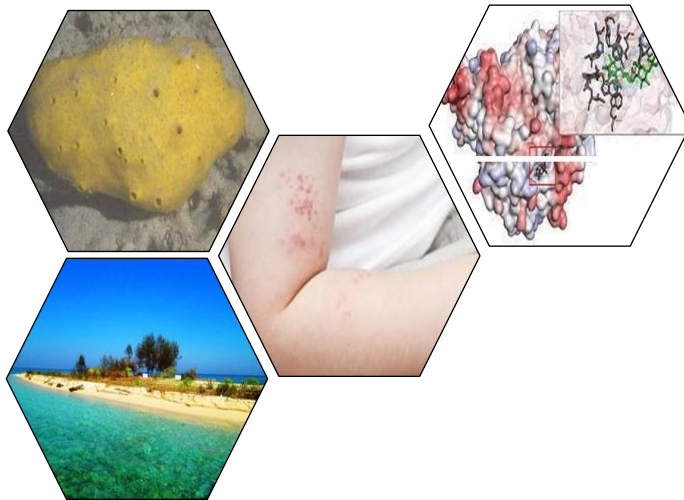


**UJI AKTIVITAS PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI
BAKTERI SIMBION SPONS *Petrosia alfiani* SEBAGAI
ANTIMIKROBA**



MOHAMMAD NURSALIM

H031 17 1004



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

2024

**UJI AKTIVITAS PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI
SIMBION SPONS *Petrosia alfiani* SEBAGAI ANTIMIKROBA**

MOHAMMAD NURSALIM

H031 17 1004



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**UJI AKTIVITAS PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI
SIMBION SPONS *Petrosia alfiani* SEBAGAI ANTIMIKROBA**

MOHAMMAD NURSALIM

H031171004

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Kimia

pada

**PROGRAM STUDI KIMIA
DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI BAKTERI
SIMBION SPONS *Petrosia alfiani* SEBAGAI ANTIMIKROBAMOHAMMAD NURSALIM

H031171004

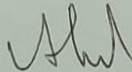
Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Pada tanggal 3 Juli 2024 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi S1
Departemen Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

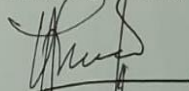
Mengesahkan:

Pembimbing utama,



Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D
NIP. 19671231 199103 1 020

Pembimbing Pertama,



Dr. Seriwati Dali, M. Si
NIP. 19581231 198803 2 003

Mengetahui:

Ketua Program Studi,



Dr. St. Fauziah, M. Si
NIP. 19720202 199903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Uji Aktivitas Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Symbion Spons *Petrosia Alfiani* sebagai Antimikroba" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Seniwati Dali, M.Si sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin

Makassar, 28 Juni 2024



Mohammad Nursalim
Mohammad Nursalim
H031 17 1004

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim ...

Alhamdulillah. Segala puji bagi Allah 'Azza wa Jalla yang telah memberikan pertolongan pada setiap urusan hamba Nya. Hanya atas rahmah dan hidayah Nya penelitian ini yang berjudul "**Uji Aktivitas Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Simbion Spons *Petrosia Alfiani* sebagai Antimikroba**" dapat terselesaikan dengan baik dalam bimbingan **Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D** dan **Dr. Seniwati Dali, M.Si** sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains (S.Si). Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak dan Ibu Dosen Pembimbing atas kesempatan dan bantuan yang diberikan selama ini. Semoga Allah membalas keduanya dengan kebaikan yang banyak. Penulis menyadari bahwa sejak awal perkuliahan sampai penyusunan tugas akhir ini tidak luput dari motivasi dan dukungan dari banyak pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. St. Fauziah, M.Si selaku Ketua Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah memberikan motivasi yang sangat berarti bagi penulis untuk tetap yakin dalam menyelesaikan penelitian ini.
2. Ibu Dr. Nur Umrani Permatasari, S.Si., M.Si selaku sekertaris Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang selalu ada dan memberikan ruang untuk bertanya bagi penulis.
3. Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc dan Dr. St. Fauziah, M.Si selaku dosen penguji yang memberikan motivasi dan kemudahan bagi penulis.
4. Seluruh dosen dan staf Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
5. Kedua orang tua tercinta Bapak Samsudin Bin Dado dan Mama Mini serta keluarga yang menjadi tempat untuk pulang dan senantiasa mendukung penulis menjadi lebih baik dalam segala hal.
6. Esse, yang selalu menemani dan membantu disetiap waktunya. Fadli sebagai teman panel yang baik. Teman Biokimia, Fatam, Syam, Yura, Moel, Yuyun, Aidul, Farda, Ahmad, Wiwi. Teman seperjuangan Ana, Wini, Besse, Abbas, Uya
7. Teman-teman Kimia 2017 dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan.
8. Adek Biokimia yang banyak membantu, Feni, Esry, Ijul, Fatima. Kakak Biokimia Kak Nure dan Kak Anti.

Penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis membutuhkan saran dan kritik yang membangun dari berbagai pihak. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat yang luas.

Penulis

Mohammad Nursalim

ABSTRAK

Mohammad Nursalim. **Uji Aktivitas Protein dan Peptida Bioaktif dari Bakteri Symbion Spons *Petrosia Alfiani* sebagai Antimikroba** (dibimbing oleh Ahyar Ahmad dan Seniwati Dali)

Latar belakang. Spons salah satu biota laut penghasil senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antimikroba. Bakteri yang bersimbiosis dengan spons kemungkinan besar menghasilkan zat bioaktif yang sama dengan inangnya. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbiosis penghasil protein bioaktif dari spons *Petrosia alfiani* yang berpotensi sebagai antimikroba yang teridentifikasi sebagai. **Metode.** Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi protein ekstraseluler dan intraseluler menggunakan metode fraksinasi amonium sulfat pada tingkat kejenuhan 0-20 %, 20-40 %, 40-60 % dan 60-80 %. Pemurnian protein dilakukan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan. Dilanjutkan dengan hidrolisis enzimatis. Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar menggunakan paper disc. **Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan bahwa, semua fraksi protein dan hidrolisat protein dari bakteri *Enterobacter hafniae* PA 8(3) simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang diisolasi menunjukkan adanya senyawa protein dan peptida bioaktif yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri terbesar terdapat pada hidrolisat fraksi F1 protein intraseluler dengan daya hambat sebesar 18,6 mm terhadap bakteri *E. coli* dan daya hambat sebesar 19,2 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan dikategorikan kuat. Adapun aktivitas antifungi didapatkan hidrolisat protein intraseluler F1 memiliki kemampuan yang lebih kuat menghambat pertumbuhan jamur dibandingkan dengan protein ekstraseluler F3 dengan diameter daya hambat sebesar 10,07 mm pada jamur uji *C. albicans* dan daya hambat sebesar 16,47 mm pada jamur uji *T. rubrum*. **Kesimpulan.** Isolat bakteri simbiosis Spons *Petrosia alfiani* yang dapat menghasilkan protein bioaktif teridentifikasi sebagai *Enterobacter hafniae*.

