

## DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A.T., dan Yuhana, M., 2011, Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis* sp. sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba, *Ilmu Kelautan*, **16**(1):35-40.
- Agustiani, 2014, *Uji Aktivitas Antikanker Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum* sp. Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Ahmad, A., Natsir, H., dan Karim, H., 2014, Purification and Gene Cloning of Novel Antibacterial Phospholipase A2 of The Sponge *Agelas Clathroides* from Kapoposang Island Indonesia Terrestrial, *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, **2**(5):119-126.
- Amir, I. dan Budiyanto, A., 1996, Mengenal Spons Laut (Demospongiae) secara Umum, *Oseana*, **21**(2):15-31.
- Angkuna, S.A., Apridamayanti, P., dan Sari, R., 2019, Penentuan Waktu Optimum Produksi Bakteriosin dari *Lactobacillus casei* terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, **4**(1):1-18.
- Arifuddin, Patong, R., dan Ahmad, A., 2001, Penelusuran Protein Bioaktif dalam Makro Alga sebagai Bahan Antibakteri dan Antijamur, *Marina Chimica Acta*, **2**(2):11-18.
- Baharuddin, M., 2016, *Kajian Selulase dari Bakteri Simbion Larva Kupu-Kupu (Cossidae): Pemurnian, Karakterisasi dan Aplikasi dalam Hidrolisis Lignoselulose Jerami*, Disertasi tidak diterbitkan, Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- BD Biosciences, 2009, *Hydrolysis to hydrolysate*, (Online), (<https://www.bdbiosciences.com> diakses pada 10 Agustus 2021)
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., dan Garcia-Gravalos, M.D., 2002, A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In-Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products, *BioMed*, **2**(17):1472-1475.
- Cho, H.J., Bae, S.J., Kim, N.D., Jung, J.H., dan Cho, Y.H., 2004, Induction of Apoptosis by Dideoxypetrosynol A, A Polyasetylene from Spons *Petrosia* sp., in Human Skin Melanoma Cells, *International Journal of Molecular Medicine*, **23**(8):1091-1096.
- Damodaran S, 1996, *Amino Acids, Peptides and Protein*, Di dalam: Fennema OR, editor. *Food Chemistry Edisi ke-3*, Marcel Dekker Inc., New York.

- Dennison, C., 2002, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publisger, New York.
- De Voogd, N.J. dan Van Soest, R.W.M., 2002, *Indonesian Sponge of the Genus Petrosia*, Zool. Med. Leidan, 76.
- Dumitrascu, M., 2011, Artemiasalina, *Balneo-Research Journal*, **2**(4):119-122.
- El Sayed, K.L., Kelly, M., Kara, U.K., Ang, K.H., Katsuyama, I., Dunbar, D.C., Khan, A.A., dan Hamann, M.T., 2001, New Manzamine Alkaloids with Potent Activity against Infectious Disease, *Journal American Chemical Society*, **123**(9):1804-1808.
- Gemini, A., Astuti, P., Wahyuono, S., Sari, D., dan Hamman, M.T., 2005, Structure Elucidation of Bioactive Compounds Isolated from Sponge *Petrosia* sp. Collected from Bunaken Bay Manado, *Indonesian Journal Chem*, **5**(2):35-38.
- Handayani, D., Sayuti, N., Dachriyanus, dan Van Soest, R.W.M., 2011, Epidioksi Sterol, Senyawa Antibakteri dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, *Jurnal Bahan Alam*, **7**(6):289-293.
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., dan Recio, I., 2004, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1504-1510.
- Hifizah, A., 2012, *Mikrobiologi Ternak*, UIN Press, Makassar.
- Hoskin, D.W. dan Ramamoorthy, A, 2008, Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides, *Biochim Biophys Acta*, 1778:357-375.
- Irianto, K., 2006, *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme* Jilid 2, CV. Yrama Pers, Jakarta.
- Juariah, S. dan Sari, W.P., 2018, Pemanfaatan Limbah Cair Industri Tahu sebagai Media Alternatif Pertumbuhan *Bacillus* sp., *Jurnal Analis Kesehatan Klinikal Sains*, **6**(1):24-29.
- Kemenkes RI, 2019, *Situasi Penyakit Kanker Infodatin*, Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan Republik Indonnesia, Jakarta.
- Kozloff, E.N., 1990, *Invertebrates*, Saunders College Publishing, New York.
- Lisdawati, V., Sumali, W.L., Broto, S., dan Kardono, 2006, *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (Phaleriamacrocarpa)*” *Buletin Penelitian Kesehatan*, **34**(3):111-118.
- Long, R.A. dan Azam, F., 2001, Antagonistic Interaction among Marine Pelagic Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(11):4975-4983.

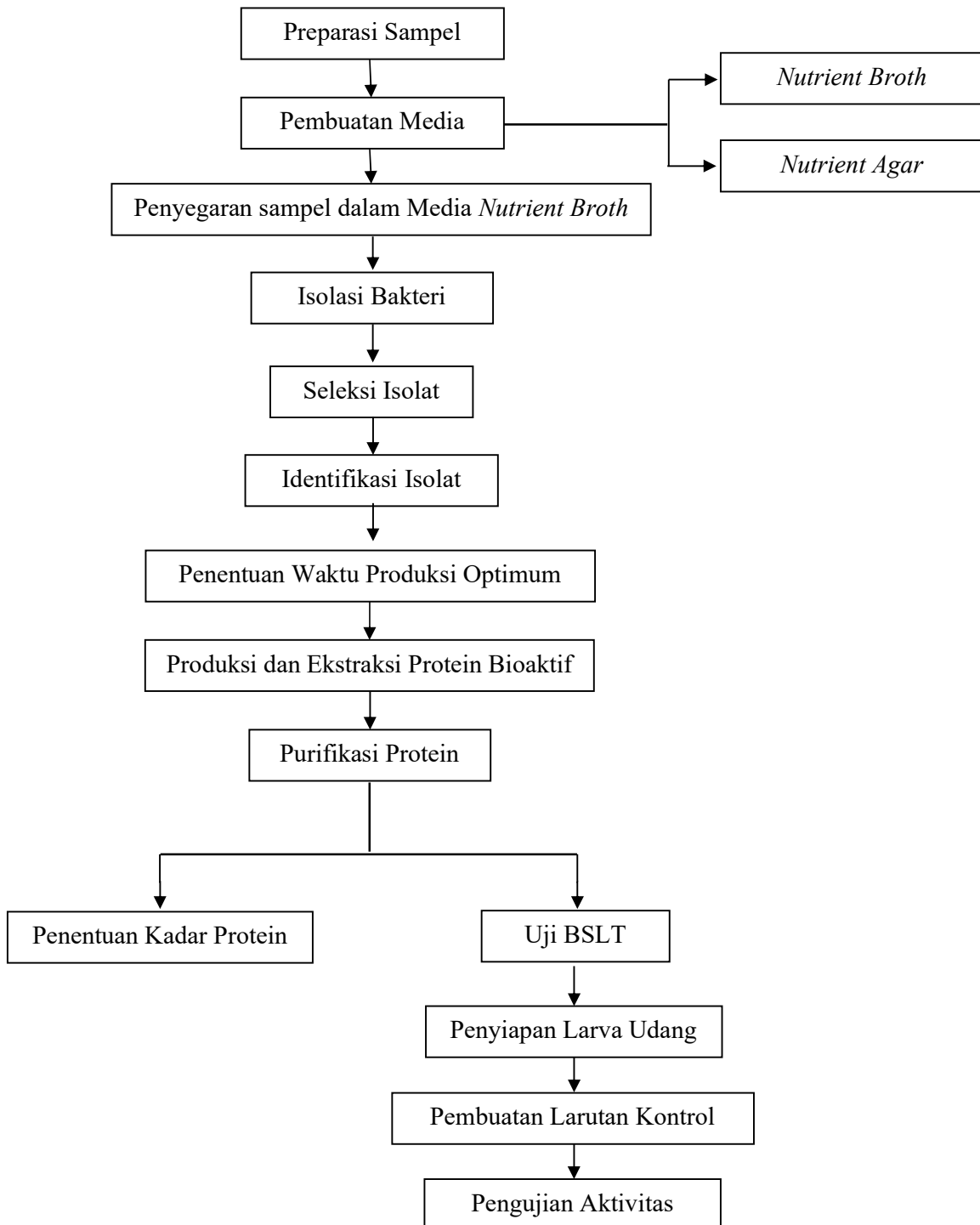
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., dan Randall, R.J. 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal Biological Chemistry*, 193:265-275.
- Madan, R., Benson, R., Sharma, D.N., Julka, P.K., dan Rath, G.K., 2015, Radiation Induced Heart Disease: Pathogenesis, Management and Review Literature, *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 27(4):187-193.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., dan McLaughlin, J., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta Medica*, 45(5):31-34.
- Muniarsih, T. dan Rachmaniar, R., 1999, Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu, *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98*. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta.
- Naid, T., Kasim, S., Marzuki, A., dan Sumarheni, 2013, Produksi Antibiotika secara Fermentasi dari Biakan Mikroorganisme Symbion Rumput Laut *Euchemum cottoni*, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 17(3):61-68.
- Natsir, H., Patong, A.R., Suhartono, M.T., dan Ahmad, A., 2013, Isolation and Purification of Thermostable Chitinase *Bacillus licheniformis* Strain HSA3-1a from Sulili Hot Springs in South Sulawesi Indonesia, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(3):1252-1259.
- Nowin, E., Warouw, V., Joice R.T.S.L., Rimper, Paulus, J.J.H., Pangkey, H., Sumilat, D.A., 2019, Penapisan (Skrining) Aktivitas Antibakteri Beberapa Ekstrak Spons dari Teluk Manado, *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1(1):52-60.
- Nurhajrah, 2013, *Isolasi dan Identifikasi Protein Bioaktif dari Alga Merah Euchemum spinosum*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematik dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Nuryanti, 2019, *Pengaruh Induser (Maltosa), pH dan Suhu Terhadap Produksi dan Karakterisasi Enzim Alfa Amilase dari Isolat Bakteri Termofil Sumber Air Panas Teluk Jailolo Maluku Utara*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Nofiani, R., 2008, Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut, *Jurnal Natur Indonesia*, 10(2):120-125.
- Ohba, M., Mizuki, E., dan Uemori, A., 2009, Parasporin A New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*, *Internasional Journal of Cancer Research and Treatment*, 29 (1): 927-933.
- Pailee, P., Mahidol, C., dan Ruchirawat, S., 2017, Sterols from Thai Marine Sponge *Petrosia (Strongylophora) sp.* and Their Cytotoxicity, *Marine Drugs Journal*, 15(54):1-12.

