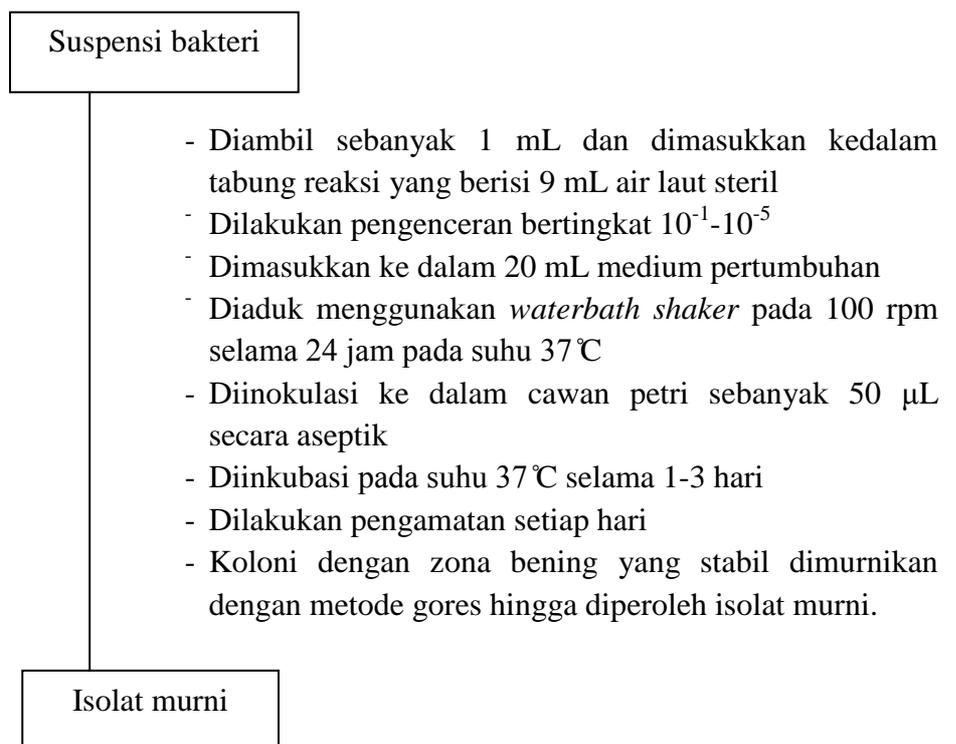
- Pedpradab, P., Molex, W., Nukoolkarn, V., dan Darumas, U., 2010, Biological Activities of Extracts from Andaman Sea Sponges, Thailand, *EurAsian Journal of BioSciences*, **4** (8), 63-69.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S., 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, UI-Press, Jakarta.
- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, T., 2005, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Putri, N.P., 2015, *Isolasi dan Karakterisasi L-glutaminase dari Bakteri Symbion Spons dan Aplikasinya Sebagai Antimikroba*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Rachmaniar, R., 2003, Antikanker *Swinholide A* Dari Spons *Theonella swinhoei*, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, **2** (4), 121-124.
- Rani, C., dan Haris, A., 2004, Metode Transplantasi Spons Laut *Aaptos aaptos* dengan Teknik Fragmentasi di Terumbu Karang Pulau Barranglompo, *Torani*, **15** (2): 106-114.
- Rheinheimer, G. 1991, *Aquatic Microbiology 4th Edition*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Rizka, A., 2013, *Skrining Bakteri Symbion Spons Asal Perairan Pulau Polewali dan Pulau Sarappolompo sebagai Penghasil Antibakteri terhadap Bakteri Patogen pada Manusia dan Ikan*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin Makassar.
- Sartika, 2014, *Potensi Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Alga Coklat Sargassum sp. Sebagai Antimikroba*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin Makassar.
- Savitri., Asthana, N., and Azmi, W., 2003, Microbial L-asparaginase: A Potent Antitumor Enzyme, *Ind. J. Biotech*, **2**, 184-194.
- Selvani, K., dan Vishupriya., 2013, Partial Purification and Cytotoxic Activity of L-asparaginase from *Streptomyces Acrimycini* NGP, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **4** (3), 859-869.
- Sinha, R., Singh, H.R., dan Jha, S.K., 2013, Microbial L-Asparaginase: Present and Future Prospective, *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, **2** (11), 7031-7051.

- Sivasankar, P., Sugesh, S., Vijayanand, P., Sivakumar, K., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., and Mayavu, P., 2013, Efficient production of L-asparaginase by marine *Streptomyces sp.* isolated from Bay of Bengal, India, *African Journal of Microbiologi Research*, **7** (31), 4015-4021.
- Suriani., Usman, H., dan Ahyar, A., 2012, Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Spons *Callyspongia sp*, *Marina Chimica Acta*, **12** (1), 2-7.
- Suwandi, U., 1992, *Mekanisme Kerja Antibiotik*, Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe farma, Jakarta Pusat.
- Tinambunan, H., Melki., dan Isnaini., 2012, Efektifitas Ekstrak Bakteri yang Berasosiasi Dengan Spons dan Karang Lunak sebagai Antibakteri dari Perairan Pulau Tegal Lampung, *Maspari Journal*, **4** (2), 225-230.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., dan Case, C.L., 2001, *Microbiology: An Introduction* 7th Edition, Addison Wesley Longman, Inc, California.
- Tosa, T., Sano, K., Yamamoto, K., Nakamura, M., and Chibata, I., 1972, L-Asparaginase from *Proteus Vulgaris*. Purification, Crystallization, and Enzymic Properties, *Biochemistry*, **11**, 217-222.
- Wattimena., 1991, *Farmakodinamik dan Terapi antibiotik*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- 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.
- Zhang, Y.Q., Tao, M.L., Shen, W.D., Zhou, Y.Z., Ding, Y., Ma, Y., and Zhou, W.L., Immobilization of L-asparagianse on The Microparticles of Natural Silk Sericin Protein and Its Character, *Biomaterial*, **25** (17), 3751-3759.

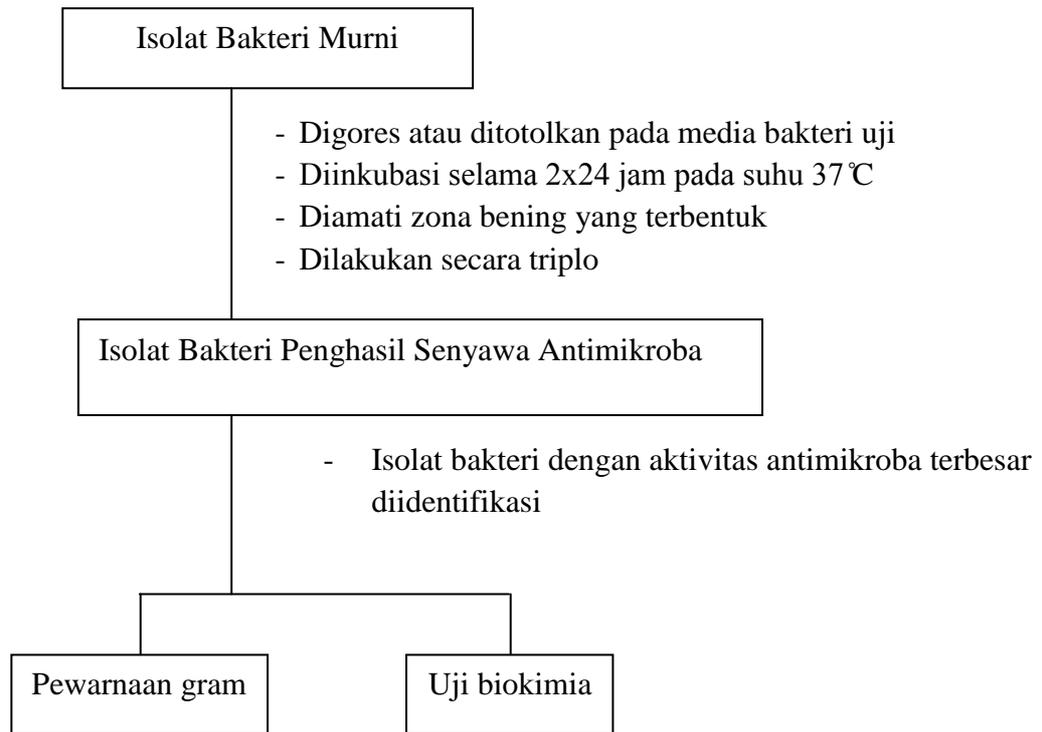
Lampiran 1. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth* (Sartika, 2014)