Kata kunci: Antimikroba; *Enterobacter hafniae*; Protein bioaktif; Spons

ABSTRACT

Mohammad Nursalim. **Activity Test of Bioactive Proteins and Peptides from Petrosia Alfiani Sponge Symbiont Bacteria as Antimicrobials** (supervised by Ahyar Ahmad and Seniwati Dali).

Background. Sponges are one of the marine biota that produce active compounds that can be used as antimicrobials. Bacteria in symbiosis with sponges most likely produce the same bioactive substances as their hosts. **Purpose.** This research aims to isolate and identify symbiotic bacteria that produce bioactive proteins from the sponge *Petrosia alfiani* which have the potential to act as antimicrobials. **Method.** This research was carried out by isolating extracellular and intracellular proteins using the ammonium sulfate fractionation method at saturation levels of 0-20%, 20-40%, 40-60% and 60-80%. Protein purification is carried out by dialysis using a cellophane bag. Followed by enzymatic hydrolysis. Test antimicrobial activity using the agar diffusion method using paper discs. **Results.** The research results showed that all protein fractions and protein hydrolysates from the *Enterobacter hafniae* PA 8(3) symbiont of the sponge *Petrosia alfiani* that were isolated showed the presence of bioactive protein and peptide compounds which had inhibitory power against the growth of the pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The greatest antibacterial activity was found in the intracellular protein F1 fraction hydrolyzate with an inhibitory power of 18.6 mm against *E. coli* bacteria and an inhibitory power of 19.2 mm against *S. aureus* bacteria and was categorized as strong. As for antifungal activity, it was found that the F1 intracellular protein hydrolyzate had a stronger ability to inhibit fungal growth compared to the F3 extracellular protein with an inhibitory diameter of 10.07 mm in the test fungus *C. albicans* and an inhibitory power of 16.47 mm in the test fungus *T. rubrum*. **Conclusion.** The isolate of the sponge *Petrosia alfiani* symbiont bacteria which can produce bioactive proteins was identified as *Enterobacter hafniae*.

Key words: Antimicrobial; *Enterobacter hafniae*; Bioactive proteins; Sponge.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGANTAR	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	8
1.3. Tujuan dan Manfaat	8
BAB II. METODE PENELITIAN	9
2.1 Bahan Penelitian	9
2.2 Alat Penelitian	9
2.3 Waktu dan Tempat Penelitian	9
2.4 Prosedur Penelitian	9
2.4.1 Preparasi Sampel	9
2.4.2 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i>	9

2.4.3 Pembuatan Media Inokulum	10
2.4.4 Pembuatan Media Produksi	10
2.4.5 Penyegaran Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i>	10
2.4.6 Bagian Permukaan Spons <i>Petrosia alfiani</i>	10
2.4.7 Bagian Dalam Spons <i>Petrosia alfiani</i>	10
2.4.8 Isolasi Bakteri Simbion.....	10
2.4.9 Identifikasi Isolat Bakteri Simbion	11
2.4.10 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri	11
2.4.11 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri Simbion	11
2.4.12 Fraksinasi Amonium Sulfat	12
2.4.13 Dialisis	12
2.4.14 Penentuan Kadar Protein.....	12
2.4.15 Hidrolisis Enzimatik Protein	13
2.4.16 Penentuan Derajat Hidrolisis	13
2.4.17 Uji Aktivitas Antimikroba sebagai Antibakteri	14
2.4.18 Uji Aktivitas Antimikroba sebagai Antibakteri	14
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
3.1 Isolasi Bakteri Simbion Spons <i>Petrosia alfian</i>	16
3.2 Identifikasi Isolat Bakteri Simbion PA 8(3)	17
3.3 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri	18
3.4 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif	20
3.5 Pemurnian Protein Bioaktif.....	20
3.6 Hidrolisis Enzimatis	21
3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Protein <i>E. hafniae</i> PA 8(3).....	23
3.8 Uji Aktivitas Antifungi Protein <i>E. hafniae</i> PA 8(3)	25

BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	28
4.1 Kesimpulan	28
4.2 Saran	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN	35

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons.....	4
2. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur	6
3. Hasil identifikasi isolat bakteri simbiosis PA 8(3).....	17
4. Distribusi kadar protein ekstraseluler dan intraseluler dari masing-masing fraksi dialisis pada beberapa tingkat kejenuhan amonium sulfat	21
5. Diameter hambatan rata-rata dari fraksi protein dan hidrolisat protein ekstraseluler dan intraseluler bakteri <i>E. hafniae</i> sebagai antibakteri PA 8(3)	23
6. Diameter hambatan rata-rata dari fraksi protein dan hidrolisat protein ekstraseluler dan intraseluler bakteri <i>E. hafniae</i> PA 8(3) sebagai antifungi	26

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Morfologi dari spons <i>Petrosia alfiani</i>	3
2. <i>Escherichia coli</i>	6
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
4. <i>Candida albicans</i>	7
5. <i>Trichophyton rubrum</i>	8
6. Isolat bakteri PA 8(3)	16
7. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein ekstraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>E. hafniae</i> PA 8(3).....	19
8. Pengaruh waktu fermentasi terhadap produksi protein intraseluler dan pertumbuhan bakteri <i>E. hafniae</i> PA 8(3).....	19
9. Persentase derajat hidrolisis hidrolisat protein bakteri <i>E. hafniae</i> PA 8(3) dari fraksi F3 (ekstra) dan F1 (intra)	22