- Palmer, T., 1991, *Understanding Enzymes 3rd edition*, Ellis Horwood Limited, West Sussex.
- Panjaitan, R.B., 2011, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiaecortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
- Pelczar, M.J., 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F.M.T., 2005, *Dasar-Dasar Biokimia*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Puji, A., Sukardiman, dan Fadjri, H.T., 2012, *Uji Sitotoksitas dan Efek Ekstrak Spons Laut Aaptossu beritoides terhadap Sel Kanker Serviks (Hela) secara In Vitro*, Department of Biology Sepuluh Nopember Institute of Technology, 1-15
- Purnomo, E., 2005, *Pemanfaatan Bahan Sisa dalam Upaya Meminimalisasi Limbah Padat*, Tesis tidak diterbitkan, Program Magister Ilmu Lingkungan Program Pasca Sarjana, Universitas Diponegoro Semarang, Semarang.
- Putra, R., Ismed, F., dan Handayani, D., 2017, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Bakteri *Bacillus sp.* 3 (A1) yang Bersimbiosis dengan Spon Laut *Haliclona fascigera*, *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, 4(2):24-29.
- Rachmat, R., 2008, Penelitian Pengembangan Obat dari Produk Alami Laut, *Orasi Pengukuhan Profesor Riset Bidang Produk Alami Laut*, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Rahayuwati, L., Ibrahim, K., dan Komariah, M., 2017, Pilihan Pengobatan Pasien Kanker Payudara Masa Kemoterapi: Studi Kasus, *Jurnal Keperawatan Indonesia*, 2(20):118-127.
- Ralph, D. F., 1988, *What Are Sponge?*, Quesland Museum, Australia.
- Ramadan, R., 2020, *Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Symbion Alga Merah (Euclidean spinosum) dan Potentinya sebagai Agen Antikanker*, Disertasi tidak diterbitkan, Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Rasyid, A., 2008, Biota Laut sebagai Sumber Obat-Obatan, *Oseana*, 33(1):11-18.
- Reha, W., Noor, A., Ahmad, A., Nefie, N.L., dan Salam, D., 2014, Karakterisasi Protein Aktif dari Spons dan Mikroba Simbionnya sebagai Usaha Awal Menuju Agen Immunostimulan, *Marina Chimica Acta*, 14(1):1411-1232.
- Romihmohtarto, K. dan Juwana, S., 2001, *Biologi Laut : Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*, Djambatan, Jakarta.

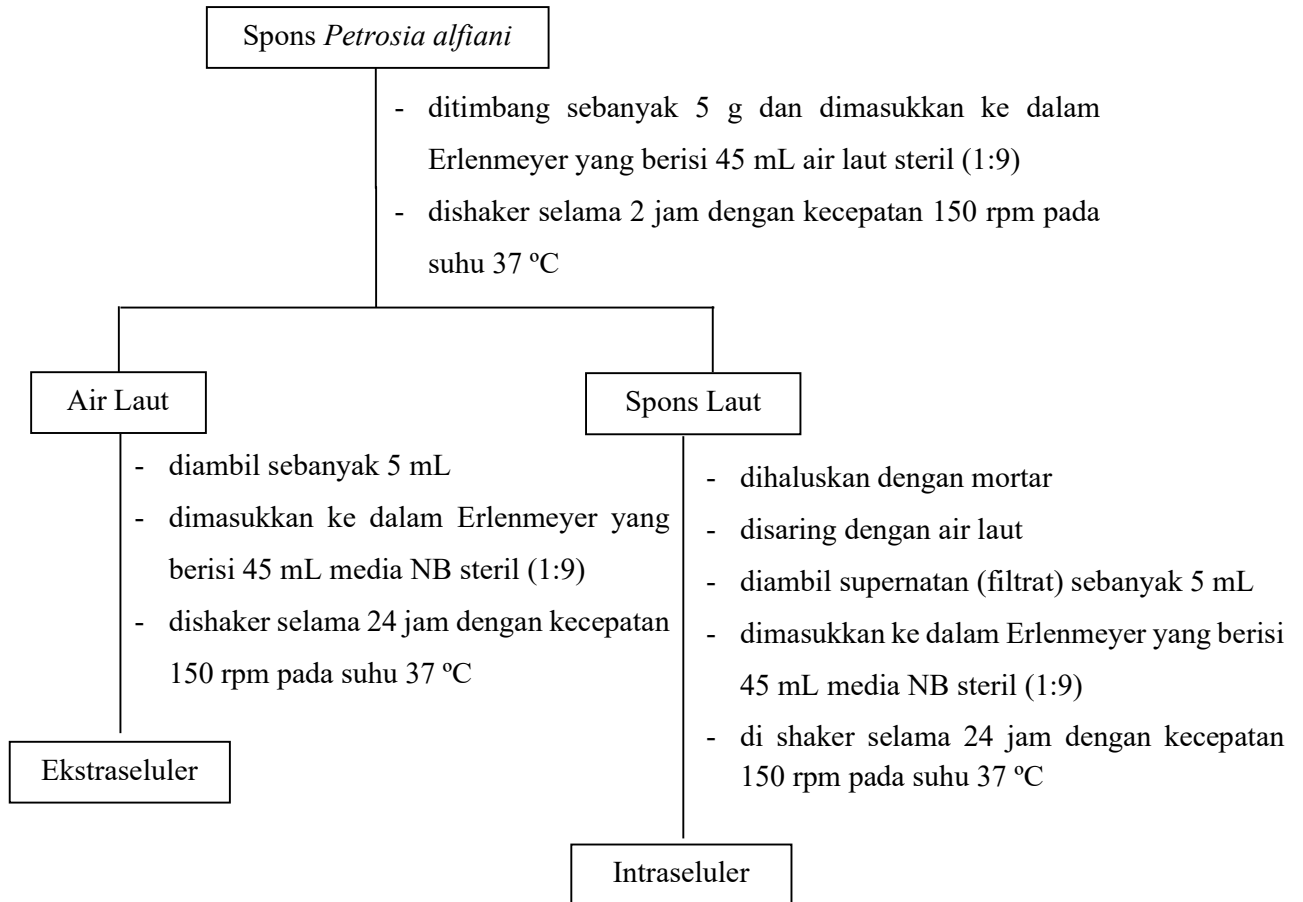
- Rosmiati dan Suryati, 2001, Isolasi Identifikasi dan Pengaruh Senyawa Bioaktif Spons *Callyspongia pseudoreticulata* terhadap Bakteri Patogen dari Udang, *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, **1**(16).
- Rutherford, S.M., 2010, Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Protein Hydrolysates: A Review, *Jurnal AOAC Int*, **93**(5):1515-1522.
- Rutu, I., Natsir, H., dan Arfah, R., 2015, Production of Protease Enzyme from Bacteria in Hot Spring of South Sulawesi, *Bacillus licheniformis hsa3-1a*. *Marina Chimica Acta*, **16**(1):10-17.
- Sadarun, B., Malaka, H., Wahyuni, dan Sahidin, Toksisitas Akut Senyawa Metabolit Sekunder dari Spons Laut *Clathria* sp., *Majalah Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, **3**(1):6-9.
- Sartika, 2014, *Potensi Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum sp. Asal Perairan Pulau Lae-Lae*, Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Scopes, R.K., 1994, *Protein Purification: Principles and Practice 3rd edition*, Springer-Verlag, New York.
- Setiawan, S.D., 2015, The Effect of Chemotherapy in Cancer Patient to Anxiety, *Journal Majority*, **4**(4):94-99.
- Silvestre, M.P.C., Morais, H.A., Silva, V.D.M., dan Silva, M.R., 2013, Degree of Hydrolysis and Peptide Profile of Whey Proteins Using Pancreatin, *Journal Brazilian Soc. Food Nutr.*, **38**(3):278-292.
- Srisadono, A., 2008, *Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (piper betle linn) Sebagai Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Tes (BSLT)*, Artikel Karya Tulis Ilmiah, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang
- Sudjadi dan Sismindari., 2011, Perkembangan Ribosome-Inactivating Protein (RIP) sebagai Antikanker, *Traditional Medicine Journal*, **16**:1-6.
- Suhirman S., Hernani, dan Syukur, C., 2006, Uji Toksisitas Ekstrak Lempuyung Gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach), *Buletin Littro*, **18**(1):30-38.
- Sumilat, A. D., 2017, Aktivitas Spons Laut *Lamellodysidea Herbacea* dari Perairan Malalayang, *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, **4**(1):1-7.
- Sukmarianti, N.W.S., Suaniti, N.M., dan Swantara, M.D., 2013, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Spons *Ianthellabasta* terhadap Larva *Artemia salina* L, *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, **1**(1):14-19.

- Suparno, 2005, Kajian Bioaktif Spons Laut (porifera: Demospongiae) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam di Bidang Farmasi, *Jurnal Perikanan Indonesia*, **24**(21):41-45.
- Tavano, O.L., 2013, Protein Hydrolysis Using Proteases: An Important Tool for Food Biotechnology, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, **90**:1-11.
- Taylor M.W., Radax, R., Steger, D., dan Wagner, M., 2007, Sponge-associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential, *Microbiol Mol Biol Rev*, (71):295-347.
- Vaclavik, V.A. dan Christian, E.W., 2008, *Essentials of Food Science Third Edition*, Springer Science Business Media, LLC, New York.
- Van Soest, R.W.M., 1989, The Indonesian Sponges Fauna : A Status Report, *Ne&J. Sea Res*, **23**:223-30.
- Van Soest, R.W.M. dan Breakman, J.C., 1999, Chemosystematics of Porifera : A Review, *Memoirs of The Queensland Museum*, **44**:569-589.
- Wahyudin, Y. dan Mahipal, 2013, Strategi Pembangunan Negara Kepulauan *Wawasan Tridharma: Majalah Ilmiah Kopertis Wilayah IV*, **25**(6):1-12
- Wahyudin, Y., Mulyana, D., Ramli, A., Rikardi, N., Suhartono, D., dan Kesewo, A.T., 2019, Nilai Ekonomi Keanekaragaman Hayati Pesisir dan Laut Indonesia, *Jurnal Cendekia Ihya*, **2**(2):37-51.
- Wang, Z. dan Zhang, X., 2016, Isolation and Identification of Anti-proliferative Peptides from *Spirulina Platensis* using Three-Step Hydrolysis, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**(3):918-922.
- Warren, L., 1982, *Encyclopedia of Marine Invertebrates First Edition*, T.F.H Publications, New York.
- Winarno, F.G., 1992, *Kimia Pangan dan Gizi*, PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Lampiran 1. Diagram Alur Penelitian



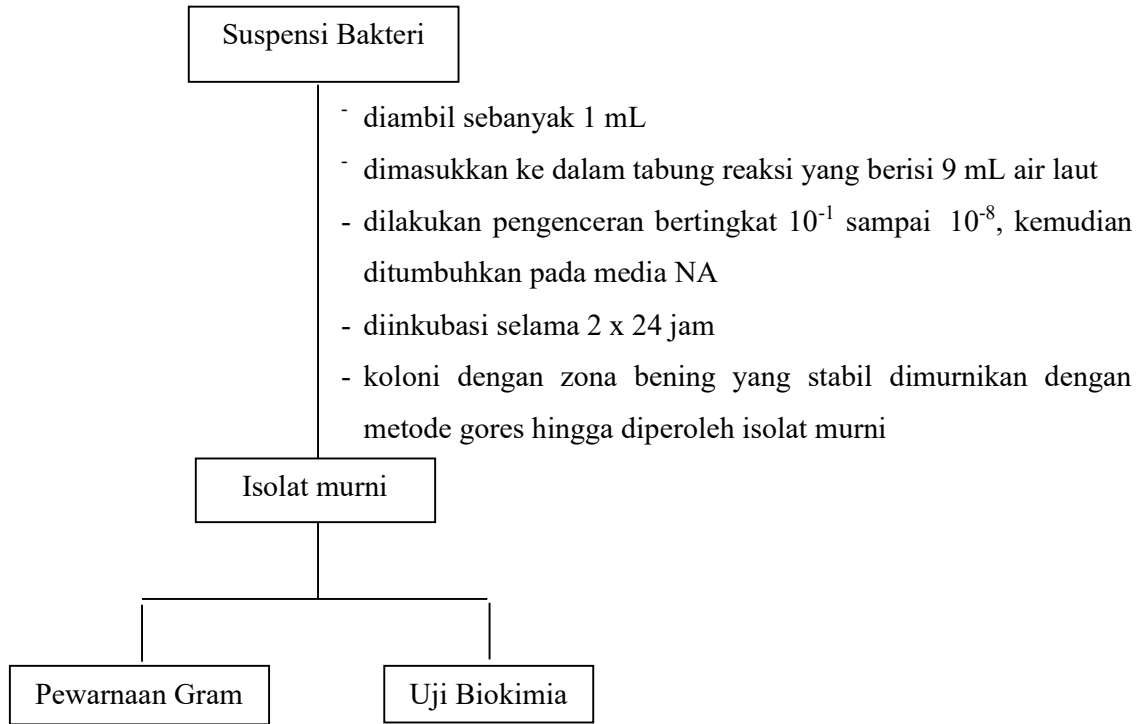
**Lampiran 2.** Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth*



