

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.
- Agnes S., H., M., 2015, *Mikrobiologi Kesehatan : Peran Mikrobiologi Dalam Bidang Kesehatan* (1st Edition Ed.). (E. Risanto, Ed.) Penerbit Andi.
- Agustiani, 2014, *Uji Aktivitas Antikanker Protein Bioaktif Dari Bakteri Symbion Alga Coklat Sargassum sp.* Skripsi tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Ahmad, A., Natsir, H., and Karim, H., 2014, Purification and Gene Cloning of Novel Antibacterial Phospholipase A2 of The Spons *Agelas Clathroides* From Kapoposang Island Indonesia Terrestrial, *American Journal of Biomedical and Life Sciences*, **2**(5): 119-126.
- Aminah, I., Usman, H., dan Ahmad, A., 2014, Karakterisasi Metabolit Sekunder Ekstrak Diklorometana dari Spons *Petrosia alfiani* Sebagai Antioksidan, *Jurnal Ilmiah Kimia Organik*, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Apriyandi, R. A., dan Hadisaputri, Y. E., 2019, Artikel Ulasan: Aktivitas Kandungan Senyawa dan Karakteristik Spons Laut Genus *Petrosia*, *Farmaka*, **17**(2): 285-295.
- 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.
- Ariningsih, R., I., 2009, *Isolasi Streptomyces dari Rizosfer Familia Poaceae yang Berpotensi menghasilkan Antijamur terhadap Candida albicans*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Astuti, P., Alam, G., Hartati, M.S., Sari, D.,Wahyuono, S., 2005. Uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid dari Spons *Petrosia sp*: Potensial Pengembangan sebagai Antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia*, **16**(1): 58–62.
- Atlas, R., M., dan Bartha, R., 1998, *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*, Benjamin Cummings Publishing Company Inc, California.
- Baharuddin, M., 2016, Kajian Selulase dari Bakteri Symbion Larva Kupu-Kupu (*Cossidae*): Pemurnian, Karakterisasi dan Aplikasi dalam Hidrolisis Lignoselulose Jerami, Disertasi tidak diterbitkan, Makassar:Sekolah Pascasarjana, Universitas Hasanuddin.
- Barasi, M., E., 2009, *At a Glance Ilmu Gizi*, Penerbit Erlangga, Jakarta.

- Barnes, R. D., dan Rupert, E. E., 1994, *Invertebrate Zoology*, Sounders College Publishing.
- Bentley, R., dan Meganathan, R., 1982, Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria, *Microbiological Reviews*, **46**(3): 241–80.
- Bewley, C. A., Holland, N. P., dan Faulkner, D. J., 1996, Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52: 716-722.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Stephen, A.M., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta.
- Byod, R., F., 1995, *Basic Medical Microbiology Five edition*, Little Brown Company Inc, Boston.
- Cappucino, J., G., dan Sherman, N., 2001, *Microbiology: A Laboratory Manual. 2nd Edition*, *The Benjamin Cummings Publishing Company*, Rockland Community College, State University of New York.
- Channel, R., 1998, *Natural Product Isolation*, Humana press, New Jersey.
- Collin, P. L., dan Anerson, C., 1995. *Tropical Pasific Invertebrates: A Field Guide to the Marine Invertebrates Occuring on Tropical Pacific Coral Reef, Seagrass and Mangrove*, Coral Reef Press, California.
- Dahuri, R., 1998, Coastal Zone Management in Indonesia: Issues and Approaches, *Journal of Coastal Development*, **1**(2): 97-112.
- Damodaran, S., 1996, Amino Acids, Peptides and Protein, di dalam: Fennema OR, editor. Food Chemistry. Edidi ke-3. New York: Marcel Dekker, Inc.
- De voogd, N. J., and Van Soest, R. W. M., 2002, *Indonesian Spons of the Genus Petrosia*, Zool. Med, Leiden
- Dennison, C., 2002, *A Guide to Protein Isolation*, Kluwer Academic Publisher, New York.
- Dewi, F., K., 2010, *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia, Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Djide, N.M., Sartini dan Kadir, S., 2004, *Analisis Mikrobiologi Farmasi*, Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FMIPA UNHAS, Makassar.
- Ghufran, H., dan Kordi. K. M., 2010, *Ekosistem Terumbu Karang: Potensi, Fungsi dan Pengelolaan*, Rineka Cipta, Jakarta.