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Urut	Halaman
1. Diagram Alir.....	35
2. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media <i>Nutrient Broth</i>	36
3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri.....	37
4. Penentuan Waktu Produksi Optimum.....	39
5. Bagan Kerja Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif.....	40
6. Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat.....	41
7. Bagan Kerja Dialisis.....	42
8. Prosedur Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	43
9. Bagan Kerja Hidrolisis Enzimatis Protein.....	44
10. Uji Aktivitas Antibakteri.....	45
11. Uji Aktivitas Antifungi.....	46
12. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry.....	47
13. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl.....	48
14. Penentuan Serapan Maksimum (λ maksimum).....	49
15. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> pada λ 660 nm.....	50
16. Data hasil penentuan waktu produksi optimum protein bioaktif dari bakteri simbiosis <i>Petrosia alfiani</i> dan nilai <i>Optical Density</i>	51
17. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Ekstraseluler (λ 660 nm).....	52
18. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler (λ 660 nm).....	53
19. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.....	54
20. Tabel Kejenuhan Amonium Sulfat.....	55
21. Pengukuran Kadar pada Setiap Tahap Pemurnian Fraksi Protein.....	56

22. Penentuan Total Protein pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan	57
23. Hidrolisis Protein.....	58
24. Isolat Bakteri.....	59
25. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana	60
26. Klasifikasi Sampel Spons <i>Petrosia alfiani</i> dan bakteri <i>E. hafniae</i> PA 8(3)	61
27. Uji Antibakteri Fraksi Protein <i>E. hafniae</i> PA 8(3)	62
28. Uji Antibakteri Hidrolisat Protein <i>E. hafniae</i> PA 8(3)	63
29. Uji Antifungi Fraksi Protein dan Hidrolisat Protein <i>E. hafniae</i> PA 8(3).....	64
30. Dokumentasi	66

DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
BSA	Bovine Serum Albumin
NA	<i>Nutrient Agar</i>
NB	<i>Nutrient Broth</i>
mg/mL	milligram per milliliter
mM	milimolar
nm	nanometer
OD	<i>Optical density</i>
pH	Tingkat keasaman
rpm	Rotasi per menit
t	ton
μ L	mikroliter
λ	Panjang gelombang

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut untuk pencarian senyawa bioaktif yang baru, salah satunya adalah spons. Penelitian yang telah dilakukan terhadap spons menghasilkan senyawa-senyawa baru dengan struktur yang unik dan memiliki aktivitas farmakologis (Astuti dkk., 2005). Spons dilaporkan memiliki aktivitas antikanker, antimikroba, dan antiparasit (Dahuri, 1998). Spons *Petrosia alfiani* adalah spesies yang baru ditemukan dan endemik di kawasan perairan spermonde, diduga spons ini mengandung banyak metabolit sekunder yang berguna dan memungkinkan ditemukannya metabolit sekunder yang baru (Aminah dkk., 2014).

Salah satu contoh metabolit sekunder yang telah diekstraksi dan diisolasi pada spons *Petrosia alfiani* adalah senyawa β -sitosterol yang aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* (Rahman, 2014). Saat ini penelitian tidak hanya terfokus pada spons, tetapi juga pada bakteri simbiosis spons. Penggunaan bakteri simbiosis dapat menjadi salah satu solusi agar tidak terjadi eksploitasi secara berlebihan pada pemanfaatan spons. Menurut Yulianti dkk (2012), eksplorasi senyawa bioaktif dari bakteri simbiosis lebih disukai karena beberapa kelebihan diantaranya bakteri mudah diisolasi dan dikultur dalam skala laboratorium, waktu pertumbuhan yang cepat dan dengan biaya yang lebih murah. Genus *Petrosia* adalah salah satu kelompok spons yang memiliki beragam senyawa bioaktif, antara lain asam kortikostat sebagai antifungi dari spons *Petrosia corticata* (Soediro, 1999). Aktivitas antibakteri juga ditemukan pada hasil isolasi dari spons laut *Petrosia contignata*, yaitu taraxeron dan D-homoandrostan (Sutedja dkk., 2005). Senyawa antibakteri epidioksi sterol dari spons laut *Petrosia nigrans* juga telah diisolasi dan dikarakterisasi dengan rumus molekul $C_{29}H_{48}O_3$ dengan nama 5,8-epidioksi-24-etilkolest-6-en-3-ol (Handayani dkk., 2011).

Bakteri mampu berkembang biak dengan cepat dan mudah beradaptasi dengan lingkungannya. Bakteri juga mampu menyesuaikan dirinya terhadap efek antibiotik. Bakteri dikatakan resisten apabila suatu antibiotik tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri padahal sebelumnya bakteri tersebut sensitif terhadap antibiotik tersebut. Resistensi antibiotik merupakan masalah kesehatan global saat ini. Ketika terinfeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik, pengobatan menjadi lebih sulit sehingga harus menggunakan obat yang lebih kuat dan lebih mahal dengan lebih banyak efek samping (Salma, 2012). Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif yang secara normal hidup didalam usus, namun tidak menutup kemungkinan bakteri tersebut akan menjadi patogen apabila keluar dari habitatnya. Gejala-gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini biasanya berupa diare dan kram abdomen. (Jawetz, 2005). Penyakit infeksi merupakan masalah besar di Indonesia karena iklim panas dan lembab sehingga bakteri, kapang dan khamir dapat berkembang dengan baik. Fungi *Candida*

albicans, *Aspergillus niger* dan *Trichophyton rubrum* merupakan golongan fungi patogen yang umum dapat menyebabkan infeksi pada manusia (Ikawati, 2013). Salah satu fungi yang dianggap sebagai spesies terpatogen adalah *Candida albicans* karena dalam kondisi tertentu dengan jumlah berlebihan dapat menekan sistem kekebalan tubuh inang. Menurut Slavin dkk., (2004) *Candida sp.* adalah salah satu fungi penyebab penyakit infeksi saluran reproduksi pada wanita, dan merupakan salah satu penyebab paling signifikan dari infeksi nosokomial dan penyakit kandidiasis yang dapat menyebabkan kematian hingga lebih dari 25%. Infeksi fungi pada kulit sebagian besar disebabkan oleh fungi dari golongan *Trichophyton* dan *Microsporum* dengan bentuk infeksinya berupa *tinea pedis*, *tinea unguium*, *tinea cruris*, *tinea capitis* dan *tinea corporis*. *Trichophyton rubrum* merupakan dermatofit yang menyerang manusia, 80-93% kasus infeksi jamur pada kulit dan kuku disebabkan oleh jamur ini (Ikawati, 2013).