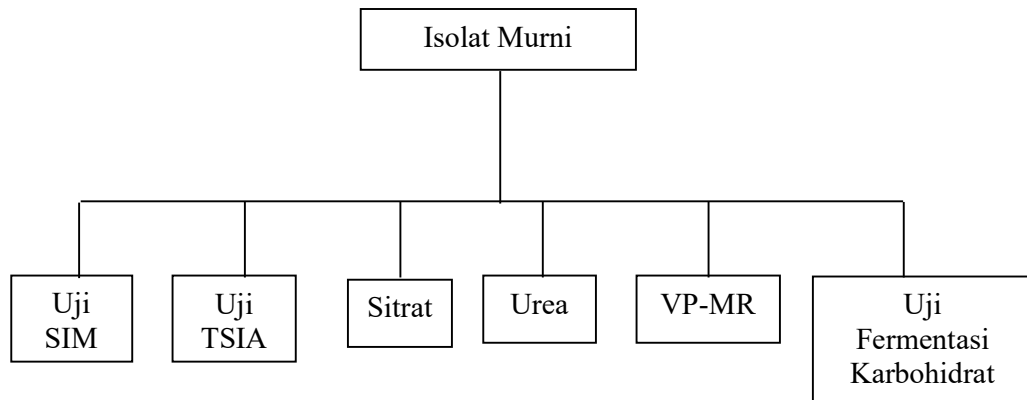


### Lampiran 3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri

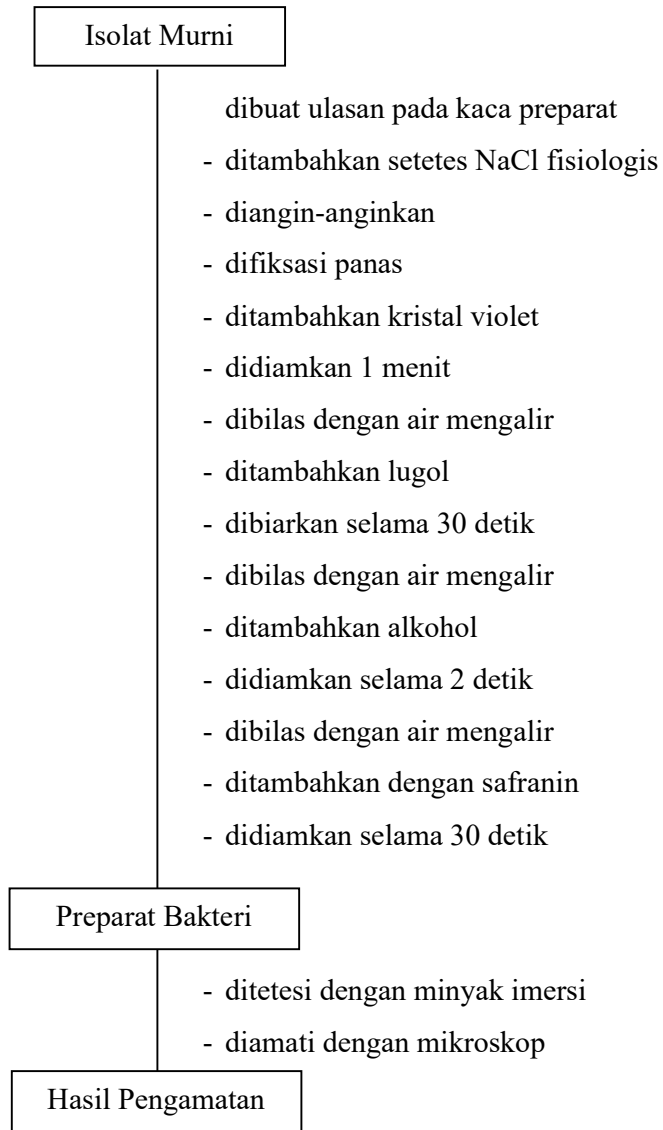
#### a. Isolasi Bakteri



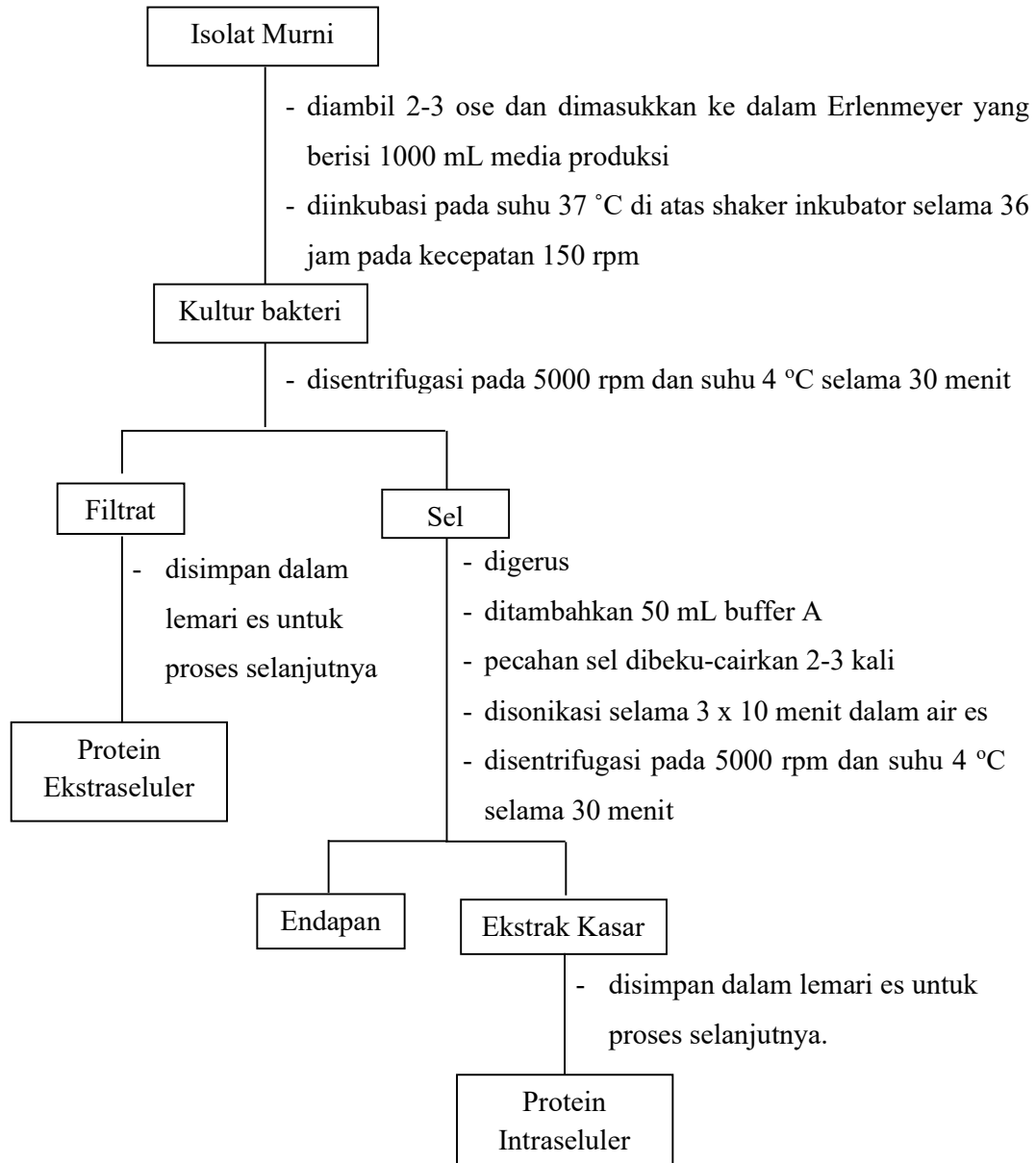
#### b. Uji Biokimia



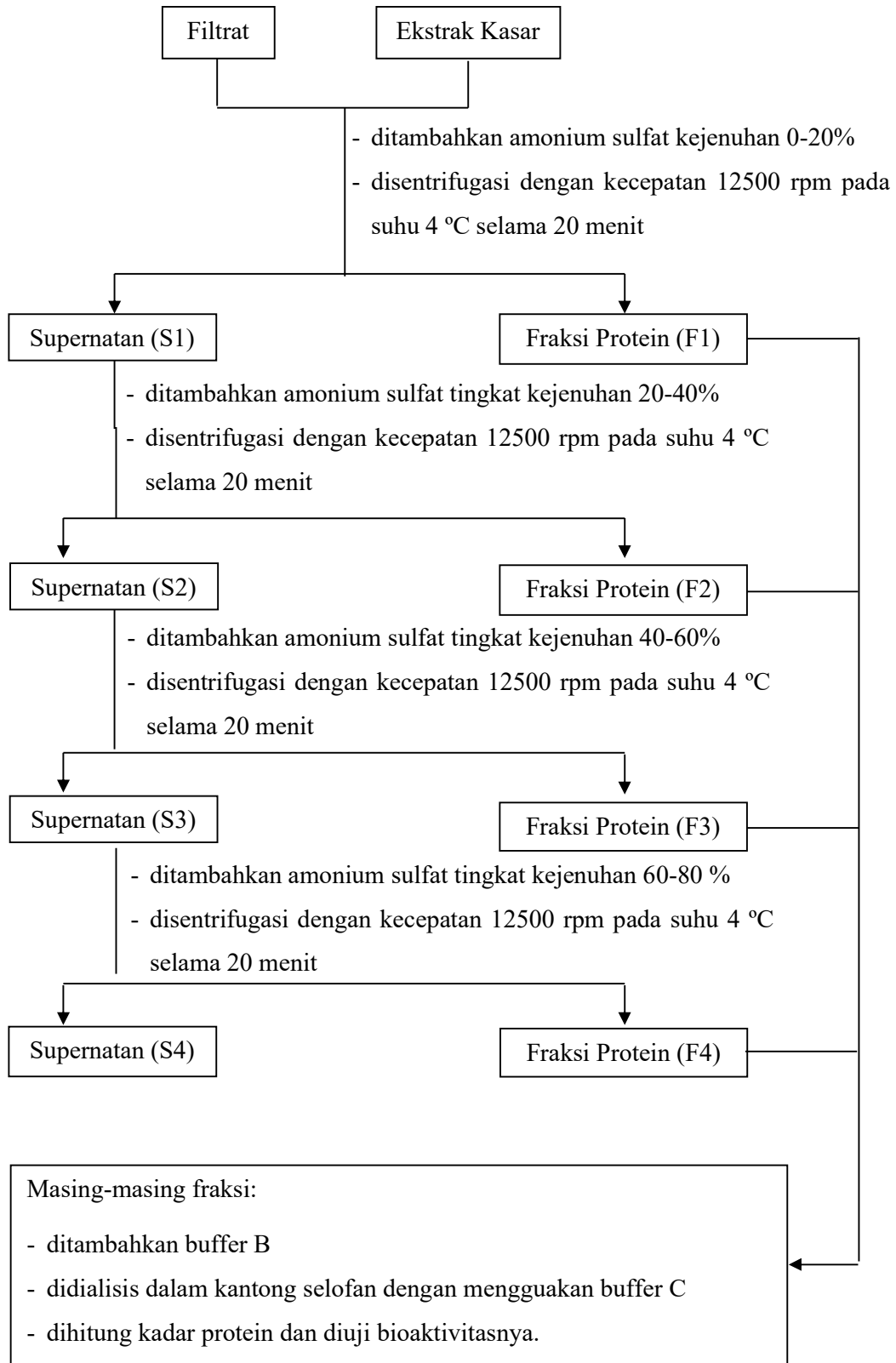
### c. Pewarnaan Gram



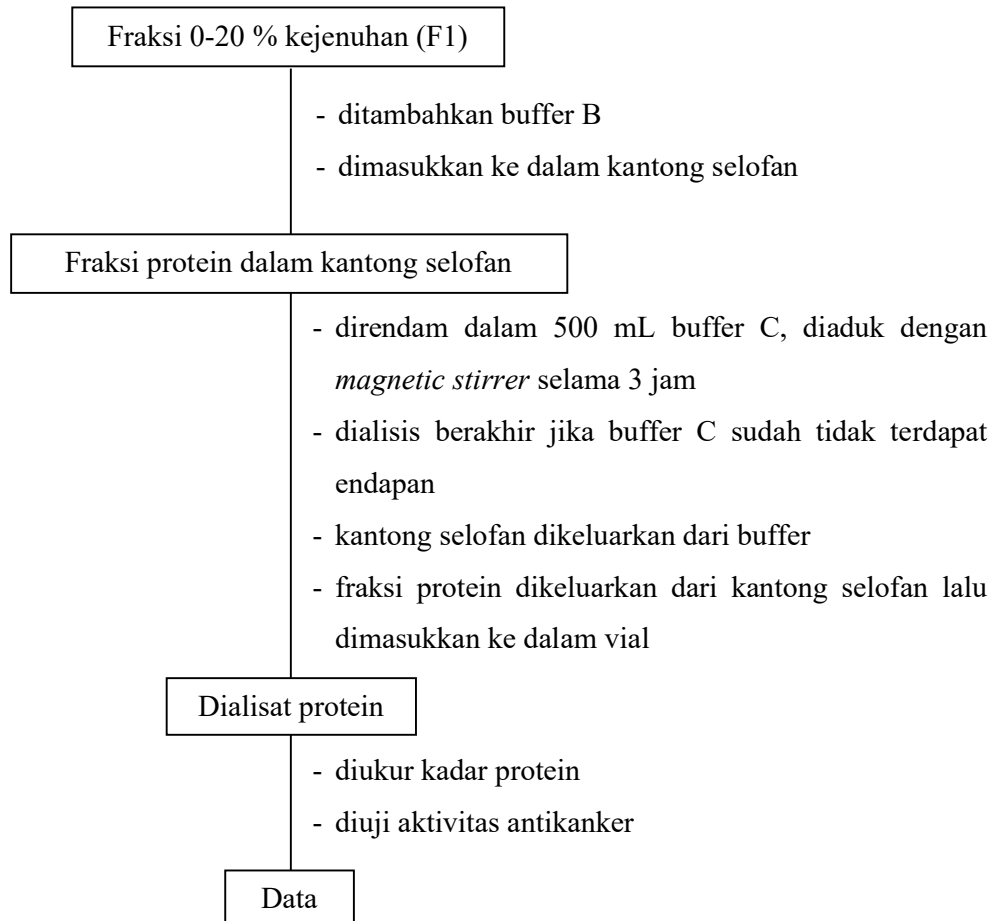
#### Lampiran 4. Bagan Kerja Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif



**Lampiran 5.** Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat

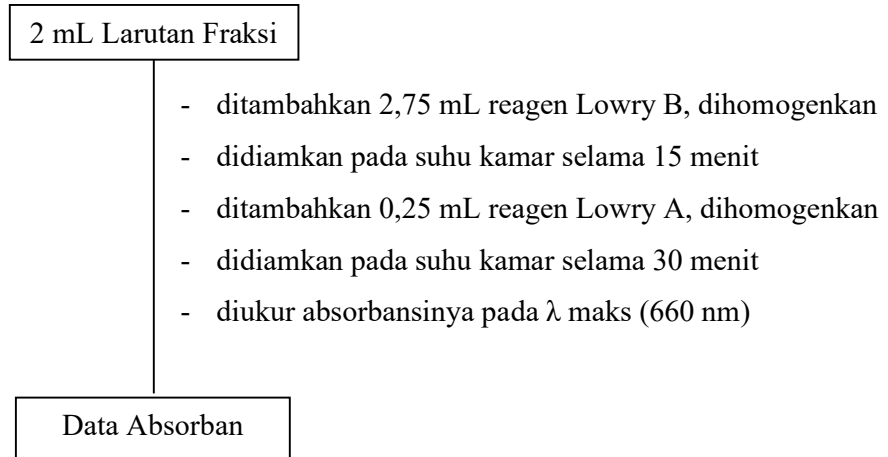


## Lampiran 6. Bagan Kerja Dialisis



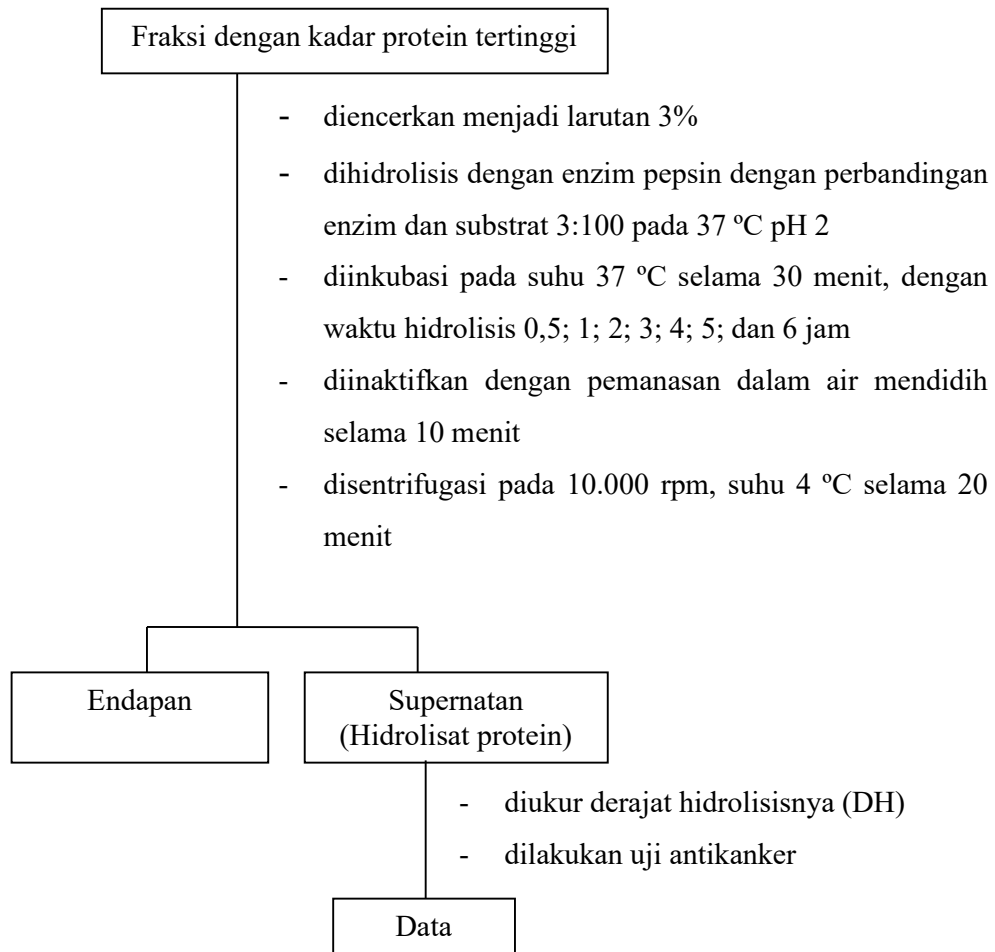