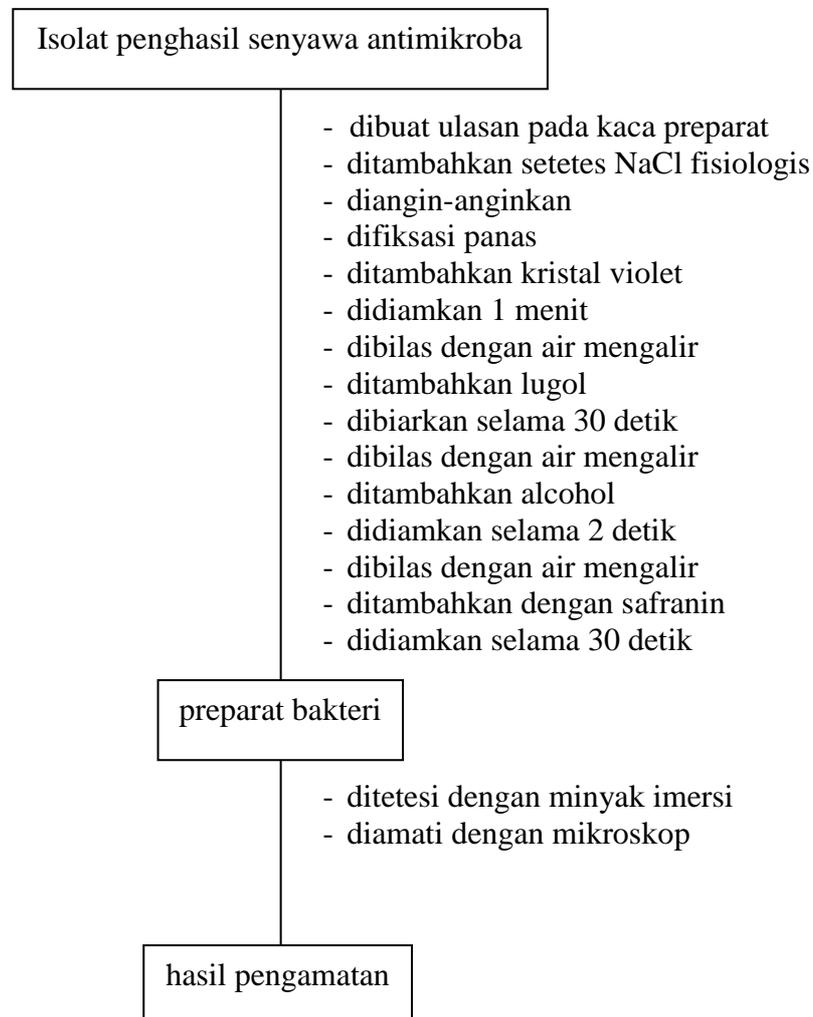
Lampiran 2. Bagan Kerja Isolasi Bakteri dari Spons (Pastra dkk, 2012 dan Yulianti dkk, 2012)



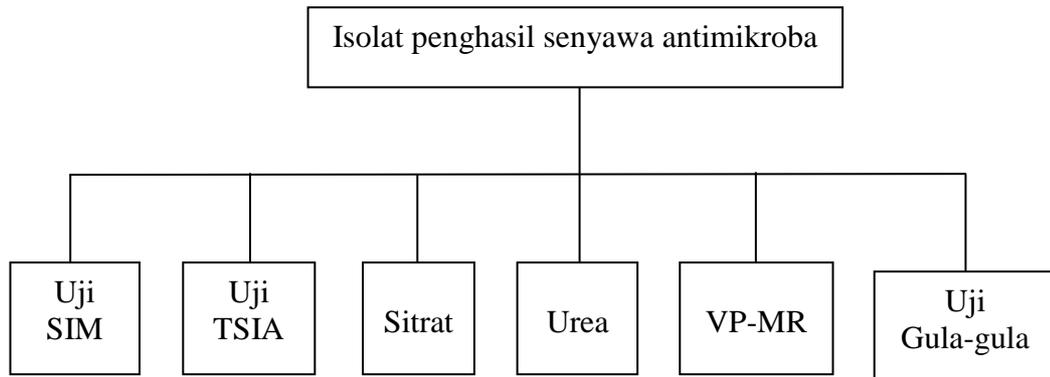
Lampiran 3. Bagan Kerja Identifikasi Isolat Penghasil Senyawa Antimikroba



→ Pewarnaan gram



→ Uji Biokimia



Lampiran 4. Pembuatan Media Inokulum (Yulianti dkk, 2011 dan Natsir dkk, 2010)

3 g/L pepton, 5 g/L L-Asparagin, 1 g/L ekstrak yeast, 6 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L MgSO_4 , 0,5 g/L NaCl, dan 0,02 g/L CaCl_2

- Dilarutkan dalam 100 mL akuades dalam erlenmeyer steril
- Dipanaskan dan disterilkan selama 30 menit dalam autoklaf
- Didinginkan

Medium Inokulum

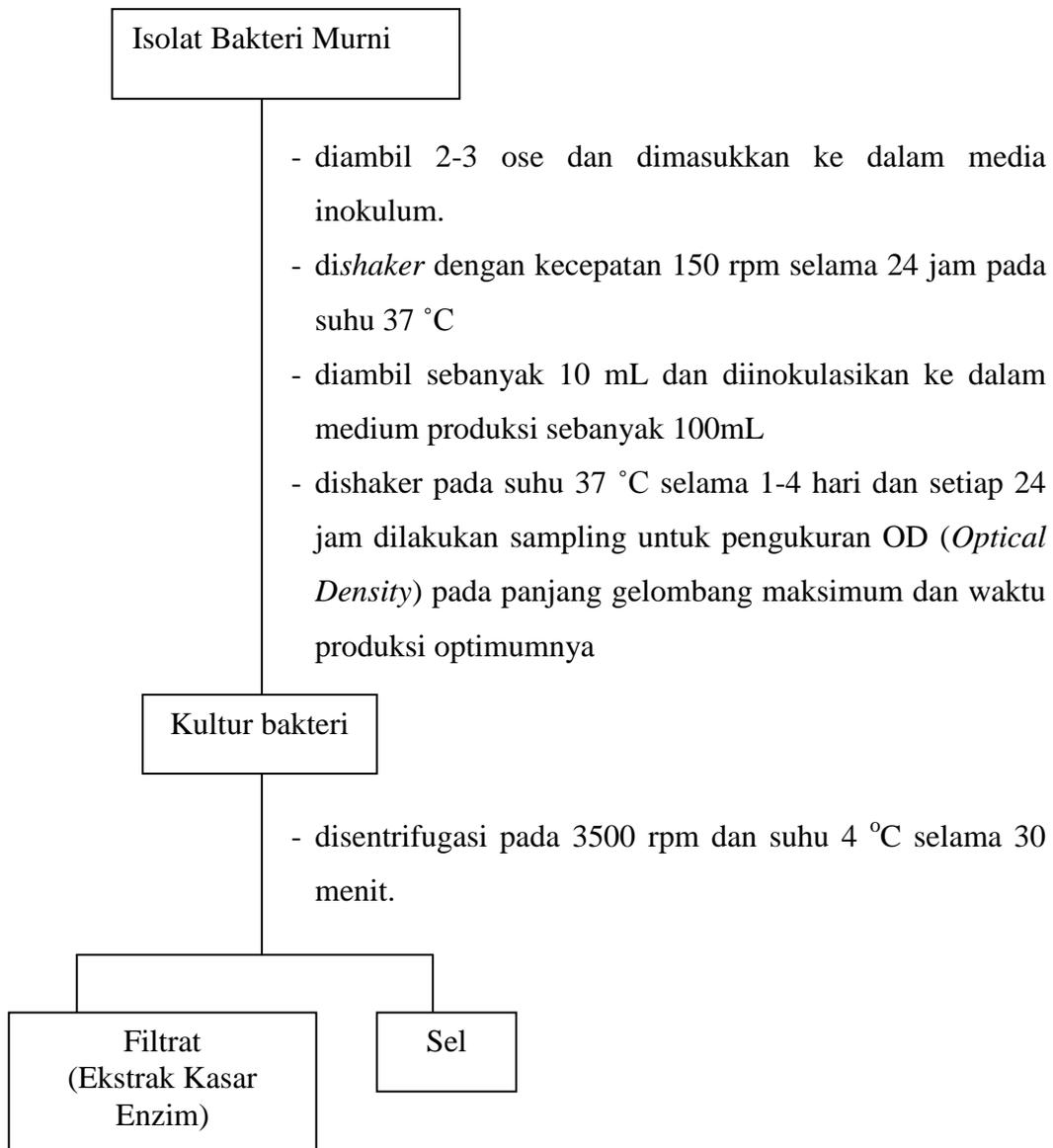
Lampiran 5. Pembuatan Media Produksi (Yulianti dkk, 2011 dan Natsir dkk, 2010)

3 g/L pepton, 5 g/L L-Asparagin, 1 g/L ekstrak yeast, 6 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L MgSO_4 , 0,5 g/L NaCl, dan 0,02 g/L CaCl_2