Tahapan penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah zona bening yang digunakan untuk mengetahui adanya potensi protein bioaktif bakteri simbiosis *Petrosia alfiani* sebagai antimikroba. Zona hambat yang terbentuk digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan penggunaan senyawa protein sebagai bahan obat memiliki beberapa keunggulan diantaranya dapat diterima baik oleh tubuh dan efek samping lebih sedikit. Oleh karenanya, perlu dilakukan penelitian mengenai protein bioaktif dari bakteri simbiosis *Petrosia alfiani* dan uji aktivitasnya sebagai antimikroba. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi bakteri simbiosis *Petrosia alfiani* penghasil senyawa antimikroba. Isolat yang memiliki aktivitas tertinggi kemudian dikultur dalam media kultur termodifikasi untuk produksi protein bioaktif dan dilakukan ekstraksi, fraksinasi, dan dialisis. Fraksi dengan kadar protein tertinggi selanjutnya dihidrolisis. Protein terhidrolisis terdiri atas senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti peptida, asam amino, dan amonia sehingga mudah diserap oleh tubuh. Aktivitas antimikroba fraksi protein diuji dengan metode cakram kertas. Uji aktivitas dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*; jamur *Candida albicans* dan *Trichophyton rubrum*.

1.1.1 Spons

Spons merupakan organisme laut invertebrata yang berasal dari filum porifera yang dicirikan memiliki banyak pori-pori di sepanjang tubuhnya. Spons termasuk hewan yang bersifat *filter feeder* (menyaring makanan). Secara ekologi, spons merupakan salah satu biota penyusun ekosistem pesisir dan laut, terutama pada ekosistem terumbu karang dan padang lamun baik di perairan tropik maupun subtropik. Keanekaragaman jenis spons di suatu habitat umumnya ditentukan oleh kondisi perairan yang jernih dan tidak memiliki arus kuat. Spons juga dapat ditemui pada setiap kondisi kedalaman yang berbeda dengan tingkat kecerahan yang cukup untuk pertumbuhannya (Haris dkk., 2019).

Menurut Wantah dkk (2018) spons merupakan organisme laut yang dapat dikembangkan menjadi bahan sediaan obat, dan merupakan salah satu organisme laut yang banyak diteliti. Spons hidup di ekosistem terumbu karang. Kebanyakan

spons kerangkanya terdiri dari bahan mineral keras yang disebut spikula (Sumich dan Duedley, 1992). Sumber makan utama dari spons adalah bakterio plankton dengan tambahan organik dari hasil fotosintesis alga simbiotik dan substansi organik terlarut yang diserap oleh bakteri yang bersimbiosis dengannya (Sorokin, 1989). Spons mengambil makanan dengan cara menyaring (*filter feeder*) kemudian dicerna secara intraseluler (Barnes dan Rupert, 1994).

1.1.2 Tinjauan Umum Spons *Petrosia alfiani*

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

Kingdom : Animalia
 Phylum : Porifera
 Class : Demospongiae
 Subclass : Heteroscleromorpha
 Ordo : Haplosclerida
 Family : Petrosiidae
 Genus : *Petrosia*
 Species : *Petrosia alfiani*

Morfologi luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisika, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat (de Voogd dan Van Soest, 2002). Spons dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, atau masif dan agak tidak teratur. Ukuran spons juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5 cm. Morfologi spons *Petrosia alfiani* dapat dilihat pada Gambar 4 (de Voogd dan Van Soest, 2002)



Gambar 1. Morfologi dari spons *Petrosia alfiani* (Voogd dan Van Soest, 2002)

1.1.3 Tinjauan Umum Bakteri Symbion Spons

Spons merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentasenya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Restuati dan

Gultom, 2016). Bakteri yang bersimbiosis dengan spons diduga memiliki peranan besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang telah diisolasi dari spons (Lee dkk., 2001). Hal ini merupakan potensi yang memungkinkan bakteri simbiosis spons dapat memiliki kemampuan yang sama dengan spons dalam memproduksi senyawa bioaktif. Beberapa potensi senyawa bioaktif yang telah ditemukan dan dikembangkan dari spons antara lain sebagai antibakteri, antitumor dan antivirus (Bewley dkk., 1996).

Tabel 1. Beberapa jenis senyawa bioaktif yang diisolasi dari spons (Haefner, 2003).

Jenis	Kandungan Bioaktif	Aktivitas Biologis
<i>Acanthella sp.</i>	Kalihinol-A	Antibiotik
<i>Disidea avara</i>	Avarol	Sitotoksik
<i>Hamacantha sp.</i>	Hamacanthin	Antifungi
<i>Mycale spp.</i>	Mycalamide A	Antitumor
<i>Petrosia sp.</i>	Petrotetrayndiols	Sitotoksik
<i>Xestospongia sp.</i>	Xestoaminol A	Antiparasitik

Penelitian Abubakar dkk. (2011) diketahui bahwa sebanyak 32 isolat (45,71%) dari bagian mesohyl (sisi dalam tubuh spons) dan 20 isolat (29,41%) dari bagian permukaan *Jaspis sp.* menunjukkan kemampuan antimikroba yaitu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *V. harveyi*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, EPEC K-11, *Candida albicans* dan *C. tropicalis*. Isolat bakteri endofit (dari mesohyl) dan permukaan tersebut menunjukkan aktivitas antimikroba yang baik karena mampu menghambat pertumbuhan minimal tiga mikroba target dengan kemampuan penghambatan yang baik. Sunny dkk (2016) melaporkan bahwa simbiosis spons dari selat Makassar memiliki kemampuan antimikroba terhadap bakteri *S. aureus*. Dua isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, yaitu S.5-8 dan S.2-1 NRBC dengan masing-masing diameter zona hambat 1,5 dan 2,6 mm.

1.1.4 Tinjauan Senyawa Protein

Protein adalah makromolekul polipeptida yang tersusun dari sejumlah L-asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Suatu molekul protein disusun oleh sejumlah asam amino dengan susunan tertentu dan bersifat turunan. Asam amino terdiri atas unsur-unsur karbon, hidrogen, oksigen, dan nitrogen. Unsur nitrogen adalah unsur utama protein sebanyak 16% dari berat protein. Molekul protein juga mengandung fosfor, belerang, dan ada jenis protein yang mengandung unsur logam seperti tembaga dan besi (Winarno, 2004). Molekul protein tersusun atas satu rantai asam amino tunggal yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Rantai ini terlipat dalam berbagai cara sehingga membentuk ikatan antara asam-asam amino yang terletak saling berdampingan melalui ikatan hidrogen antara atom oksigen dan nitrogen, atau melalui interaksi antar rantai samping. Asam amino yang menyusun rantai protein memiliki struktur kimia yang bervariasi, antara lain hidrofilik,

hidrofobik, aromatik, alifatik, dan heterosiklik. Urutan asam amino menentukan identitas dan fungsi protein (Probosari, 2019).