*Catatan* : Perlakuan yang sama untuk F2, F3 dan F4.

**Lampiran 7. Prosedur Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry**



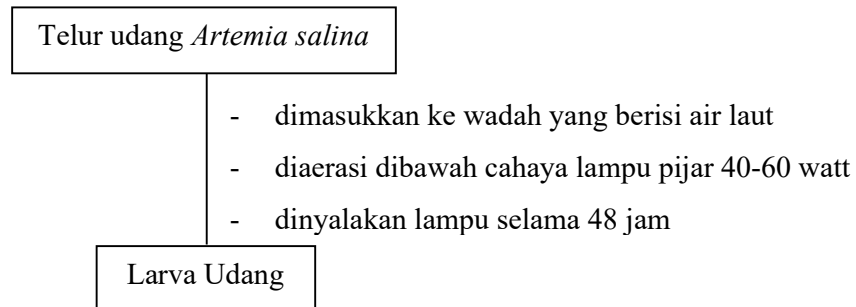
*Catatan* : Perlakuan yang sama untuk larutan blanko dan larutan standar BSA.

### Lampiran 8. Bagan Kerja Hidrolisis Enzimatis Protein

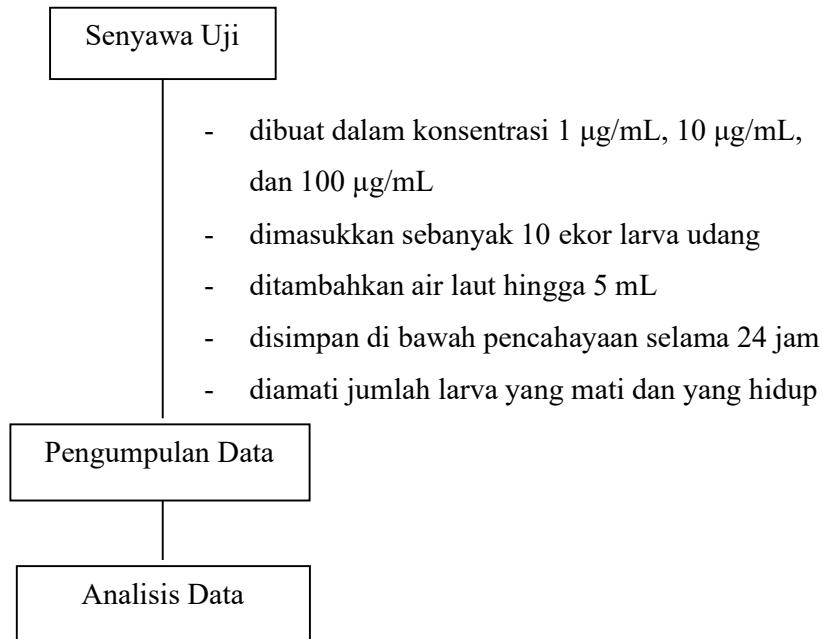


## Lampiran 9. Uji Antikanker Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

### a. Penyiapan Larva Udang



### b. Pelaksanaan Uji



*Catatan:*

Prosedur yang sama dilakukan juga pada Buffer B tanpa sampel sebagai kontrol negatif.