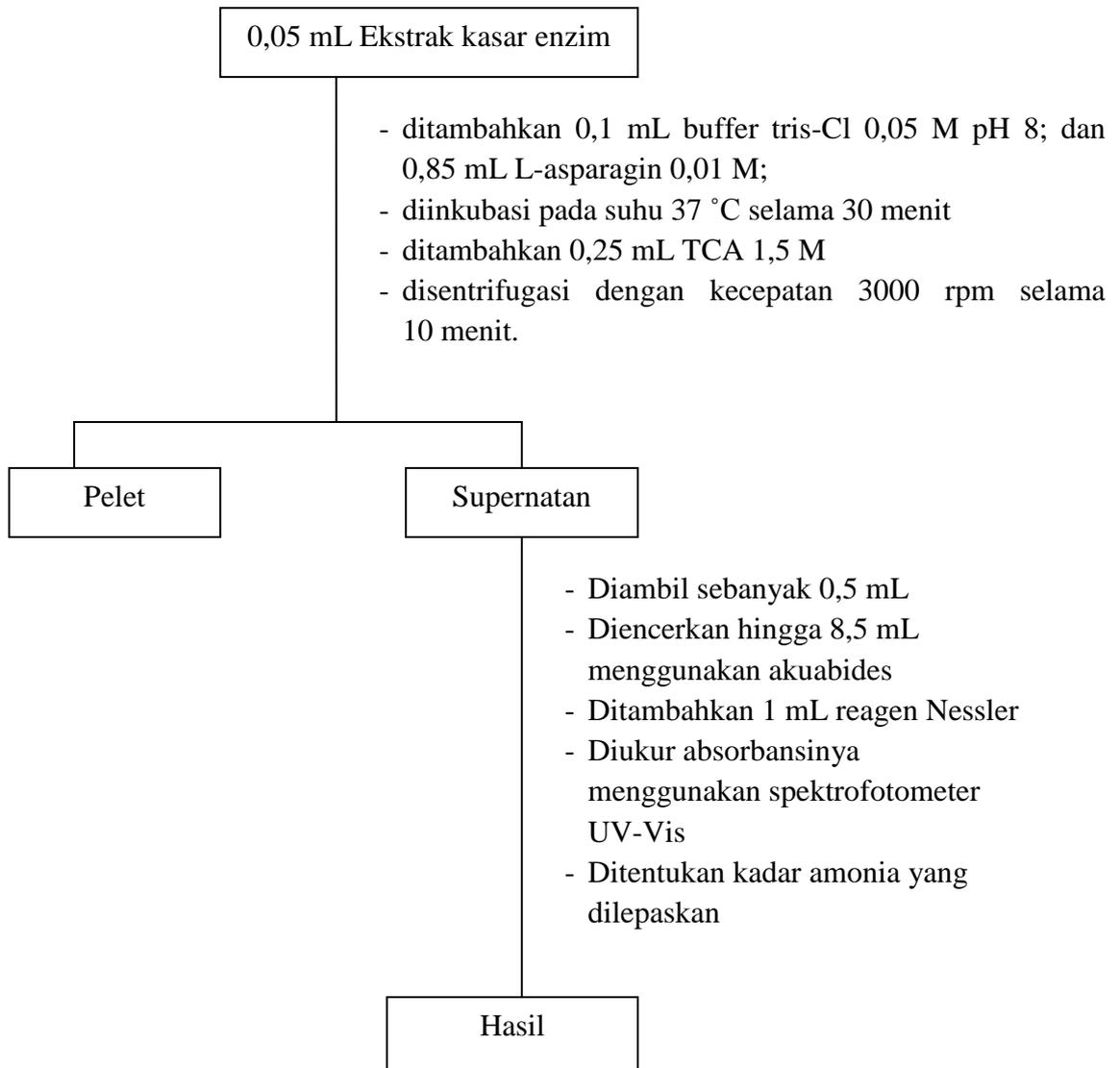
- Dilarutkan dalam 100 mL akuades dalam erlenmeyer steril
- Dipanaskan dan disterilkan selama 30 menit dalam autoklaf
- Didinginkan

Medium Produksi

Lampiran 6. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum dan Produksi L-asparaginase
(Limbu, 2013 dan Sartika, 2014)

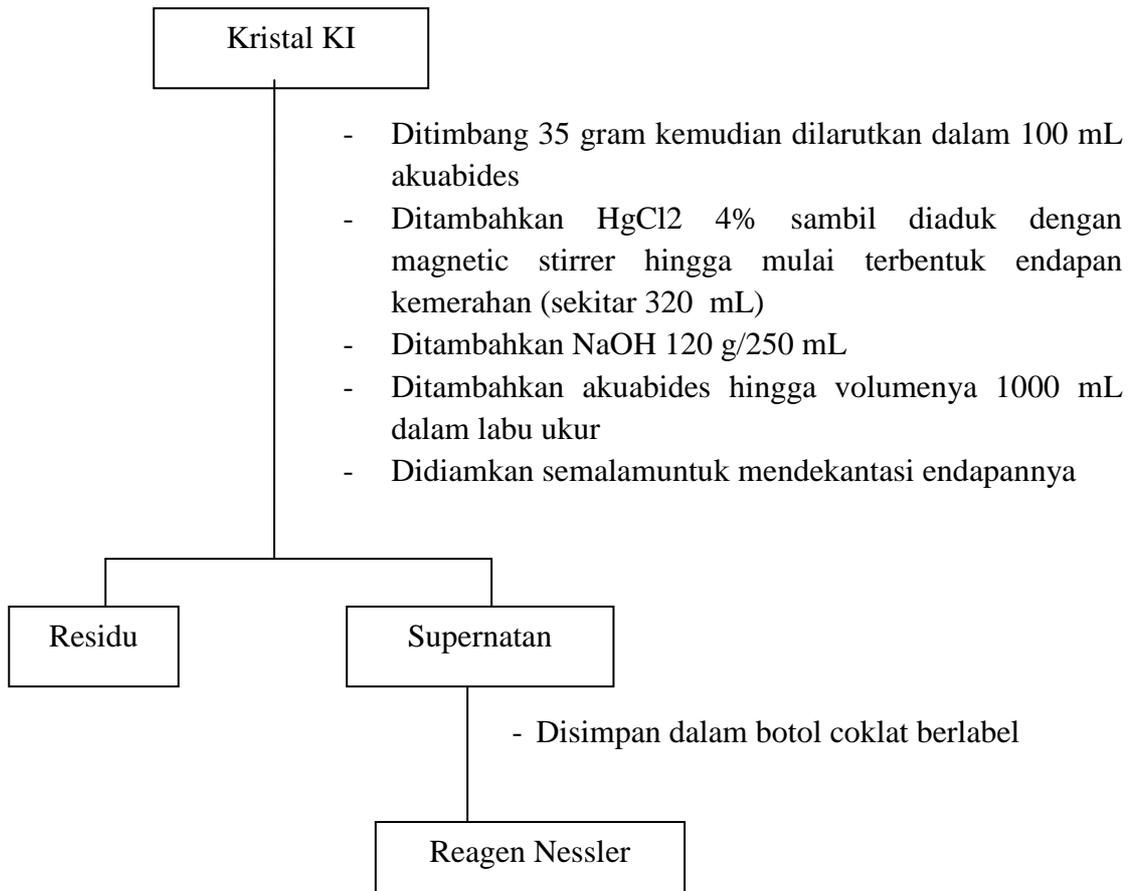


Lampiran 7. Pengukuran Aktivitas L-asparaginase (Patta dkk, 2013; Yulianti dkk, 2012; dan Nathiya dkk, 2011)