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obatan yang digunakan untuk memberantas infeksi oleh mikroorganisme pada manusia. Antimikroba merupakan senyawa biologis atau kimia yang menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (bakteriostatik/fungistatik) serta membunuh bakteri atau kapang (bakterisidal/fungisidal). Berdasarkan basis bahan kimia alami penyusunnya, senyawa antibiotik dapat dibagi atas lipoid, pigmen, polipeptida, senyawa mengandung sulfur, kuinon, keton dan basa organik (Karim, 2018).

1.1.5 Tinjauan Umum Teknik Isolasi dan Pemurnian Protein

Pemurnian protein adalah suatu proses memisahkan protein yang diinginkan dari senyawa lain yang mengganggu (Wardani dan Ahsanatur, 2012) dan menurut Channel (1998) pemurnian berarti membebaskan suatu bahan dari bahan-bahan lain yang tidak diinginkan atau sering disebut pengotor. Protein harus dipurifikasi terlebih dahulu agar struktur dan mekanisme kerja suatu protein dapat dipelajari. Hal tersebut karena setiap protein memiliki kelarutan dan ukuran massa yang berbeda-beda. Semakin besar ukuran suatu protein, semakin mudah dan efisien pemisahannya (Lodish, 2004). Dasar dari pemisahan ini adalah memisahkan protein dari semua protein lain yang tidak diperlukan yang semuanya berada pada material yang sama. Secara umum isolasi protein dapat digolongkan dalam tiga tahapan yaitu ekstraksi, fraksinasi dengan salting out dan dialisis (Dennison, 2002).

Dialisis merupakan proses untuk menghilangkan ion-ion pengganggu yang dapat mengganggu kestabilan protein. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan garam dan zat terlarut lainnya yang mempunyai berat molekul yang lebih rendah daripada protein enzim. Prinsip dialisis yaitu memisahkan molekul-molekul yang besar dari molekul yang kecil dengan bantuan membran semipermeabel. Dialisis dapat dilakukan dengan menggunakan kantong selofan, kantong ini memiliki ukuran pori-pori yang lebih kecil dari ukuran protein sehingga protein tidak dapat keluar dari kantong selofan (Kristanti, 2001). Hidrolisis diartikan sebagai pemecahan banyak ikatan menjadi ikatan lebih kecil dan sederhana (Kirk dan Othmer 1953). Melalui teknik hidrolisis, protein dari suatu bahan dapat diubah menjadi senyawa asam amino L, nukleotida, dan berbagai ragam peptida. Bahan-bahan tersebut dipakai untuk menimbulkan gurih pada makanan yang sering disebut *flavor enhancer*. Proses hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi maupun enzimatis (Witono dkk., 2007).

1.1.6 Tinjauan Umum Bakteri dan Jamur Uji

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

sintesis asam nukleat sel mikroba (Djide dkk., 2004). Salah satu metode yang paling sering digunakan dalam ujiaktivitas antibakteri dan antifungi adalah Metode Difusi. Prinsip dari metode ini antibiotik akan terdistribusi kedalam media, disebut juga *disk-diffusion method* atau *Kirby-Bauer test* (Agnes, 2015).

Kepekaan mikroorganisme patogen terhadap antibiotik terlihat dari ukuran zona bening yang terbentuk (Cappucino dan Sherman, 2001). Parameter yang digunakan adalah zona bening, yaitu area bening di sekeliling cakram kertas sebagai indikasi tidak adanya atau terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme akibat ekskresi zat antimikroba oleh kompetitornya (Byod, 1995; Atlas dan Bartha, 1998). Adanya daerah bening di sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antifungi. Cara menghitung luas zona hambat yaitu (Dewi, 2010):

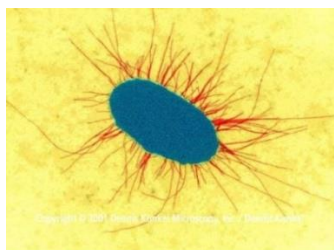
$$\text{Luas zona hambat} = \text{Luas zona bening} - \text{Luas kertas cakram}$$

Penentuan kategori respon hambatan pertumbuhan menurut Rios dkk., (1988) dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan Jamur
> 20 mm	Sangat Kuat
11-20 mm	Kuat
6-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

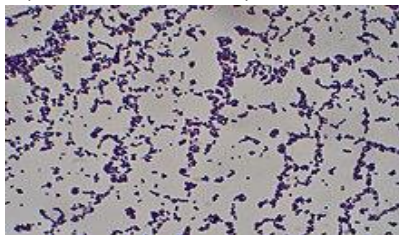
Bakteri dan jamur uji yang banyak digunakan seperti bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sedangkan jamur uji yang digunakan yaitu *Candida albicans* dan *Trichophyton rubrum*. *Escherichia coli* merupakan salah satu mikroorganisme patogen penyebab penyakit. Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif, anaerobik fakultatif berbentuk batang yang umumnya ditemukan di usus besar makhluk berdarah panas. Umumnya, strain dari *E. Coli* tidak berbahaya, tetapi beberapa serotip dapat menyebabkan keracunan makanan yang serius karena terkontaminasi bakteri ini. Strain yang tidak berbahaya adalah flora normal dari usus dan bermanfaat untuk produksi vitamin K2 (Bentley dan Meganathan, 1982) dan menghambat bakteri patogen pada usus (Hudault dkk., 2001).



Gambar 2. *Escherichia coli* (Hudault dkk., 2001)

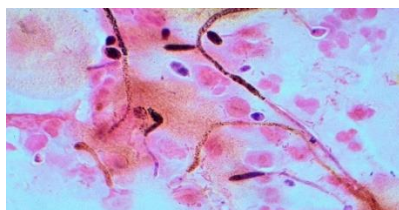
Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif anaerobik fakultatif berbentuk bulat yang juga dikenal dengan nama “staph emas”, memiliki ukuran 0,7-1,2 μm . Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu 37°C dan berkelompok seperti buah anggur dan memiliki warna berwarna emas pada agar darah. *Staphylococcus aureus* bereproduksi dengan cara pembelahan biner. Dua sel anakan tidak terpisah

secara sempurna sehingga bakteri ini selalu terlihat membentuk koloni kluster seperti anggur. Bersifat flora normal pada kulit sehat, tetapi dapat menjadi patogen pada jaringan kulit yang terbuka. *Staphylococcus aureus* hidup sebagai saprofit di dalam saluran saluran pengeluaran lendir dari tubuh manusia dan hewan-hewan seperti hidung, mulut dan tenggorokan dan dapat dikeluarkan pada waktu batuk atau bersin. Bakteri ini sering terdapat pada pori-pori dan permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus (Brooks dkk., 2007).