## Lampiran 10. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

### Pereaksi:

#### 1. Pereaksi Lowry A

Cara pembuatan Lowry A yakni dengan pencampuran antara folin ciocalteus dan akuades dengan perbandingan 1 : 1 dan dibuat sebanyak 20 mL.

#### 2. Pereaksi Lowry B

Cara pembuatan Lowry B yakni dengan pencampuran  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % dalam NaOH 0,1 N, Na-K-Tartat 2 %,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 % dengan perbandingan 100 : 1 : 1, dimana diambil larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 % dalam NaOH 0,1 N sebanyak 100 mL, Na-K-Tartat 2 % sebanyak 1 mL, dan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1 % sebanyak 1 mL, kemudian dihomogenkan.

### Larutan Contoh:

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

### Larutan Baku:

- ditimbang dengan teliti BSA untuk membuat sediaan 1 mg/mL dan diencerkan dengan variasi konsentrasi 0,02; 0,04; 0,08; 0,16 dan 0,32 mg/ mL.

### **Lampiran 11.** Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl

- A. Pembuatan larutan bufer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; NaCl 2 M; CaCl<sub>2</sub> 0,01 M, β-merkaptotanol 1 %, Triton X-100 0,5 %)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 6,05 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 58,5 g dan 0,555 g CaCl<sub>2</sub>, β-merkaptotanol 5 mL dan triton X-100 2,5 mL dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.

- B. Pembuatan larutan buffer B (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl<sub>2</sub> 0,01 M)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 3,025 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 62,5 mL
2. Ke dalam 62,5 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 2,925 g dan 0,2775 g CaCl<sub>2</sub> dan dicukupkan volumenya sampai 250 mL dengan akuades.

C. Pembuatan larutan buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl<sub>2</sub> 0,01 M)

Prosedur pembuatan larutan:

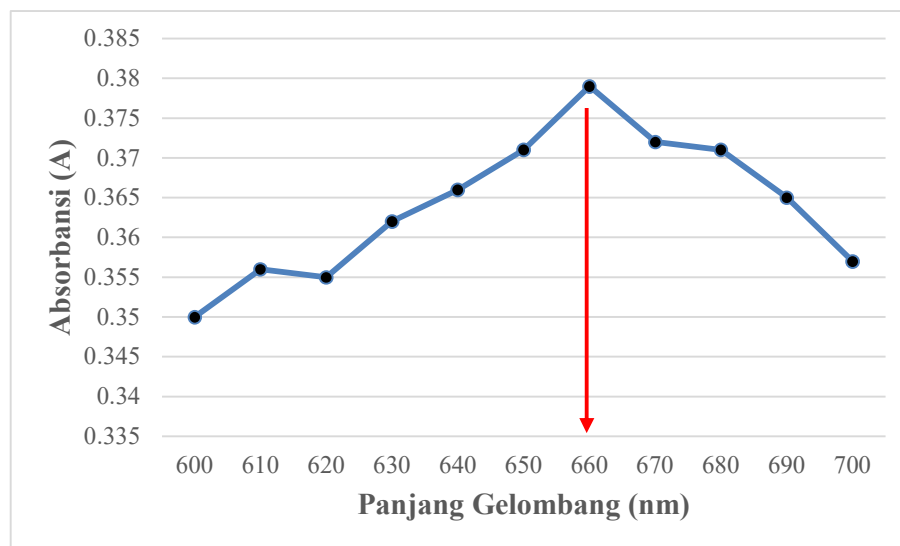
1. Ditimbang 0,605 g Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya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

## Lampiran 12. Penentuan Serapan Maksimum ( $\lambda$ maksimum)

A. Serapan Maksium ( $\lambda$  maksimum) pada Konsentrasi BSA 0,08 mg/mL

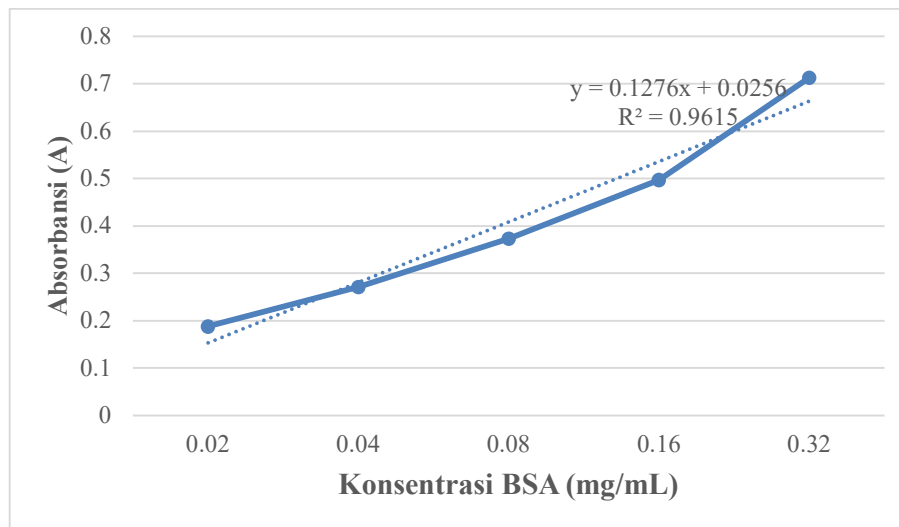
Panjang Gelombang (nm)	Absorban (A)
600	0.350
610	0.356
620	0.355
630	0.362
640	0.366
650	0.371
<b>660</b>	<b>0.379</b>
670	0.372
680	0.371
690	0.365
700	0.357

B. Kurva  $\lambda$  maksimum



**Lampiran 13.** Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* pada  $\lambda$  660 nm

<b>Konsentrasi BSA (mg/mL)</b>	<b>Absorbansi (A)</b>
0	0
0.02	0.188
0.04	0.271
0.08	0.373
0.16	0.497
0.32	0.713



**Lampiran 14.** Data hasil penentuan waktu produksi optimum protein bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* dan nilai *Optical Density*

No	Waktu Fermentasi (jam)	OD	Kadar Protein Ekstraseluler (mg/mL)	Kadar Protein Intraseluler (mg/mL)
1	0	0,554	1,050	1,833
2	6	0,624	1,598	4,106
3	12	0,618	1,991	4,341
4	18	0,614	2,460	3,714
5	24	0,622	3,322	4,733
6	30	0,668	3,166	4,968
<b>7</b>	<b>36</b>	<b>0,714</b>	<b>4,498</b>	<b>6,301</b>
8	42	0,682	3,871	5,595
9	48	0,678	4,106	4,498
10	54	0,672	3,087	3,871
11	60	0,654	1,363	2,931

**Lampiran 15.** Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Ekstraseluler ( $\lambda 660$  nm)

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0.039	1,050
2	6	0.046	1,598
3	12	0.051	1,991
4	18	0.057	2,460
5	24	0.068	3,322
6	30	0.066	3,166
7	<b>36</b>	<b>0.083</b>	<b>4,498</b>
8	42	0.075	3,871
9	48	0.078	4,106
10	54	0.065	3,087
11	60	0.043	1,363

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar  $y = 0,1276x + 0,0256$ , dimana  $y = 0,083$  adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui  $y = 0.083$ , maka:

$$0,083 = 0,1276x + 0,0256$$

$$0,1276x = 0,083 - 0,0256$$

$$0,1276x = 0,0574$$

$$x = 0,4498 \text{ mg/mL}$$

Selanjutnya dikalikan dengan faktor pengenceran ( $F_p = 10$ ), sehingga:

$$x = 0,4498 \text{ mg/mL} \times 10$$

$$= 4,498 \text{ mg/mL}$$

**Lampiran 16.** Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler ( $\lambda 660$  nm)

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0.049	1,833
2	6	0.078	4,106
3	12	0.081	4,341
4	18	0.073	3,714
5	24	0.086	4,733
6	30	0.089	4,968
<b>7</b>	<b>36</b>	<b>0.106</b>	<b>6,301</b>
8	42	0.097	5,595
9	48	0.083	4,498
10	54	0.075	3,871
11	60	0.063	2,931

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar  $y = 0,1276x + 0,0256$ , dimana  $y = 0,106$  adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui  $y = 0,106$ , maka:

$$0,106 = 0,1276x + 0,0256$$

$$0,1276x = 0,106 - 0,0256$$

$$0,1276x = 0,0804$$

$$x = 0,6301 \text{ mg/mL}$$

Selanjutnya dikalikan dengan faktor pengenceran ( $F_p = 10$ ), sehingga:

$$x = 0,6301 \text{ mg/mL} \times 10$$

$$= 6,301 \text{ mg/mL}$$



**Lampiran 17.** Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

Jenis Protein	Fraksi Protein	Bobot Amonium Sulfat (g)
Protein Ekstraseluler	F1	53
	F2	55,935
	F3	57,96
	F4	58,695
Protein Intraseluler	F1	5,3
	F2	4,181
	F3	3,84
	F4	3,87

Penambahan Amonium sulfat:

Protein Ekstraseluler

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

$$F2 = \frac{495 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 26,442 \text{ gram}$$

$$F3 = \frac{483 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ g} = 57,96 \text{ gram}$$

$$F4 = \frac{455 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ g} = 58,695 \text{ gram}$$

Protein Intraseluler

$$F1 = \frac{50 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ g} = 5,3 \text{ gram}$$

$$F2 = \frac{37 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 4,181 \text{ gram}$$

$$F3 = \frac{32 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ g} = 3,84 \text{ gram}$$

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

Lampiran 18. Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat

Konsentrasi awal dari amonium sulfat (% kejenuhan pada 0°C)	% Kejenuhan pada 0°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25	0	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30	0	0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	533
35	0	0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	498	543
40	0	0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	463	506	551
45	0	0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	425	468	511	554
50	0	0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	389	431	474	517	560
55	0	0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	354	395	437	480	523	566
60	0	0	31	62	95	129	164	201	239	279	320	361	402	444	487	530	573
65	0	0	31	63	97	132	168	205	244	284	325	366	407	449	492	535	578
70	0	0	32	65	99	134	171	209	249	289	330	371	412	454	497	540	583
75	0	0	32	66	101	137	174	214	254	294	335	376	417	459	502	545	588
80	0	0	33	67	103	139	177	217	257	297	338	379	420	462	505	548	591
85	0	0	34	68	105	141	179	219	260	300	341	382	423	465	508	551	594
90	0	0	34	68	105	141	179	219	260	300	341	382	423	465	508	551	594

**Lampiran 19.** Pengukuran Kadar pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein

Jenis Protein	Fraksi Protein	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)	Faktor Pengenceran	Kadar Protein Sebenarnya (mg/mL)
Protein Ekstraseluler	F1	0.052	0.2068	10	2.0689
	F2	0.033	0.0579	10	0.5799
	F3	0.031	0.0423	10	0.4231
	F4	0.061	0.2774	10	2.7742
Protein Intraseluler	F1	0.089	0.4968	10	4.9686
	F2	0.272	1.9310	-	1.9310
	F3	0.522	3.8902	-	3.8902
	F4	0.456	3.3730	-	3.3730

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar  $y = 0,1276x + 0,0256$ , dimana  $y$  adalah absorbansi. Maka data pada tabel di atas diperoleh dengan cara:

**Protein Ekstraseluler**

$$X_1 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.052 - 0.0256}{0.1276} = 0.2068 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.033 - 0.0256}{0.1276} = 0.0579 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.031 - 0.0256}{0.1276} = 0.0423 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.061 - 0.0256}{0.1276} = 0.2774 \text{ mg/mL}$$