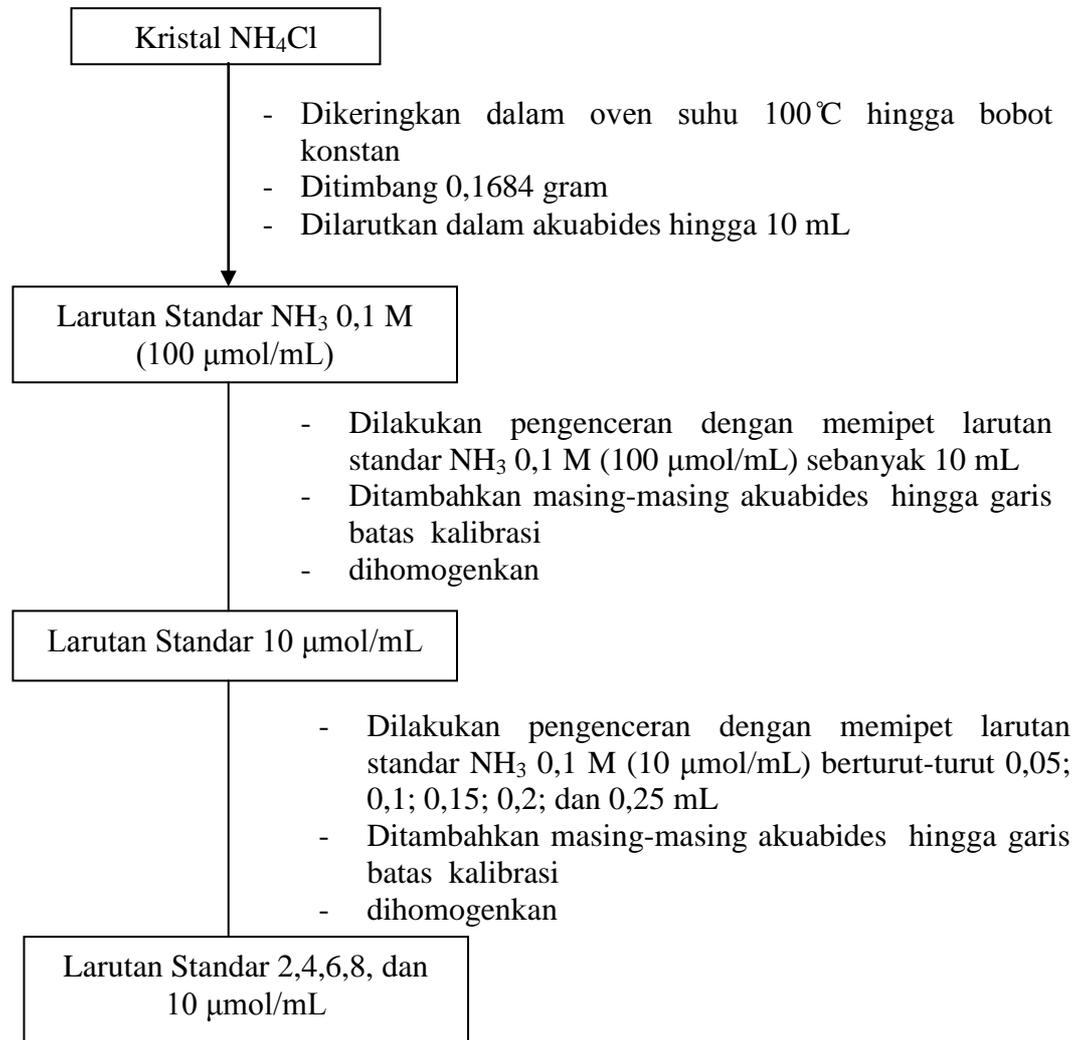


1 unit Aktivitas L-asparaginase = jumlah enzim L-asparaginase yang mengkatalisis pelepasan satu μmol permenit pada kondisi pengujian

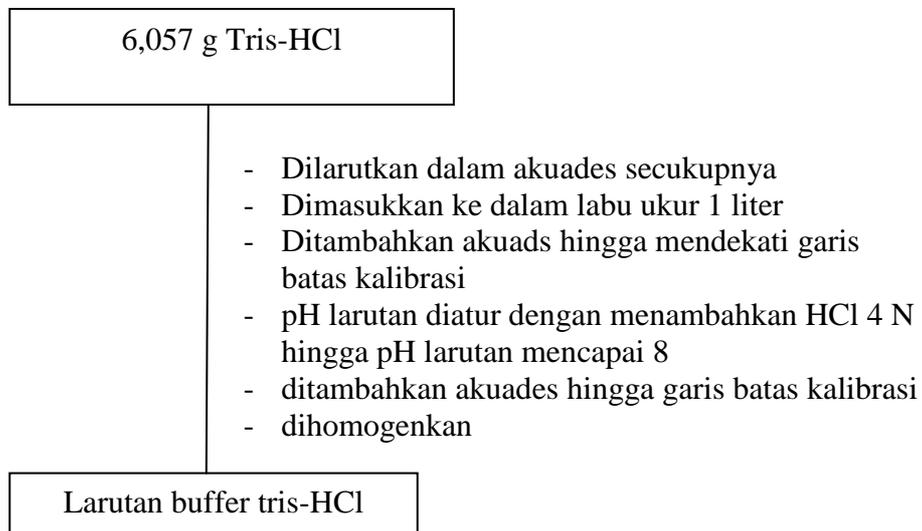
a. Bagan kerja pembuatan Reagen Nessler



b. Bagan Kerja Pembuatan Larutan Standar Amonium Klorida



c. Bagan Kerja Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8



Perhitungan :

Mr tris HCl = 121,14 g/mol

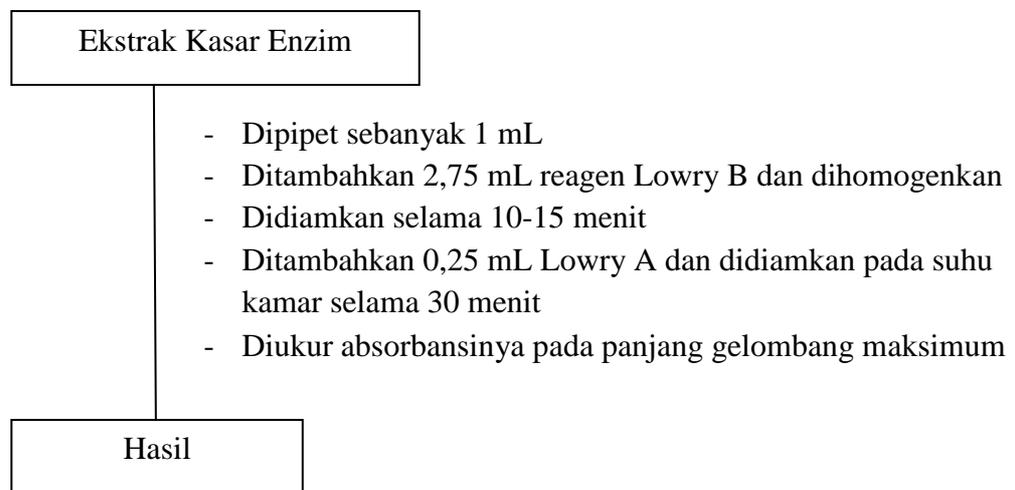
$$g = M \times Mr \times V(\text{liter})$$

$$= 0,05 \times 121,14 \times 1$$

$$= 6,057 \text{ gram}$$

Tris HCl = Tris(hidroksimetil)-aminometan ($\text{NH}_2\text{-C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)

Lampiran 8. Penentuan Kadar Protein (patta dkk, 2013 dan Nathiya dkk, 2011)



Keterangan : Perlakuan yang sama untuk larutan blanko dan larutan standar BSA

Lampiran 9. Penentuan Protein dengan Metode Lowry

Pereaksi:

1. Pereaksi Lowry A

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

2. Pereaksi Lowry B

Pada pembuatan Lowry B yakni dengan pencampuran antara Na_2CO_3 2 % dalam NaOH 0,1 N, Na-K-Tartat 2 %, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 %. Dengan

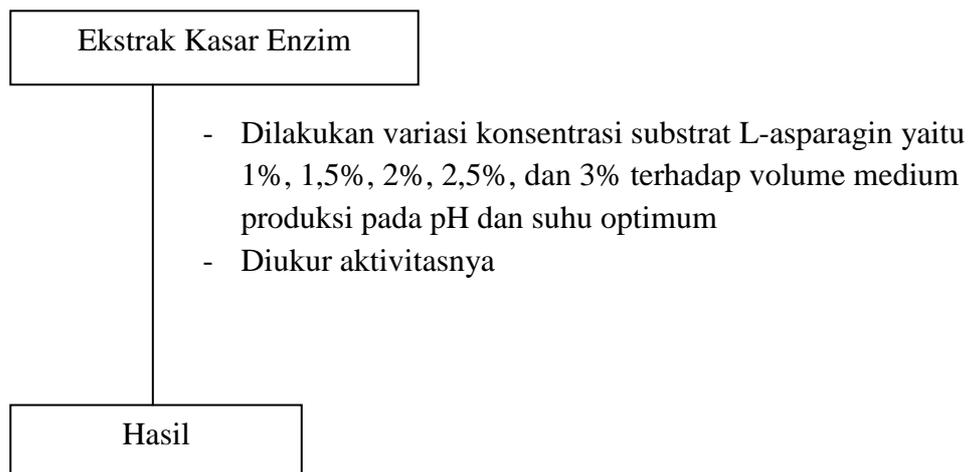
perbandingan 100 : 1 :1, dimana diambil larutan Na₂CO₃ 2 % dalam NaOH 0,1 N sebanyak 100 mL, Na-K-Tartat 2 % sebanyak 1 mL, dan CuSO₄ . 5 H₂O 1 % 1 mL. Kemudian dihomogenkan.

Larutan baku:

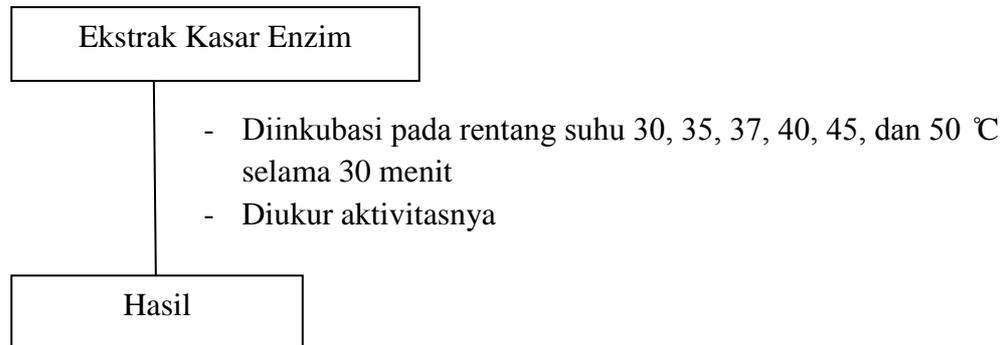
- Ditimbang dengan teliti BSA untuk membuat sediaan 1 mg/mL dan diencerkan dengan variasi konsentrasi: 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 dan 0,12 mg/mL.
- Perlakukan larutan standar tersebut seperti pada larutan contoh.