Gambar 3. *Staphylococcus aureus* (Hill, 1981)

Sel jamur *Candida albicans* berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong. Koloninya pada medium padat sedikit menimbul dari permukaan medium, dengan permukaan halus, licin atau berlipat-lipat, berwarna putih kekuningan dan berbau ragi. Besar koloni bergantung pada umur. Pada tepi koloni dapat dilihat hifa semu sebagai benang-benang halus yang masuk ke dalam medium (Gambar 4). Pada medium cair jamur biasanya tumbuh pada dasar tabung (Suprihatin, 1982 dalam Ariningsih, 2009).



Gambar 4. *Candida albicans* (Suprihatin, 1982 dalam Ariningsih, 2009)

Sel jamur *Candida albicans* berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong. Koloninya pada medium padat sedikit menimbul dari permukaan medium, dengan permukaan halus, licin atau berlipat-lipat, berwarna putih kekuningan dan berbau ragi. Besar koloni bergantung pada umur. Pada tepi koloni dapat dilihat hifa semu sebagai benang-benang halus yang masuk ke dalam medium (Gambar 6). Pada medium cair jamur biasanya tumbuh pada dasar tabung (Suprihatin, 1982 dalam Ariningsih, 2009). *Trichophyton rubrum* biasanya mempunyai mikrokonidia yang berbentuk tetesan air mata sepanjang sisi-sisi hifa, pada beberapa strain mikrokonidia ini mungkin banyak. Koloni sering menghasilkan warna merah pada sisi yang sebaliknya (Jawetz dkk., 2005). Mikrokonidia adalah bentuk spora yang paling banyak. Mikrokonidia berdinding halus, berbentuk pensil dengan ujung-ujung yang tumpul biasanya jarang. Tiap-tiap spesies berbeda dalam morfologi koloni dan pigmentasi. Pembentukan konidia dapat juga berbeda, tergantung pada spesies dalam observasi. Pembentukan tempat jamur tumbuh sangat mempengaruhi sifat-

sifat ini. Penggunaan berbagai jenis pembenihan kadang-kadang diperlukan untuk membedakan spesies (Jawetz dkk., 2005).



Gambar 5. *Trichophyton rubrum* (Jawetz dkk., 2005)

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dimulai dengan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Seberapa besar kandungan protein dan peptida bioaktif yang berpotensi sebagai antimikroba pada isolat bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani*?
2. bagaimana aktivitas antimikroba fraksi protein dan peptida bioaktif dari isolat bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani*?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.3.1 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa protein dan peptida bioaktif dari bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani* yang berpotensi sebagai antimikroba.
2. menguji aktivitas antimikroba fraksi protein dan peptida bioaktif dari isolat bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani*.

1.3.2 Manfaat Penelitian

Secara umum penelitian ini dilakukan untuk memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Adapun secara khusus manfaat penelitian ini adalah memberikan nilai tambah pada pemanfaatan spons *Petrosia alfiani* dan sebagai sumber informasi mengenai komponen senyawa bioaktif dari spons *Petrosia alfiani* yang dapat digunakan sebagai bahan antimikroba berupa antibakteri dan antifungi.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri simbiosis spons *Petrosia alfiani*, biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, jamur *Candida albicans* dan *Trichophyton rubrum*, media *Nutrient* agar, media *Nutrient broth* (NB), buffer A (Tris(hidroksimetil) aminometana 0,1 M pH 8,3(Merck); NaCl 2 M (Merck); CaCl₂ 0,01 M (Merck); β-merkaptotanol 1% (Merck); Triton X-100 0,5% (Merck); NaCl 0,2 M (Merck), buffer C (Tris(hidroksimetil) aminometana 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M) (Merck), Lowry A (follin ciocalteu dengan akuades 1:1) (Merck), Lowry B (Na₂CO₃ 2% (Merck), NaOH 0,1 N, CuSO₄.5H₂O 1% (Merck), Na-K-Tartrat 2%) (Merck), BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Merck), HCl 1 M (Merck), (NH₄)₂SO₄ (Merck), enzim pepsin (Merck), TCA 20% (Merck), BaCl₂ (Merck), akuades, air laut steril, kantong selofan, kapas, spritus, media PDA (*Potato Dextrose Agar*), kertas cakram kosong (*blank disc*), kasa dan aluminium foil.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, autoklaf, spektroskop 20D⁺, *sentrifuge* TOMY MX-305, *shaker* inkubator Labo WBS-18, inkubator Memmerth, magnetik *stirrer*, *stopwatch*, lemari pendingin, mikroskop, sonikator, penangas air, mikropipet, tabung Eppendorf, spoit, vial, kawat ose, vortex, pH meter, loop, botol semprot dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2022-Oktober 2022 bertempat di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Laboratorium Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengambilan sampel penelitian dilakukan di Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Kota Makassar.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Prepasi Sampel

Sampel spons yang telah dikumpulkan dibersihkan dari kotoran yang menempel dan disimpan dalam *cool box*. Selanjutnya sampel disegarkan dalam media *Nutrient Broth*.

2.4.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media *Nutrient* agar (NA) dibuat dengan melarutkan 2 gram media NA kemudian dilarutkan dengan air laut 100 mL sambil dipanaskan sampai larut. Selanjutnya media diatur pH-nya hingga 7, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu

121°C dengan tekanan 15-20 psi selama \pm 15 menit. Setelah itu campuran medium tersebut dituang ke dalam cawan petri dan didinginkan (Juhriah dan Sari, 2018).

2.4.3 Pembuatan Media Inokulum

Media inokulum dibuat dengan melarutkan 0,8 gram media NB kemudian dilarutkan dengan air laut 100 mL sambil dipanaskan sampai larut. Selanjutnya media diatur pH-nya hingga 7 dan disterilkan di dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15-20 psi selama \pm 15 menit.