**Protein Intraseluler**

$$X_1 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.089 - 0.0256}{0.1276} = 0.4968 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.272 - 0.0256}{0.1276} = 1.9310 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.522 - 0.0256}{0.1276} = 3.8902 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0.0256}{0.1276} = \frac{0.456 - 0.0256}{0.1276} = 3.3730 \text{ mg/mL}$$

**Lampiran 20.** Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

Jenis Protein	Fraksi Protein	Volume Setiap Fraksi (mL)	Kadar Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)
Protein Ekstraseluler	F1	10	2.0689	20,689
	F2	13	0.5799	7,538
	F3	10	0.4231	4,231
	F4	13	<b>2.7742</b>	36,065
Protein Intraseluler	F1	7	<b>4.9686</b>	34,780
	F2	5	1.9310	9,655
	F3	6	3.8902	23,341
	F4	6	3.3730	20,238

Penentuan total Protein dengan rumus:

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

Protein Ekstraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 10 \text{ mL} \times 2,0689 \text{ mg/mL} = 20,689 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 13 \text{ mL} \times 0,5799 \text{ mg/mL} = 7,538 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 10 \text{ mL} \times 0,4231 \text{ mg/mL} = 4,231 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 13 \text{ mL} \times 2,7742 \text{ mg/mL} = 36,065 \text{ mg}$$

Protein Intraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 7 \text{ mL} \times 4,9686 \text{ mg/mL} = 34,780 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 5 \text{ mL} \times 1,9310 \text{ mg/mL} = 9,655 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 6 \text{ mL} \times 3,8902 \text{ mg/mL} = 23,341 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 6 \text{ mL} \times 3,3730 \text{ mg/mL} = 20,238 \text{ mg}$$

## Lampiran 21. Hidrolisis Protein

### 1. Fraksi 60-80 % (F4) Ekstraseluler

Waktu hidrolisis (jam)	Protein Terlarut (mg/mL)		Protein Total (mg/mL)		DH (%)
	Absorban	Kadar Protein	Absorban	Kadar Protein	
0	0.528	3.9373	1.230	9.4388	41.71
0,5	0.564	4.2194	1.280	9.8307	42.92
1	0.615	4.6191	1.460	11.2413	41.09
2	0.63	4.7366	1.420	10.9278	43.34
3	0.715	5.4028	1.560	12.0250	44.92
4	0.885	6.7351	1.720	13.2789	<b>50.72</b>
5	0.745	5.6379	1.620	12.4952	45.12
6	0.675	5.0893	1.480	11.3981	44.65

### 2. Fraksi 0-20 % (F1) Intraseluler

Waktu hidrolisis (jam)	Protein Terlarut (mg/mL)		Protein Total (mg/mL)		DH (%)
	Absorban	Kadar Protein	Absorban	Kadar Protein	
0	0.412	3.0282	0.795	6.0297	50.22
0,5	0.446	3.2946	0.855	6.5	50.68
1	0.474	3.5141	0.88	6.6959	52.48
2	0.492	3.6551	0.865	6.5783	55.56
3	0.534	3.9843	0.965	7.3620	54.11
4	0.612	4.5956	1.025	7.8322	<b>58.67</b>
5	0.574	4.2978	0.985	7.5188	57.16
6	0.546	4.0783	0.945	7.2053	56.60

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

**Lampiran 22. Harga Probit Sesuai dengan Persentasenya**

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

**Lampiran 23.** Hasil Perhitungan LC<sub>50</sub> Larva Udang *Artemia salina* L. pada setiap Fraksi Protein Bakteri *Enterobacter* sp. PA 8(3)

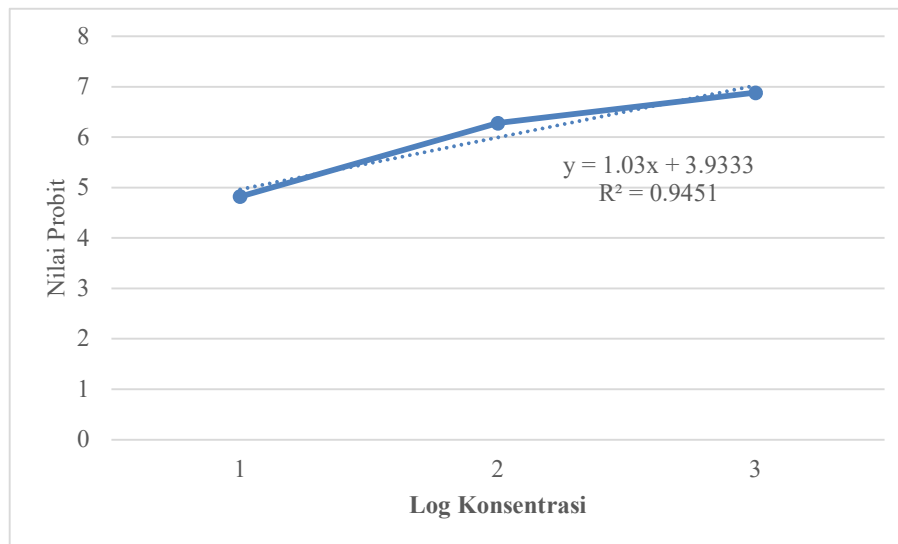
<b>Jenis Protein</b>	<b>Fraksi Protein</b>	<b>Nilai LC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>Toksisitas</b>
Protein Ekstraseluler	Ekstrak Kasar	11,660	Sangat Toksik
	F1	603,671	Toksik
	F2	107,103	Toksik
	F3	68,675	Toksik
	F4	49,980	Toksik
Protein Intraseluler	Ekstrak Kasar	1,0493	Sangat Toksik
	F1	56,859	Toksik
	F2	129,032	Toksik
	F3	90,887	Toksik
	F4	70,957	Toksik
Hidrolisat Protein	FH1	434,410	Toksik
	FH2	1127,197	Tidak Toksik

**Lampiran 24. Data Toksisitas Fraksi Protein Ekstraseluler**

1. Ekstrak kasar (Supernatan)

Fraksi protein	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	1	10	100
Ekstrak Kasar	5	10	10
	5	9	10
	4	9	10
Jumlah	14	28	30
% Kematian	43,33 %	90%	96,67%

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	43,33	4,82
10	1	90	6,28
100	2	96,67	6,88



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

$$y = 1,03x + 3,9333$$

$$5 = 1,03x + 3,9333$$

$$X = 1,0667$$

$$\text{Jadi, log } X = 1,0667$$

$$X = \text{antilog } 1,0667$$

$$= 11,660 \mu\text{g/mL}$$

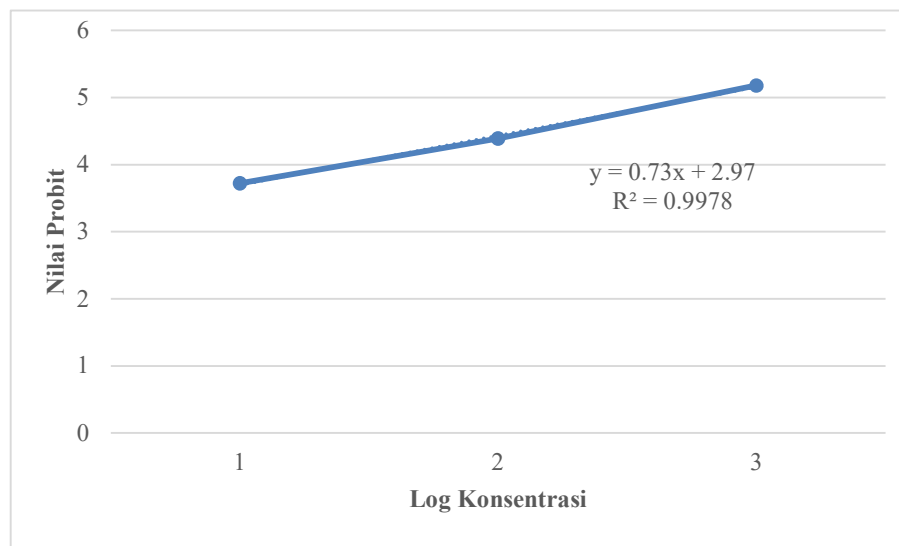
$LC_{50}$  ekstrak kasar (ekstraseluler) adalah 11,660  $\mu\text{g/mL}$ .



2. F1 (Fraksi 0-20%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
0-20%	1	3	7
	1	2	5
	2	4	6
Jumlah	4	9	18
% Kematian	10%	26,67%	56,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	10	3,72
10	1	26,67	4,39
100	2	56,67	5,18



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

$$y = 0,73x + 2,97$$

$$5 = 0,73x + 2,97$$

$$X = 2,7808$$

Jadi,  $\log X = 2,7808$

$$X = \text{antilog } 2,7808$$

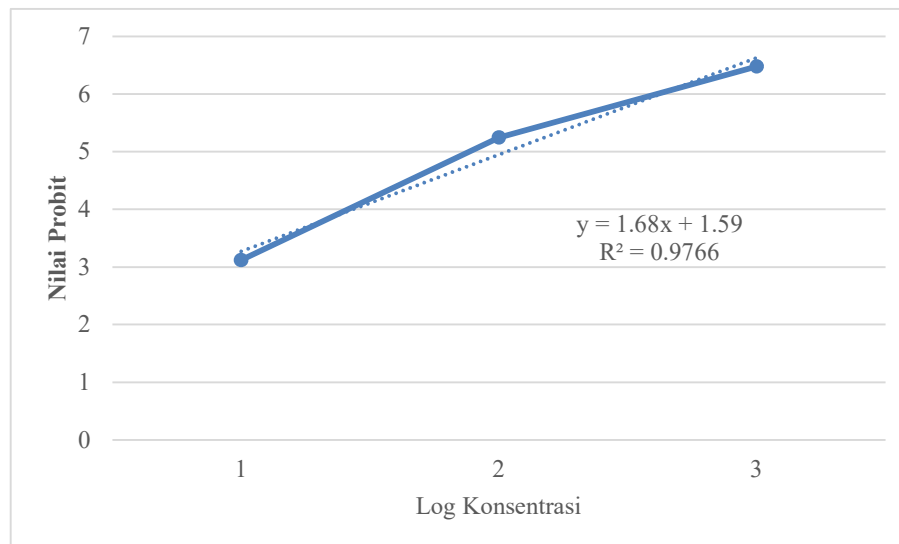
$$= 603,671 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi 0-20% adalah 603,671 µg/mL

3. F2 (Fraksi 20-40%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
20-40%	1	7	10
	0	5	9
	1	7	10
Jumlah	2	19	29
% Kematian	3,33%	60%	93,33%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	60	5,25
100	2	93,33	6,48