BSA (mg/mL)	Volume BSA (mL)	Volume Akuades	Volume total mL
0.02	0.04	1.96	2
0.04	0.08	1.92	2
0.06	0.12	1.88	2
0.08	0.16	1.84	2
0.10	0.2	1.8	2

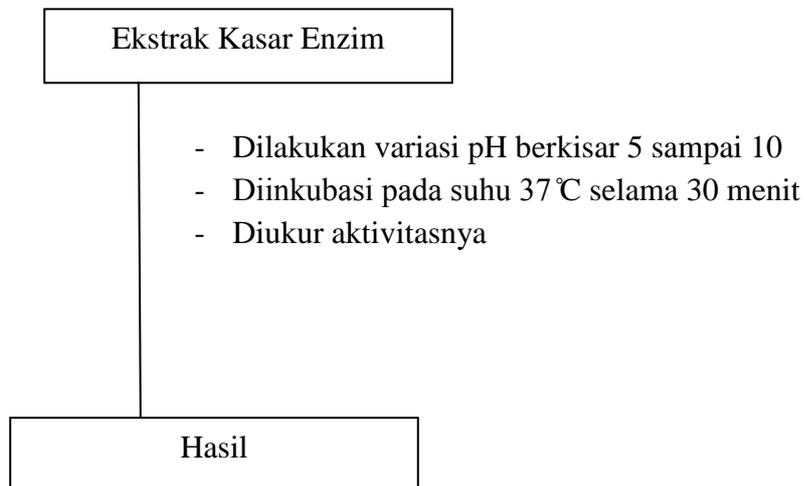
Lampiran 10. Bagan Kerja Pengaruh Konsentrasi Substrat terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase dari Isolat Bakteri *Klebsiella sp.* DA51 (3) (Yulianti dkk, 2012)



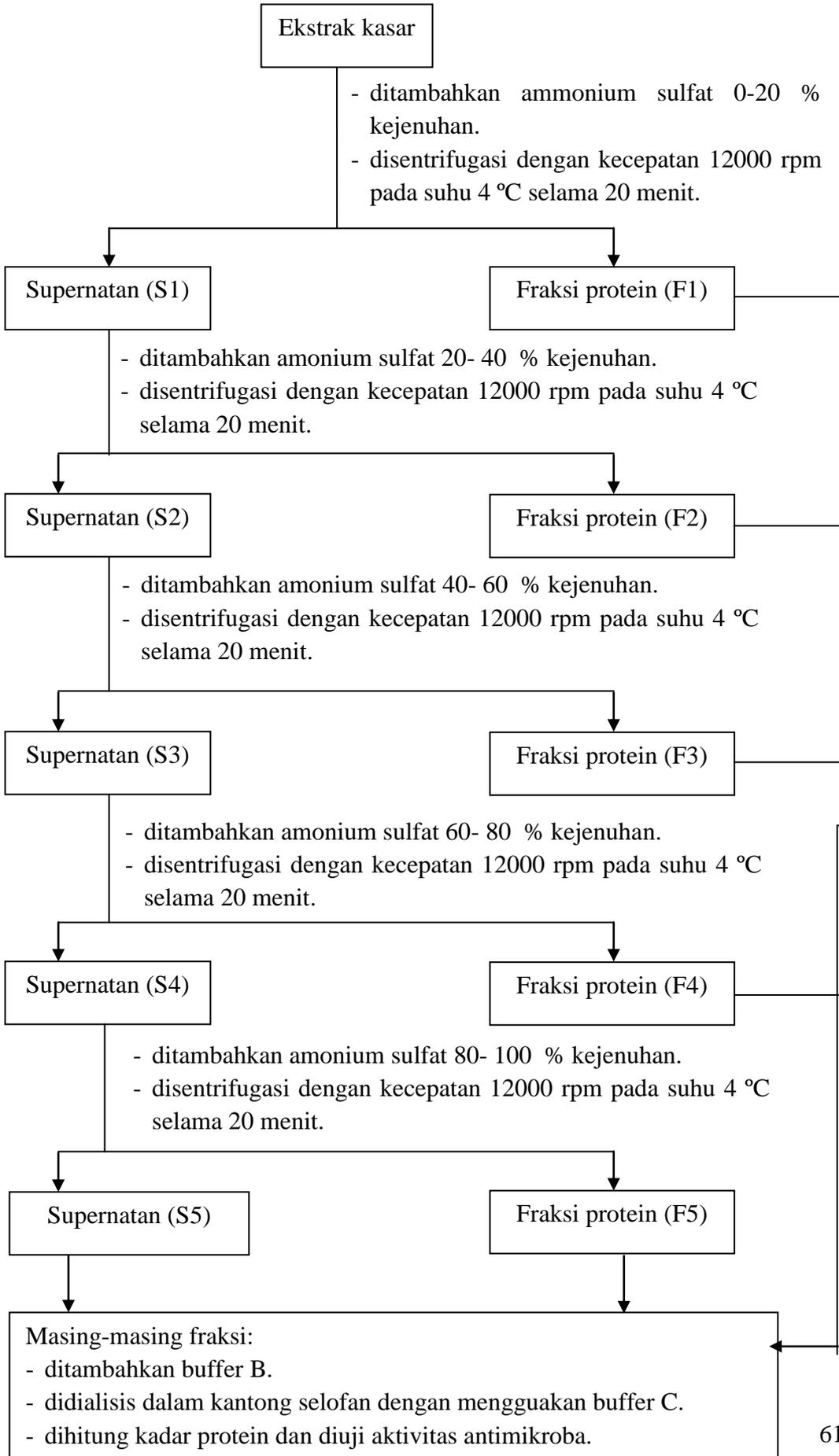
Lampiran 11. Bagan Kerja Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase (Yulianti dkk, 2012)



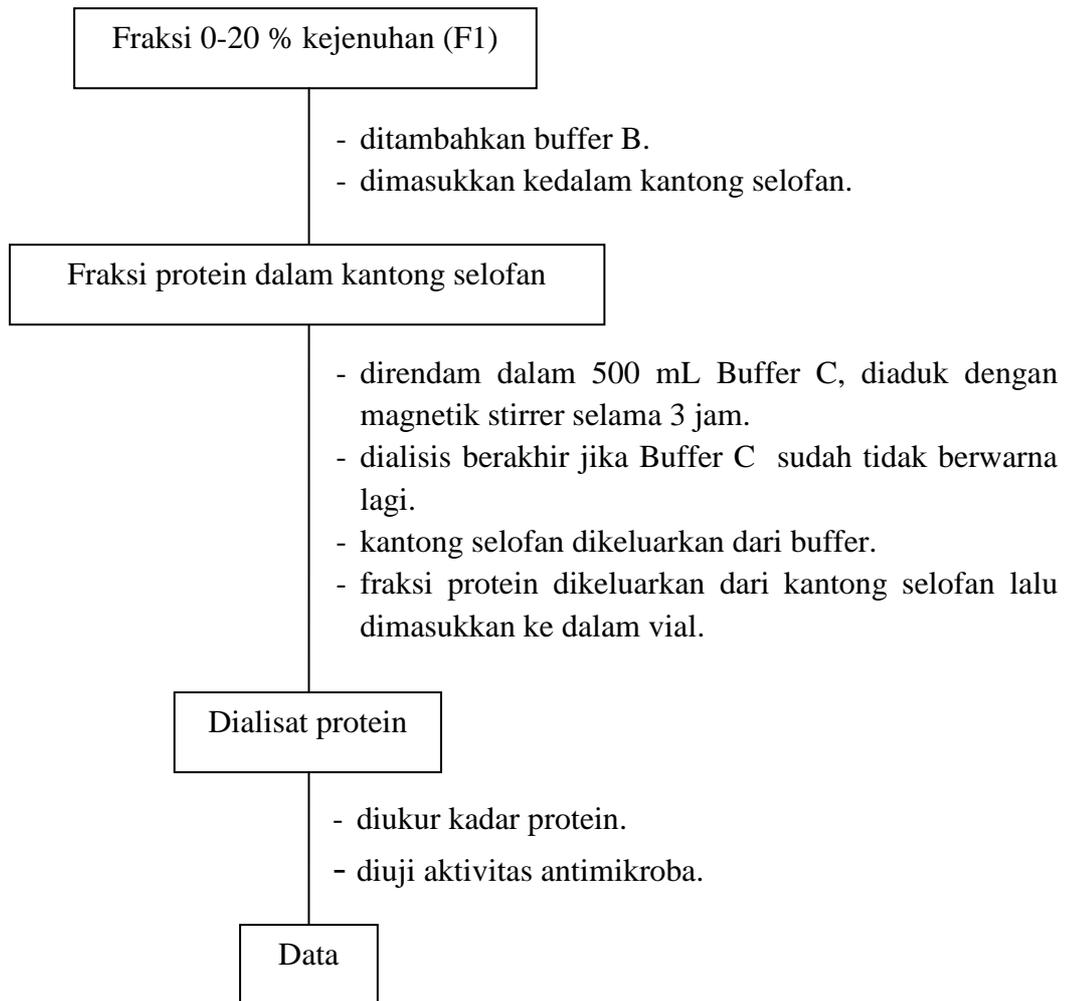
Lampiran 12. Bagan Kerja Pengaruh pH terhadap Aktivitas Ekstrak Enzim L-asparaginase (Yulianti dkk, 2012)