2.4.4 Pembuatan Media Produksi

Media produksi dibuat dengan melarutkan 0,8 gram media NB kemudian dilarutkan dengan air laut 1000 mL sambil dipanaskan sampai larut. Selanjutnya media diatur pH-nya hingga 7 dan disterilkan di dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15-20 psi selama \pm 15 menit.

2.4.5 Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth*

Spons laut *Petrosia alfiani* ditimbang sebanyak 5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi air laut steril 45 mL (1:9). Selanjutnya campuran dikocok dalam shaker inkubator selama 2 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C, bagan kerja penyegaran sampel dalam media *Nutrient broth* terlihat pada Lampiran 2 .

2.4.6 Bagian Permukaan Spons *Petrosia alfiani*

Air laut hasil penyegaran diambil sebanyak 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media NB steril sebanyak 45 mL (1:9). Selanjutnya campuran dikocok menggunakan shaker inkubator selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C.

2.4.7 Bagian Dalam Spons *Petrosia alfiani*

Spons hasil penyegaran digerus hingga halus menggunakan mortar, kemudian disaring dengan air laut steril. Filtratnya diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media NB steril sebanyak 45 mL Selanjutnya campuran dikocok menggunakan shaker inkubator selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C.

2.4.8 Isolasi Bakteri Simbion

Sampel yang telah disegarkan pada media NB diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut. Dilakukan pengenceran bertingkat yaitu 10^{-1} hingga 10^{-8} . Setelah itu, masing-masing

pengenceran ditumbuhkan pada media NA pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Selanjutnya koloni dengan zona bening yang stabil diambil dan digores beberapa kali dengan metode kuadran hingga diperoleh koloni tunggal, bagan kerja isolasi bakteri simbion terlihat pada Lampiran 3a. Isolat yang membentuk zona bening dipilih untuk penelitian selanjutnya.

2.4.9 Identifikasi Isolat Bakteri Simbion

Isolat yang memiliki aktivitas zona bening terbesar selanjutnya diidentifikasi melalui uji 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 lalu ditambahkan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit. Kaca preparat dibilas dengan air mengalir, lalu ditambahkan dengan larutan lugol dan didiamkan selama 30 detik, 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 (*Sulfid Indol Motility*), uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, mannitol), sitrat, urea, dan VP-MR (*Methyl Red-Vogel Proskaur*) seperti yang terlihat pada Lampiran 3b.

2.4.10 Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri

Isolat bakteri diambil 2-3 ose dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 100 mL media inokulum steril. Media inokulum yang berisi isolat kemudian dikocok dalam shaker inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya, sebanyak 10% media inokulum aktif dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi medium starter steril. Campuran kemudian dikocok dalam shaker inkubator pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 60 jam dan dilakukan sampling untuk mengetahui pertumbuhan sel bakteri setiap 6 jam. Pertumbuhan sel bakteri diamati dengan mengukur *optical density* dengan spektrometri 20D⁺ pada panjang gelombang 660 nm (Rutu dkk., 2015).

2.4.11 Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif dari Isolat Bakteri Simbion

Produksi protein bioaktif dilakukan pada waktu pertumbuhan optimum yaitu selama 36 jam. Biakan bakteri simbion yang murni diambil 2-3 ose dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 100 mL media inokulum steril. Media inokulum yang berisi isolat kemudian dikocok menggunakan shaker inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya sebanyak 10% inokulum aktif dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi media produksi steril. Campuran kemudian ditutup dengan kapas dan kasa, dan selanjutnya dikocok menggunakan shaker inkubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C selama 36 jam (Naid

dkk., 2013). Bakteri hasil produksi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit untuk memisahkan filtrat dan sel bakteri. Filtrat dari ekstrak sel yang merupakan ekstrak kasar protein ekstraseluler disimpan di lemari pendingin. Sedangkan sel bakteri yang diperoleh kemudian digerus dan ditambahkan 50 mL Buffer A. Selanjutnya, pecahan sel dibeku-cairkan sebanyak 3 kali lalu disonikasi selama 3x10 menit dalam air es untuk membantu pemecahan sel secara sempurna. Sel yang telah terpecah kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit untuk mendapatkan filtrat protein intraseluler, selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan pemurnian dan ditentukan kadar proteinnya (Ahmad dkk., 2014), seperti yang terlihat pada Lampiran 4.

2.4.12 Fraksinasi Amonium Sulfat

Filtrat ekstrak protein ekstraseluler dan intraseluler difraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan berturut-turut: 0-20%, 20-40%, 40-60%, dan 60-80%. Filtrat ekstra dan intra sel yang diketahui volumenya ditambahkan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan tertentu sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna, dibiarkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Filtrat dan endapan dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 12500 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Endapan yang didapatkan dilarutkan dalam Buffer B ± 5 mL, seperti yang terlihat pada Lampiran 5. Kemudian fraksi protein diuji kadar proteinnya dan dimurnikan lagi dengan cara dialisis (Ahmad dkk., 2014; Rutu dkk., 2014; Natsir dkk., 2013).

2.4.13 Dialisis

Endapan-endapan yang diperoleh setelah fraksinasi dari masing-masing tingkat kejenuhan amonium sulfat dilarutkan dalam sejumlah Buffer B dan selanjutnya didialisis dalam sejumlah Buffer C. Masing-masing fraksi protein tersebut dimasukkan ke dalam kantong selofan dengan dipastikan bahwa kantong selofan tidak bocor atau rusak. Selofan yang telah diisi dengan fraksi protein dimasukkan ke dalam gelas kimia yang berisi larutan Buffer C lalu diaduk dengan pengaduk *magnetic stirrer*. Setiap 3 jam Buffer C diganti, larutan Buffer C diuji dengan BaCl₂ 1% untuk mengetahui apakah masih terdapat garam. Dialisis dihentikan bila dialisat sudah tidak mengandung garam yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan berwarna putih. Selanjutnya, fraksi hasil dialisis dilakukan pengukuran kadar protein (Ahmad dkk., Natsir dkk., 2015), seperti yang terlihat pada Lampiran 6.