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

$$y = 1,68x + 1,59$$

$$5 = 1,68x + 1,59$$

$$X = 2,0298$$

$$\text{Jadi, } \log X = 2,0298$$

$$X = \text{antilog } 2,0298$$

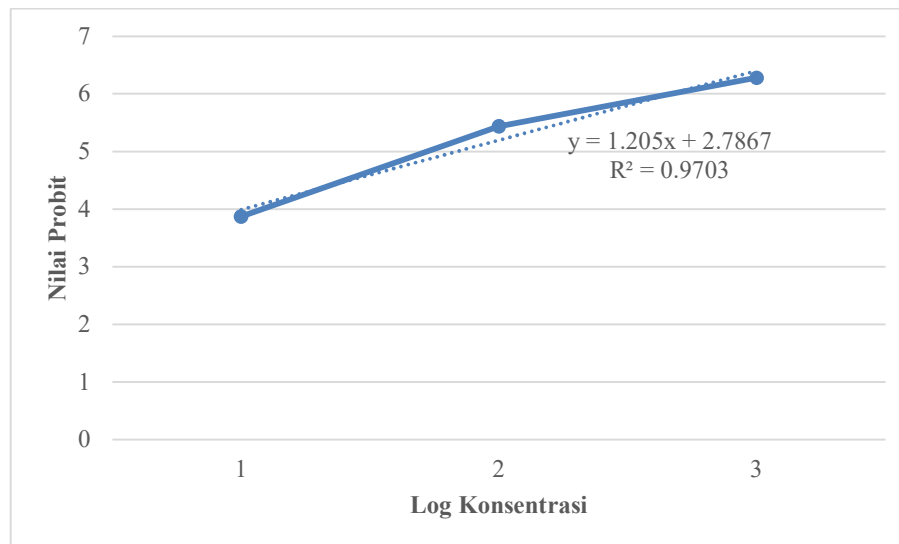
$$= 107,103 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi 20-40% adalah 107,103 µg/mL

4. F3 (Fraksi 40-60%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
40-60%	2	6	9
	2	8	9
	1	7	10
Jumlah	5	21	28
% Kematian	13,33%	66,67%	90%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	13,33	3,87
10	1	66,67	5,44
100	2	90	6,28



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

$$y = 1,205x + 2,7867$$

$$5 = 1,205x + 2,7867$$

$$X = 1,8368$$

Jadi,  $\log X = 1,8368$

$$X = \text{antilog } 1,8368$$

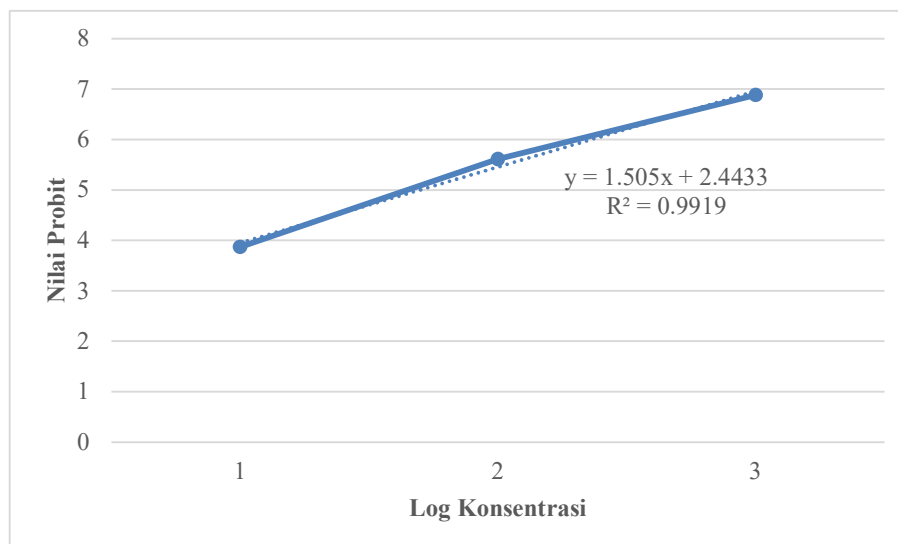
$$= 68,675 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi 40-60% adalah 68,675 µg/mL.

5. F4 (Fraksi 60-80%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
60-80%	2	8	10
	2	7	10
	1	8	10
Jumlah	5	23	30
% Kematian	13,33%	73,33%	96,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	13,33	3,87
10	1	73,33	5,61
100	2	96,67	6,88



Untuk  $LC_{50}$ , nilai probit adalah 5, dimasukan ke persamaan regresi

$$y = 1,505x + 2,4433$$

$$5 = 1,505x + 2,4433$$

$$X = 1,6988$$

Jadi,  $\log X = 1,6988$

$$X = \text{antilog } 1,6988$$

$$= 49,980 \mu\text{g/mL}$$

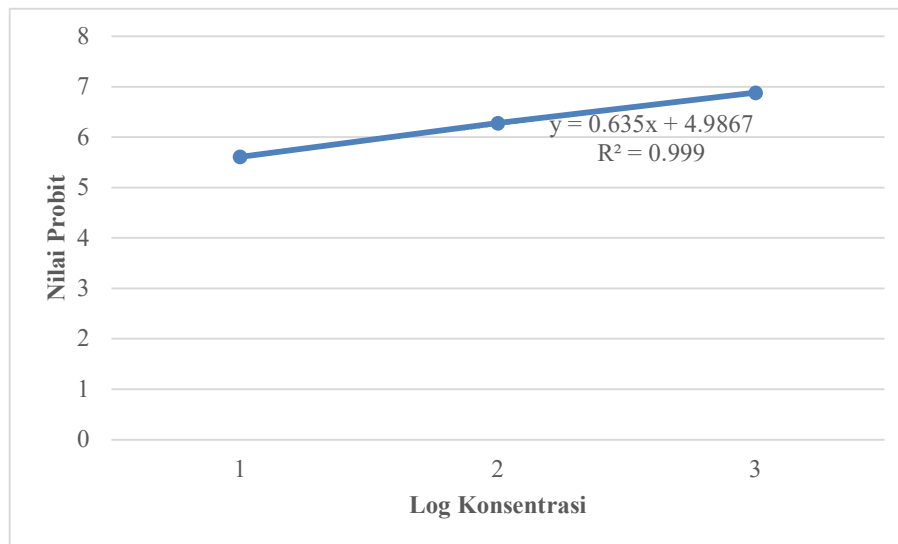
$LC_{50}$  Fraksi 60-80% adalah 49,980 µg/mL.

**Lampiran 25. Data Toksisitas Fraksi Protein Intraseluler**

1. Ekstrak kasar (Supernatan)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
Ekstrak Kasar	8	10	10
	8	9	10
	7	9	10
Jumlah	23	28	30
% Kematian	73,33 %	90%	96,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	73,33	5,61
10	1	90	6,28
100	2	96,67	6,88



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

$$y = 0,635x + 4,9867$$

$$5 = 0,635x + 4,9867$$

$$X = 0,0209$$

$$\text{Jadi, log } X = 0,0209$$

$$X = \text{antilog } 0,0209$$

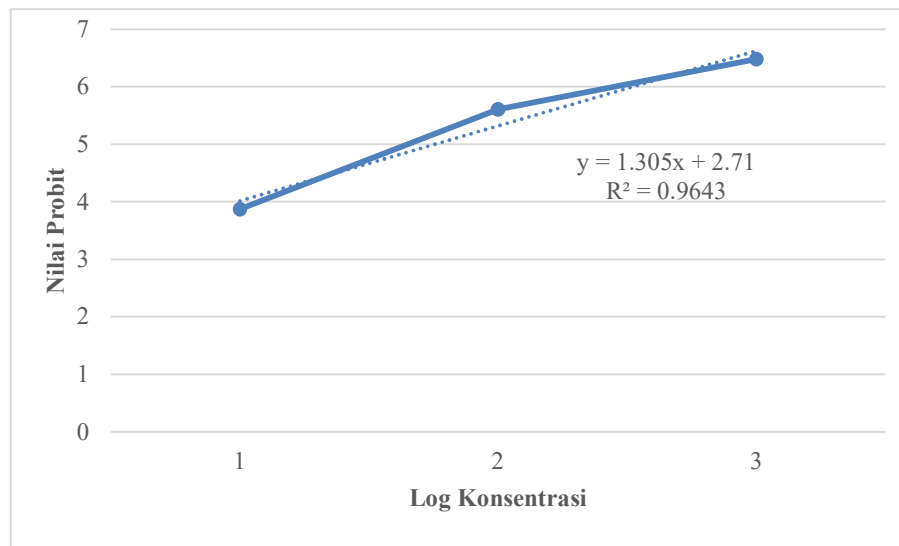
$$= 1,0493 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  ekstrak kasar (intraseluler) adalah 1,0493 µg/mL.

2. F1 (Fraksi 0-20%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
0-20%	2	6	9
	1	8	10
	2	9	10
Jumlah	5	23	29
% Kematian	13,33%	73,33%	93,33%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	13,33	3,87
10	1	73,33	5,61
100	2	93,33	6,48



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

$$y = 1,305x + 2,71$$

$$5 = 1,305x + 2,71$$

$$X = 1,7548$$

$$\text{Jadi, log } X = 1,7548$$

$$X = \text{antilog } 1,7548$$

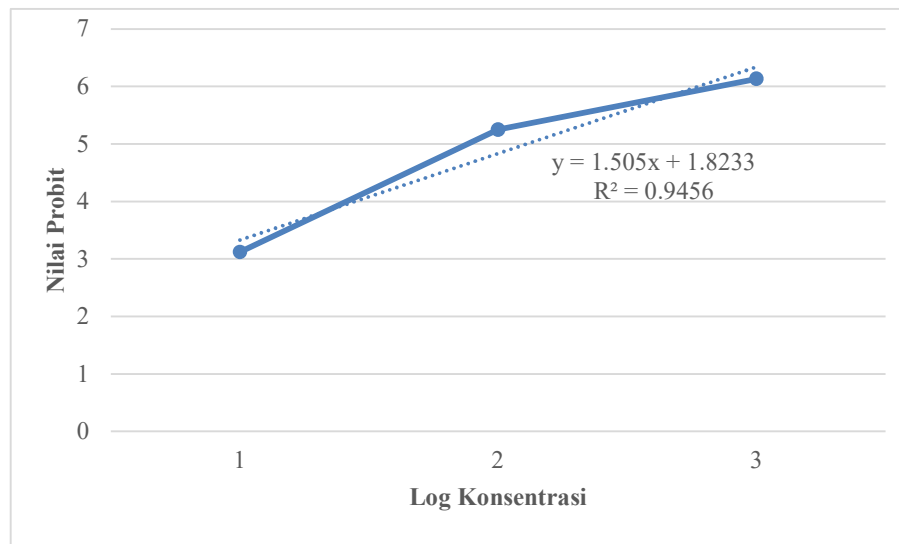
$$= 56,859 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi 0-20% adalah 56,859 µg/mL.

3. F2 (Fraksi 20-40%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
20-40%	1	7	10
	1	6	9
	0	6	10
Jumlah	2	19	27
% Kematian	3,33%	60%	86,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	60	5,25
100	2	86,67	6,13



Untuk  $LC_{50}$ , nilai probit adalah 5, dimasukan ke persamaan regresi

$$y = 1,505x + 1,8233$$

$$5 = 1,505x + 1,8233$$

$$X = 2,1107$$

$$\text{Jadi, } \log X = 2,1107$$

$$X = \text{antilog } 2,1107$$

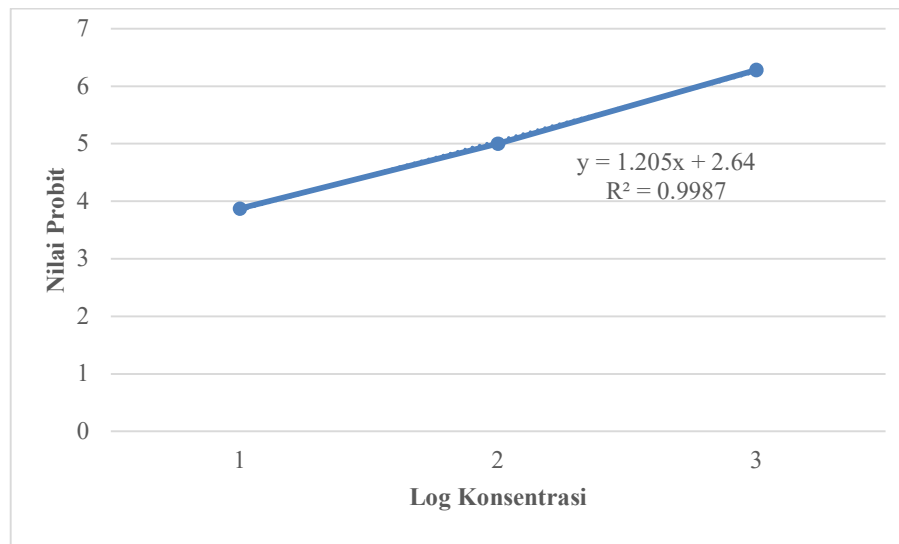
$$= 129,032 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi 20-40% adalah 129,032 µg/mL.