Lampiran 13. Bagan Kerja Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

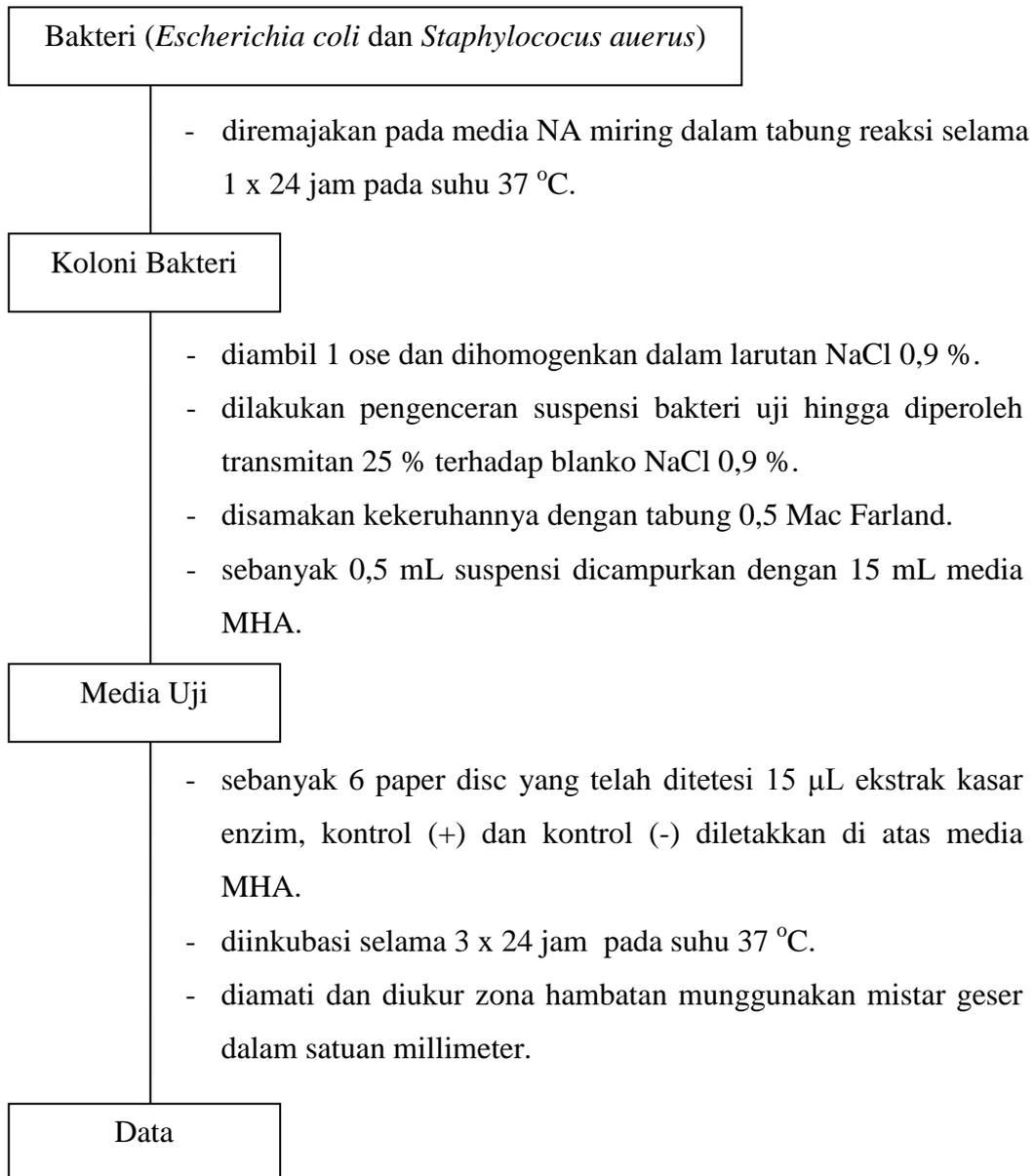


Lampiran 14. Bagan Kerja Dialisis



Keterangan: Perlakuan yang sama untuk F2, F3, F4, dan F5

Lampiran 15. Pengujian Aktivitas Antimikroba (Murniasih dan Rasyid, 2010)



Lampiran 16. Data Nilai *Optical Density* (OD) Penentuan Waktu Produksi Optimum

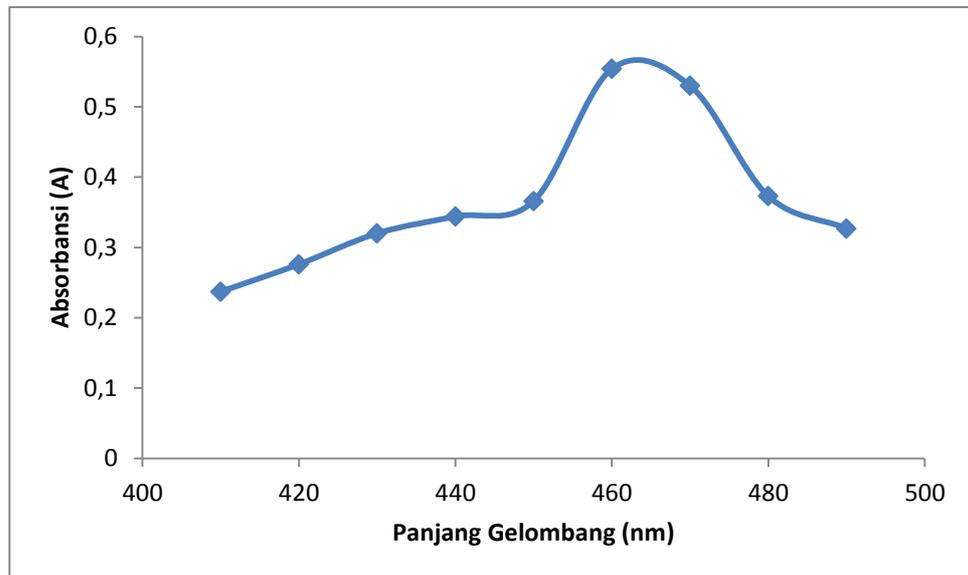
No	Waktu Produksi (jam)	OD
1	0	0,318
2	12	0,461
3	24	0,682
4	36	0,752
5	48	0,784
6	60	0,885
7	72	0,908
8	84	0,905
9	96	0,674
10	108	0,452
11	120	0,438

Lampiran 17. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar L-asparaginase dan Kadar Proteinnya untuk Penentuan Waktu Produksi Optimum

- a. Tabel Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar Amonium Klorida

No	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
1	410	0,237
2	420	0,276
3	430	0,32
4	440	0,344
5	450	0,366
6	460	0,554
7	470	0,53
8	480	0,373
9	490	0,327

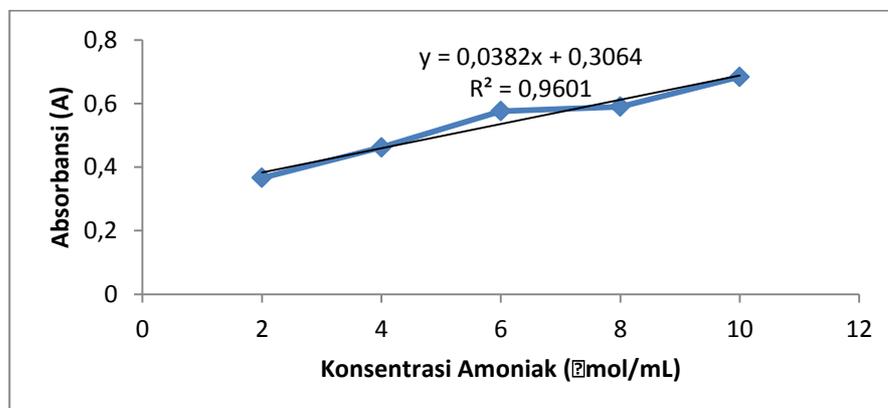
- b. Grafik Penentuan Panjang Gelombang Optimum Larutan Standar Amonium Klorida



- c. Tabel Kurva Standar Amonium Klorida pada $\lambda = 460$ nm

No	Konsentrasi ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbansi (A)
1	2	0,366
2	4	0,462
3	6	0,576
4	8	0,590
5	10	0,684

- d. Grafik Kurva Standar Amonium Klorida pada $\lambda = 460$ nm



- e. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase untuk Variasi Waktu Fermentasi dari Isolat Bakteri *Klebsiella spp.* DA51 (3)

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
0	0,352	3,9393
12	0,364	4,9759
24	0,406	8,6042
36	0,454	12,7508
48	0,482	15,1696
60	0,596	25,0178
72	0,658	30,3738
84	0,642	28,9916
96	0,458	13,0963
108	0,443	11,8005
120	0,353	4,0257

Nilai Aktivitas L-asparaginase dapat diperoleh dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y-b}{a} \times \frac{V.Total}{V.Analisis} \times \frac{1}{V.Enzim} \times \frac{1}{t.Inkubasi}$$

Dimana :

y = Absorbansi

a = Slope

b = intersept

V. Total = Volume enzim + substrat + buffer + TCA (1,25 mL)

V. Analisis = Volume total yang di analisis (0,25 mL)

V. Enzim = Volume enzim yang dianalisis (0,05 mL)

t. inkubasi = 30 menit

Contoh perhitungan penentuan aktivitas enzim :

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 0,0382x + 0,3064$ dimana $y = 0,658$ adalah absorbansi aktivitas dari enzim L- asparaginase.