2.4.14 Penentuan Kadar Protein

Kadar protein bioaktif dapat ditentukan berdasarkan metode Lowry menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai larutan protein standar dan akuades sebagai larutan blanko. Larutan standar BSA dibuat dengan konsentrasi 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg/mL lalu dimasukkan ke dalam deret tabung reaksi dengan volume

masing-masing sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 2,75 mL reagen Lowry B dan dicampur merata lalu dibiarkan selama 15 menit pada suhu kamar. Selanjutnya ditambahkan 0,25 mL reagen Lowry A, dikocok merata dan dibiarkan selama 30 menit sampai warna biru terbentuk. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 660 nm dan dibuat kurva standarnya untuk mendapatkan persamaan standar (Reha dkk., 2013; Baharuddin, 2016), seperti yang terlihat pada Lampiran 7. Sebanyak 2 mL larutan fraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Diencerkan jika pada sampel fraksi pekat dengan faktor pengenceran (FP), kemudian dilakukan perlakuan yang sama seperti pada larutan blanko dan standar di atas. Data absorbansi yang diperoleh disubstitusi ke dalam persamaan kurva standar pada persamaan (1) dan (2).

$$y = ax + b$$

$$x = \left(\frac{y-b}{a}\right) FP \quad (2)$$

keterangan:

y = absorbansi
 x = kadar protein (mg/mL)
 FP = faktor pengenceran

2.4.15 Hidrolisis Enzimatik Protein

Hidrolisis protein dilakukan berdasarkan metode Wang dan Zhang (2016) dengan beberapa modifikasi. Fraksi dengan kadar protein tertinggi diencerkan menjadi larutan 3%. Selanjutnya dihidrolisis menggunakan enzim pepsin dengan perbandingan enzim dan substrat 3:100 pada suhu 37°C pH 2. Larutan protein dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 30 menit. Proses hidrolisis didesain dengan memvariasikan waktu hidrolisis (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 jam) untuk menentukan kondisi optimum pada pembuatan hidrolisat protein. Enzim dinaktifkan dengan pemanasan dalam air mendidih selama 10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm, suhu 4°C selama 20 menit, seperti yang terlihat pada Lampiran 8. Hidrolisat protein disimpan pada freezer untuk selanjutnya digunakan pada penentuan derajat hidrolisis (DH) dan uji aktivitas antikanker.

2.4.16 Penentuan Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan dengan metode Sivestre dkk. (2013) Sebanyak 0,5 mL sampel direaksikan dengan 0,5 mL TCA 20% untuk mendapatkan fraksi protein terlarut dan fraksi tidak larut. Campuran kemudian dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu 4°C selama 30 menit. Campuran lalu disentrifugasi pada 3500 rpm, suhu 4°C selama 20 menit. Kandungan protein terlarut dan protein total dianalisis berdasarkan metode Lowry dkk. (1951). Derajat hidrolisis dihitung menggunakan rumus pada persamaan (3):

$$DH \% = \frac{\text{Protein terlarut 10\% TCA}}{\text{Protein total}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4.17 Uji Aktivitas Antimikroba sebagai Antibakteri Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murninya, masing-masing diambil satu 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.

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% (standar Mac-Farland) terhadap blanko larutan NaCl 0,9% steril (Sartika, 2014).

Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol positif digunakan paper disc kloramfenikol dengan konsentrasi 30 ppm. Sedangkan larutan kontrol negatif digunakan Bovine Serum Albumin (BSA) sebanyak 1 mg/mL.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian daya hambat protein bioaktif terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Media MHA steril didinginkan pada suhu 40-45°C. Kemudian dituang secara aseptis ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL dan dimasukkan suspensi bakteri uji sebanyak 0,5 mL. Setelah itu, 6 buah *paper disc* masing-masing dicelupkan pada protein bioaktif setiap fraksi, kontrol (+) dan kontrol negatif (-) lalu diletakkan secara aseptis dengan menggunakan pinset steril pada permukaan media. Cawan petri diberi label untuk membedakan sampel yang diuji. Selanjutnya diinkubasi selama 24-72 jam pada suhu 37°C lalu diamati dan diukur zona hambatannya dengan mistar geser.

2.4.18 Uji Aktivitas Antimikroba sebagai Antifungi Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Sebanyak 3,9 gram *Potato Dextrose Agar* dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL diatur pH hingga 5, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga larut, selanjutnya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm (Rantekata, 2018).

Peremajaan Kultur Fungi

Candida albicans dari kultur persediaan diremajakan dengan cara memindahkan satu jarum inokulasi kedalam medium PDA miring yang baru dan diinkubasi suhu 25°C selama 2x24 jam. *Trichophyton rubrum* diremajakan dengan cara mengambil satu jarum inokulasi dan digores kedalam media PDA pada cawan petri dan diinkubasi suhu 25°C selama 3x24 jam (Rantekata, 2018).

Persiapan Kultur Fungi

Kultur fungi uji dari *Trichophyton rubrum* dan *Candida albicans* dibuat dengan cara menginokulasikan *Trichophyton rubrum* dan *Candida albicans* yang telah diremajakan sebanyak satu ose untuk setiap 10 mL larutan NaCL 0,9% steril, selanjutnya kultur fungi diinkubasi pada suhu 25°C (Rantekata, 2018).

Pembuatan Larutan Ekstrak

Dibuat 5 seri konsentrasi ekstrak protein bakteri simbion spon *Petrosia alfiani* yaitu 10, 15, 25, 35, dan 50 mg/mL. Masing-masing ekstrak dilarutkan menggunakan 10 mL DMSO 10% (Rantekata, 2018).

Uji Aktivitas Antifungi

Pengujian aktivitas antifungi terhadap *Trichophyton rubrum* dan *Candida albicans* dilakukan dengan metode difusi agar yang menggunakan metode lubang sumuran (*Kirby bauer*) dengan menuang sebanyak 15 mL media PDA sebagai *base layer*. Selanjutnya dibuat lubang sumuran menggunakan pencadang dengan diameter 8,81 mm, dengan cara disusun dalam media PDA padat yang berisi *base layer*. Setelah itu dituang sebanyak 0,1 mL suspensi jamur dan dihomogenkan dalam media PDA 10 mL sebagai *seed layer* dan dituang pada cawan petri yang berisi media PDA *base layer*. Selanjutnya dimasukkan 40 µL seri konsentrasi ekstrak protein bakteri simbion spon *Petrosia alfiani* dan digunakan kontrol positif sediaan antifungi nistatin® dan kontrol negatif larutan DMSO 10% diinkubasi pada suhu 25°C selama 2x24 jam.

Diukur diameter zona hambat pada masing-masing sumuran menggunakan jangka sorong digital dengan pengukuran sebanyak 3 kali untuk tiap lubang. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali pada tiap pengujian. Nilai diameter zona hambat dari ketiga replikasi tersebut dirata-rata dan dibandingkan nilai diameter zona hambat antar konsentrasi ekstrak.