4. F3 (Fraksi 40-60%)

Fraksi protein	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	1	10	100
40-60%	1	4	9
	2	7	9
	2	5	10
Jumlah	5	16	28
% Kematian	13,33%	50%	90%

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	13,33	3,87
10	1	50	5,00
100	2	90	6,28



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

$$y = 1,205x + 2,64$$

$$5 = 1,205x + 2,64$$

$$X = 1,9585$$

Jadi,  $\log X = 1,9585$

$$X = \text{antilog } 1,9585$$

$$= 90,887 \mu\text{g/mL}$$

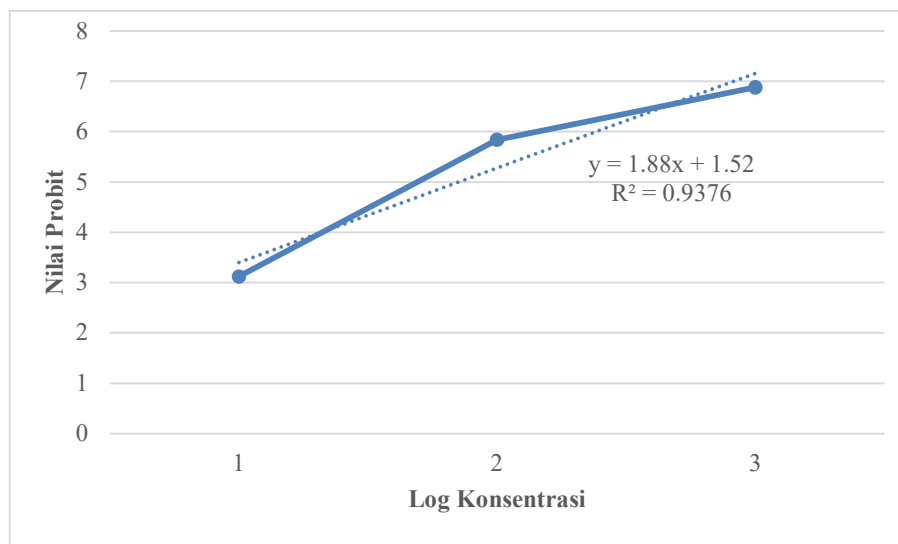
$LC_{50}$  Fraksi 40-60% adalah  $90,887 \mu\text{g/mL}$ .



5. F4 (Fraksi 60-80%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
60-80%	1	8	10
	1	9	10
	0	8	10
Jumlah	2	25	30
% Kematian	3,33%	80%	96,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	80	5,84
100	2	96,67	6,88



Untuk  $LC_{50}$ , nilai probit adalah 5, dimasukan ke persamaan regresi

$$y = 1,88x + 1,52$$

$$5 = 1,88x + 1,52$$

$$X = 1,8510$$

Jadi,  $\log X = 1,8510$

$$X = \text{antilog } 1,8510$$

$$= 70,957 \mu\text{g/mL}$$

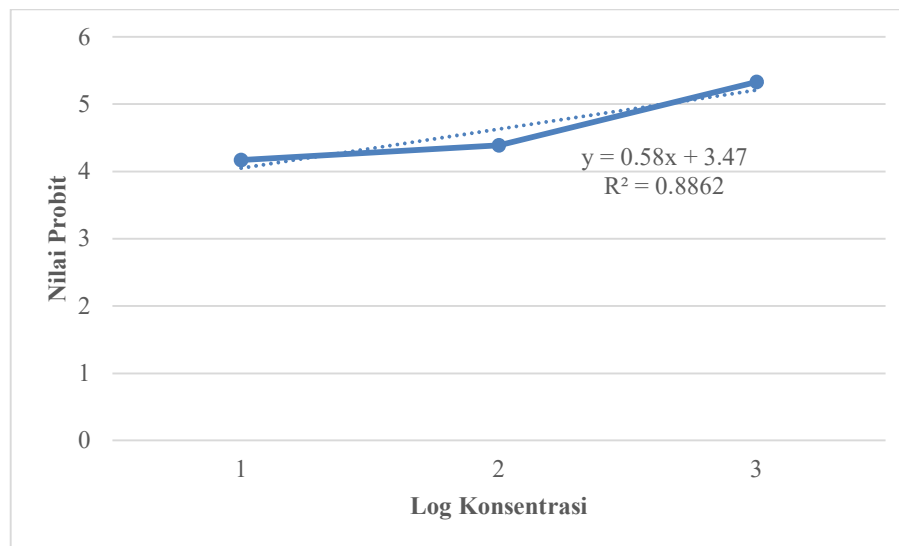
$LC_{50}$  Fraksi 60-80% adalah 70,957 µg/mL.

**Lampiran 26. Data Toksisitas Fraksi Hidrolisat Protein**

1. FH1 (Hidrolisat Ekstraseluler, 4 jam)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
FH1	2	4	5
Hidrolisat Ekstrasel	2	2	8
	3	3	7
Jumlah	7	9	20
% Kematian	20%	26,67%	63,33%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	20	4,17
10	1	26,67	4,39
100	2	63,33	5,33



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

$$y = 0,58x + 3,47$$

$$5 = 0,58x + 3,47$$

$$X = 2,6379$$

Jadi,  $\log X = 2,6379$

$$X = \text{antilog } 2,6379$$

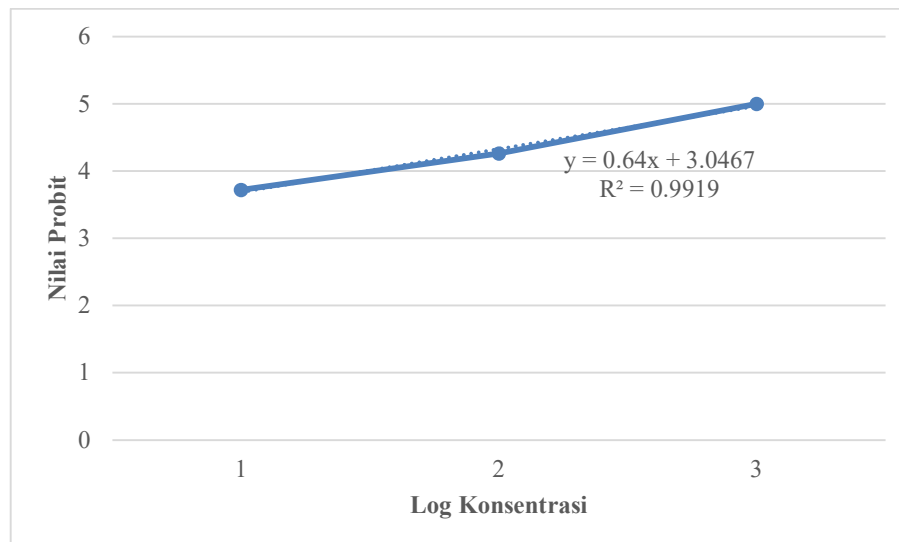
$$= 434,410 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi FH1 (Hidrolisat Ekstraseluler) adalah 434,410 µg/mL.

2. FH2 (Hidrolisat Intraseluler, 4 jam)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
FH2	2	3	6
Hidrolisat Intrasel	1	2	5
	1	3	5
Jumlah	4	8	16
% Kematian	10%	23,33%	50%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Nilai Probit (Y)
1	0	10	3,72
10	1	23,33	4,26
100	2	50	5



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

$$y = 0,64x + 3,0467$$

$$5 = 0,64x + 3,0467$$

$$X = 3,0520$$

Jadi,  $\log X = 3,0520$

$$X = \text{antilog } 3,0520$$

$$= 1127,197 \mu\text{g/mL}$$

$LC_{50}$  Fraksi FH2 (Hidrolisat Intraseluler) adalah 1127,197 µg/mL.

## Lampiran 27. Isolat Bakteri



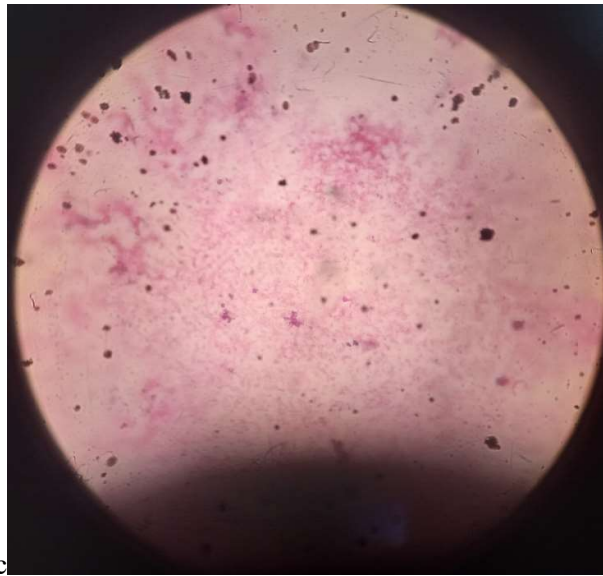
Endofit

Keterangan kode isolat:

PA 8 : isolat spons *Petrosia alfiani* pada pengenceran  $10^{-8}$

\*Isolat di atas dipilih berdasarkan kestabilan zona bening setelah inkubasi 2 x 24 jam dan digores kuadran beberapa kali hingga diperoleh isolat murni.

**Lampiran 28.** Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana



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



Uji TSIA, SIM, MR-VP, sitrat, Urea, dan uji gula-gula

**Lampiran 29.** Klasifikasi Sampel Spons *Petrosia alfiani*

Klasifikasi spesies spons menurut de Voogd dan Van Soest (2002) yang menjadi objek penelitian ini adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Porifera
Class	: Demospongiae
Subclass	: Heteroscleromorpha
Order	: Haplosclerida
Suborder	: Petrosina
Family	: Petrosidae
Genus	: <i>Petrosia</i>
Specific name	: <i>alfiani</i>
Scientific name	: <i>Petrosia alfiani</i>

**Lampiran 30.** Klasifikasi Bakteri *Enterobacter* sp. PA 8(3)

Kingdom : Bacteria  
Phylum : Proteobacteria  
Class : Gammaproteobacteria  
Order : Enterobacteriales  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : *Enterobacter*  
Species : *Enterobacter* sp.

**Lampiran 31. Dokumentasi**



Pengambilan Sampel



Pembuatan Media



Pembuatan Buffer



Proses lisis sel



Inkubasi bakteri



Isolasi Bakteri





Produksi bakteri penghasil protein bioaktif



Proses sonikasi



Alat sentrifugasi



Hasil sentrifugasi (fraksinasi)



Proses dialisis



Fraksi protein (dialisat)



Hidrolisis Enzimatik



Hidrolisat Protein



Pengukuran Kadar Protein



Uji toksisitas BSLT