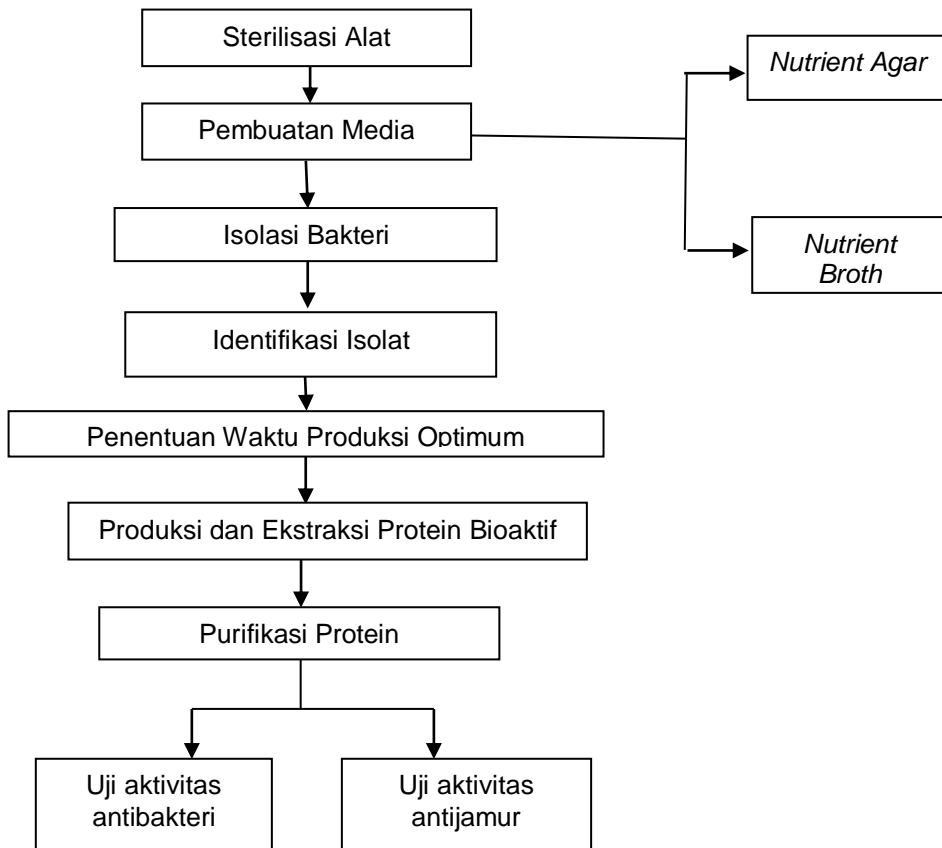
- Haefner, B., 2003, Drug From the Deep: Marine Natural Products Drug Candidates. *Drug Disc. Today*, **6**(12): 536-544.
- Handayani, D., Sayuti, N., Dachriyanus, dan Van Soest, R.W.M., 2011, Epiidioksi Sterol, Senyawa Antibakteri dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, *Jurnal Bahan Alam*, **7**(6): 289–293.
- Haris, A., Nurafni, Lestari, D. N., dan Hasania, M., 2019, Keanekaragaman dan Komposisi Jenis Spons (Porifera: Demospongiae) di Reef Flat Pulau Barranglombo, *Torani: Jurnal of Fishing and Marine Science*, **3**(1): 26-36.
- Hawkins, D. W., dan Rahn, D. W., 1997, *Pharmacoteraphy A Phatophysilogic Approach*, 3 th Ed., Appleton and Lange, Stampfor.
- Hernandez-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., dan Recio, I., 2004, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Activity in Commercial Fermented Products. Formation of Peptides Under Simulated Gastrointestinal Digestion, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 1504-1510.
- Hill, L.R., 1981, *Taxonomy of the Staphylococci*, The Staphylococci: Proceedings of the Alexander Ogston Centennial Conference.
- Hooper, J. N. A., dan Van Soest R. M. W., 2002, *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponss*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Hudault, S., Guignot, J., dan Servin, A., L., 2001, Escherichia coli Strains Colonising the Gastrointestinal Tract Protect Germfree Mice Against *Salmonella Typhimurium* Infection, *Gu*, **49**(1): 47–55.
- Ikawati, H., D.. 2013, Aktivitas Antidermatofitik Ekstrak Daun Urang-aring (*Eclipta alba* (L.) Hassk) terhadap *Trichophyton mentagrophytes*, 27–32.
- Jawetz, E., L., Joseph, Melnick, dan Edward, A., 1996, *Mikrobiologi Kedokteran*, EGC, Jakarta.
- Jawetz, E., L., Melnick., E., A., dan Adelberg., G., F., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran Edisi Pertama*, Salemba Medika, 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.
- Karim, H., 2018, *Pemurnian dan Studi Aktivitas Antimikroba dan Antikanker Enzim L-Glutaminase dan L-Asparaginase dari Bakteri Simbion Alga Coklat Sargassum sp.*, Disertasi tidak diterbitkan, Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar.