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{y-b}{a} \times \frac{V.Total}{V.Analisis} \times \frac{1}{V.Enzim} \times \frac{1}{t.Inkubasi}$$

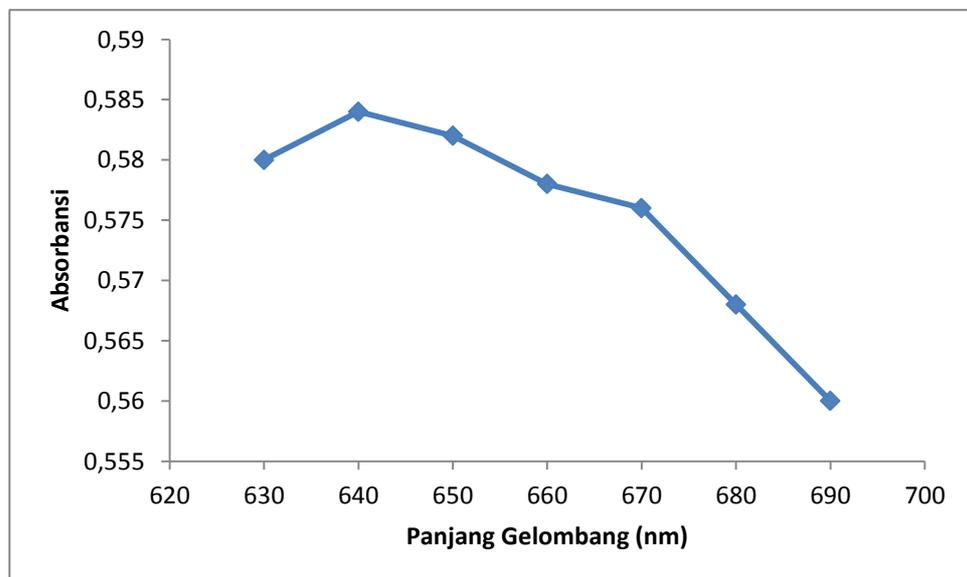
$$= \frac{0.658-0.306}{0.038} \times \frac{1.25}{0.25} \times \frac{1}{0.05} \times \frac{1}{30}$$

$$= 30,3738 \text{ U/mL}$$

- f. Tabel penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

No	panjang gelombang (nm)	Absorbansi (A)
1	630	0,580
2	640	0,584
3	650	0,582
4	660	0,578
5	670	0,576
6	680	0,568
7	690	0,56

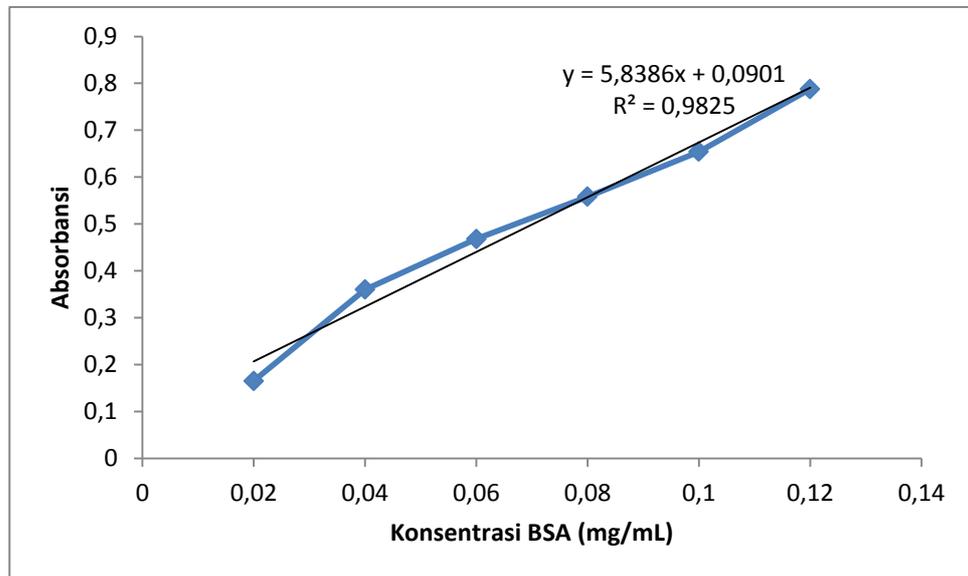
- g. Grafik Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)



- h. Tabel Kurva Larutan Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) $\lambda = 640$ nm

No	Konsentrasi (mg/mL)	Absorbansi (A)
1	0,02	0,165
2	0,04	0,360
3	0,06	0,468
4	0,08	0,558
5	0,1	0,654
6	0,12	0,788

- i. Grafik Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) $\lambda = 640 \text{ nm}$



- j. Data Pengukuran Kadar Protein Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase untuk Penentuan Waktu Produksi Optimum

Waktu Fermentasi (Jam)	Absorbansi (A)	Kadar Protein (mg/mL)
0	0,461	0,1188
12	0,4405	0,1126
24	0,502	0,1312
36	0,518	0,1359
48	0,533	0,1403
60	0,544	0,1438
72	0,578	0,1836
84	0,562	0,1736
96	0,475	0,1230
108	0,417	0,1055
120	0,312	0,0742

k. Data Aktivitas Spesifik Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase pada Penentuan Waktu Produksi Optimum

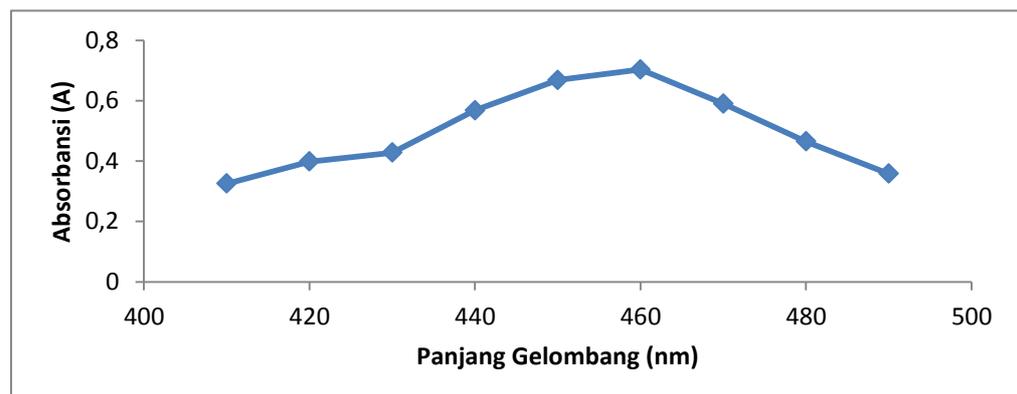
Waktu Fermentasi (jam)	Aktivitas Enzim (U/mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
0	3,9393	0,1188	33,1591
12	4,9759	0,1126	44,1909
24	8,6042	0,1312	65,5808
36	12,7508	0,1359	93,8249
48	15,1696	0,1403	108,1226
60	25,0178	0,1438	173,9764
72	30,3738	0,1836	165,4346
84	28,9916	0,1736	167,0023
96	13,0963	0,1230	106,4740
108	11,8005	0,1055	111,8531
120	4,0257	0,0742	54,2547

Lampiran 18. Data Uji Aktvitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum

a. Tabel Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar Amonium Klorida

No	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (A)
1	410	0,325
2	420	0,398
3	430	0,428
4	440	0,568
5	450	0,668
6	460	0,703
7	470	0,59
8	480	0,465
9	490	0,358

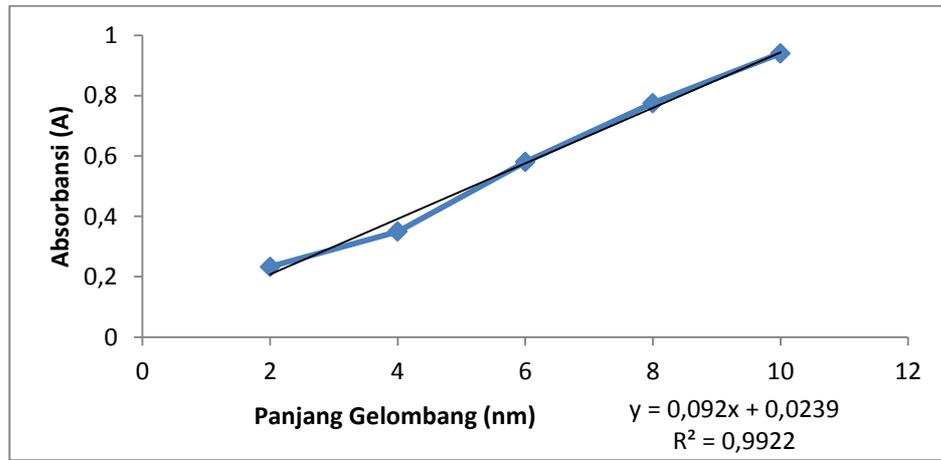
b. Grafik Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar Amonium Klorida



c. Tabel Kurva Standar Amonium Klorida pada $\lambda = 460 \text{ nm}$

No	Larutan Standar ($\mu\text{mol/mL}$)	Absorbansi (A)
1	2	0,233
2	4	0,35
3	6	0,58
4	8	0,775
5	10	0,94

d. Grafik Kurva Standar Amonium Klorida pada $\lambda = 460 \text{ nm}$



e. Data Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim L-asparaginase untuk Variasi Konsentrasi Substrat dari Isolat Bakteri Klebsiella spp. DA51 (3)

Konsentrasi L-asparagin ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi (A)		Rata-Rata	Aktivitas (U/mL)
	Simplo	Duplo		
0,005	0,214	0,201	0,208	6,7683
0,01	0,355	0,355	0,345	11,781
0,015	0,594	0,502	0,548	19,208
0,02	0,56	0,494	0,527	18,4396
0,025	0,523	0,455	0,523	18,2932

Lampiran 19. Data Uji Aktvitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan Suhu Inkubasi Optimum

Suhu	Absorbansi		Rata-Rata	Aktivitas (IU/mL)
	Simplo	Duplo		
30	0,456	0,46	0,458	17,0656
35	0,478	0,476	0,477	18,0081
37	0,486	0,488	0,487	18,5130
40	0,474	0,484	0,479	17,8398
45	0,466	0,48	0,473	17,5032
50	0,416	0,414	0,415	14,8104

Lampiran 20. Data Uji Aktvitas Ekstrak Kasar L-asparaginase untuk Penentuan pH Optimum

pH	Absorbansi		Rata-Rata	Aktivitas (IU/mL)
	Simplo	Duplo		
5	0,348	0,352	0,35	11,4444
6	0,346	0,357	0,3515	11,6463
7	0,36	0,384	0,372	12,7908
8	0,472	0,416	0,444	16,1568
9	0,256	0,26	0,258	7,1022
10	0,246	0,249	0,2475	6,5637

Lampiran 21. Data Aktivitas Ekstrak Kasar dan Hasil Fraksinasi

Ekstrak Kasar dan Fraksi	Absorbansi	Aktivitas Enzim (U/mL)
EK	0,708	22,4175
F1	0,578	14,4064
F2	0,612	16,0894
F3	0,518	9,896
F4	0,614	16,2241
F5	0,562	12,7908

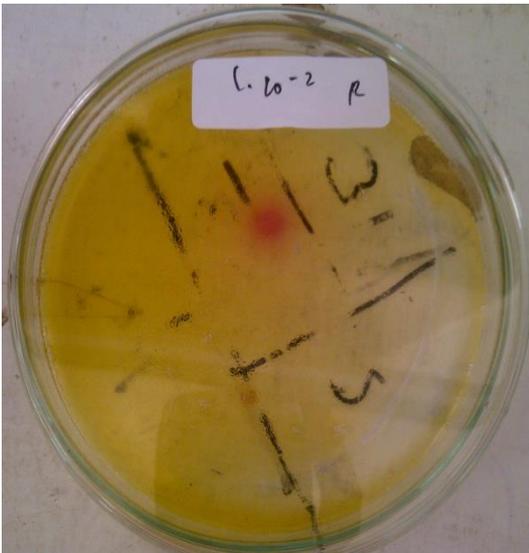
Lampiran 22. Data Penentuan Kadar Protein Ekstrak Kasar dan Hasil Fraksinasi

Ekstrak Kasar dan Fraksi	Absorbansi	Kadar Protein (mg/mL)
EK	0,349	0,085
F1	0,291	0,067
F2	0,15	0,025
F3	0,115	0,014
F4	0,134	0,02
F5	0,12	0,016

Lampiran 22. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

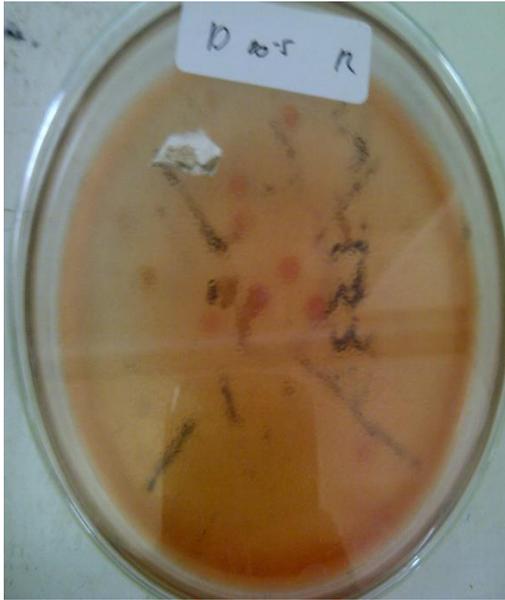
Ekstrak Kasar dan Fraksi	Volume tiap Fraksi	Kadar Protein (mg/mL)	Total protein (mg)
0-20 %	10	0,067	0,67
20-40 %	10	0,025	0,25
40-60 %	10	0,014	0,14
60-80 %	10	0,02	0,2
80-100 %	10	0,016	0,16

Lampiran 23. Isolat Bakteri pada Berbagai Pengenceran

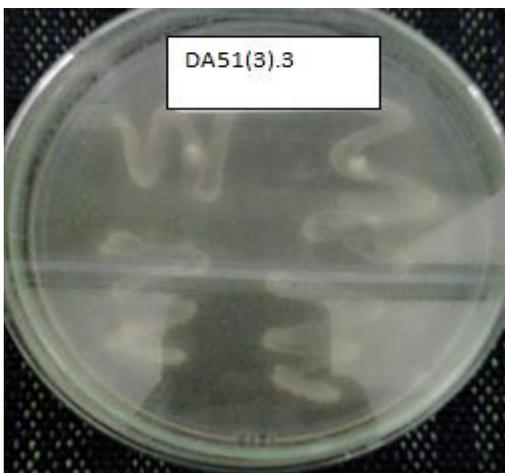
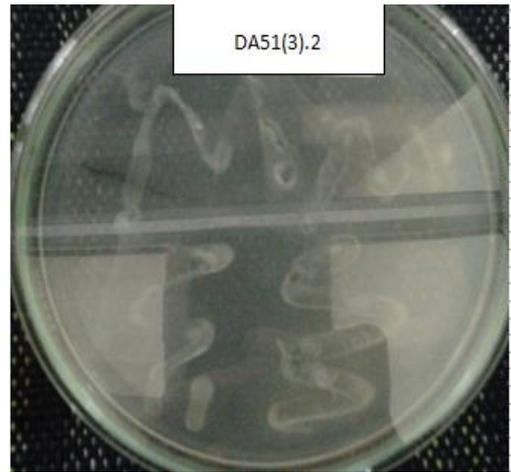
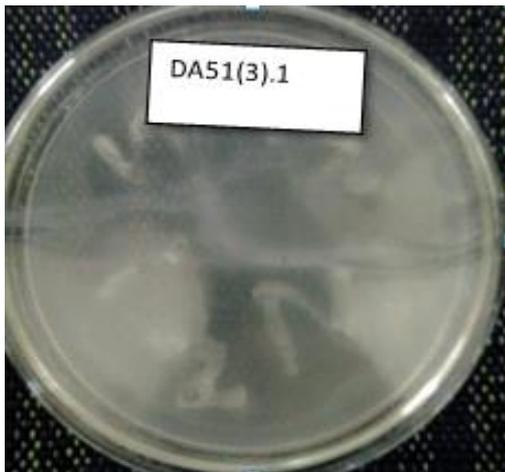








Lampiran 24. Isolat Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba



Lampiran 25. Hasil Uji Biokimia



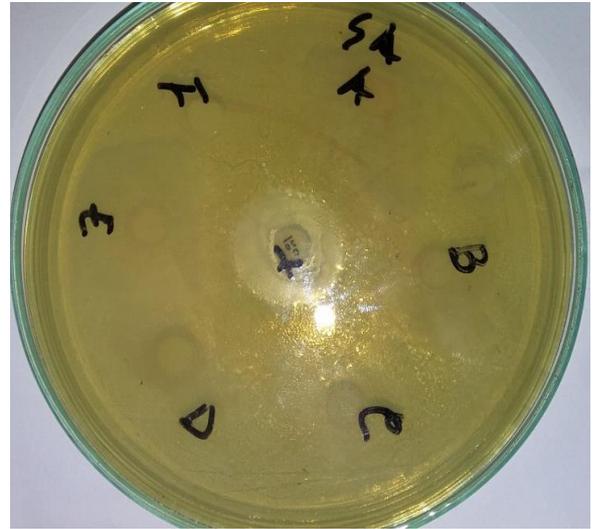
Lampiran 26. Hasil Uji Aktivitas L-asparaginase dari *Klebsiella sp*



Lampiran 27. Hasil Uji Aktivitas L-asparaginase dari *Klebsiella sp*



Lampiran 28. Hasil Uji Daya Hambat Masing-masing Fraksi dan Ekstrak Kasar selama 2x24 jam inkubasi



Keterangan :

E. coli : *Escherichia coli*

SA : *Staphylococcus aureus*

A : F1 (0-20 %)

B : F2 (20-40 %)

C : F3 (40-60 %)

D : F4 (60-80 %)

E : F5 (80-100 %)

F : kontrol negatif (BSA)

+ : kontrol positif (klorampenikol)