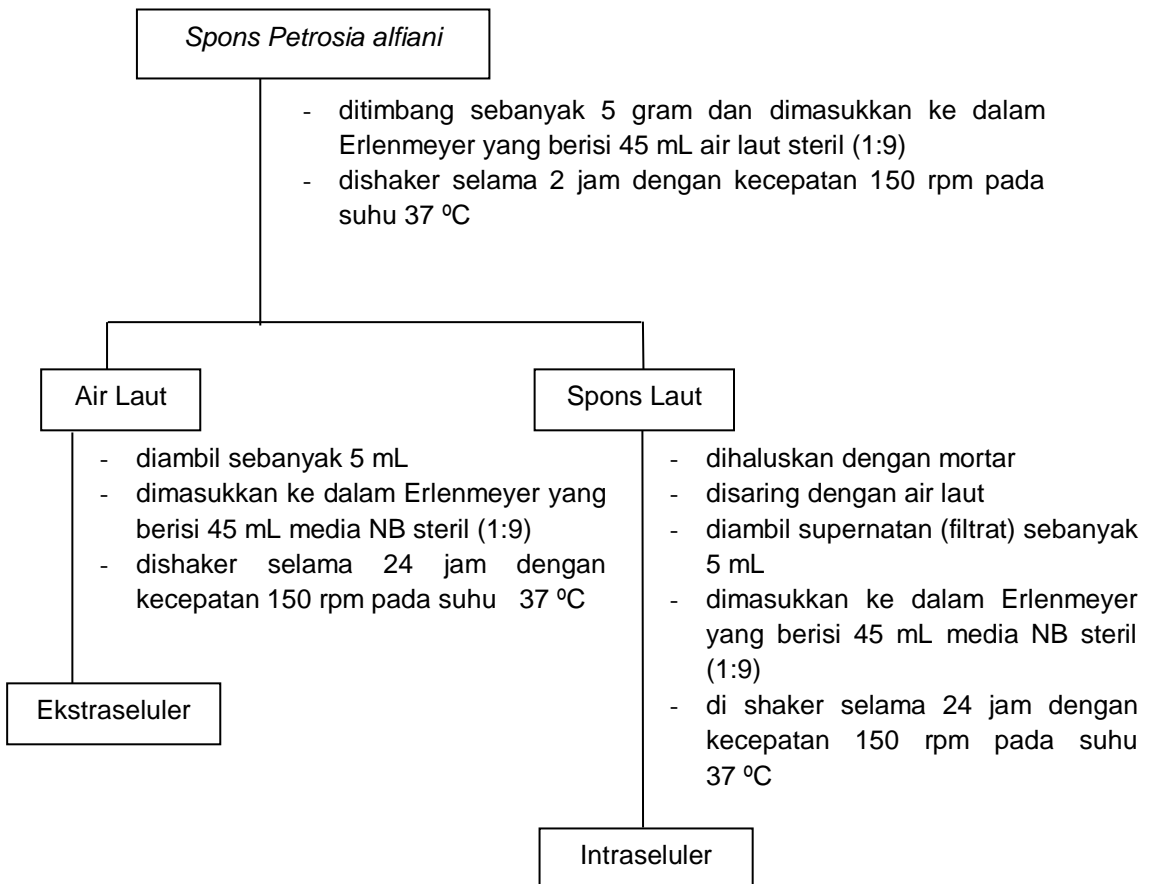
- Karso, Wuryanti, dan Sriatun, 2014, Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik KC3 dari Kecoa (*Orthoptera*), *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, **17**(2): 51-57.
- Kirk, R.E., dan Othmer, J.B., 1953, *Encyclopedia of Chemical Technology*, IX(1), The Interscience Encyclopedia Inc New York.
- Kozloff, E.N., 1990, *Invertebrates*, Saunders College Publishing, New York.
- Kristanti, M.I.K.U., 2014, *Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Tanaman Suruhan (Peperomia pellucida L.) Terhadap Pertumbuhan Eschericia coli dan Bacillus cereus Secara In-Vitro Serta Kaitannya Dengan Pembelajaran Biologi SMA Kelas X*, Skripsi, Universitas Sanata Dharma.
- Kristanti, N.D., 2001, *Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Lipase Ekstraseluler dari Kapang R. oryzae TR 32*, Tesis, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Kunts A., 2000, Enzymatic Modification of Soy Proteins to Improve Their Functional Properties, *Magazine of Industrial Protein*, **8**(3): 9-11.
- Lee, Y.K., Jung H.L., dan Hong K.L., 2001, Microbial Symbiosis in Marine Sponss, *The Journal of Microbiology*, **39**(4): 254-264.
- Lodish, H.F, 2004, *Molecular Cell Biology*. 5th ed., W.H Freeman and Company, New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- McLaughlin, J. L., 1991, Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination, *Methods in Plants Biochemistry*, **6**(1): 1-30.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols D. J., dan McLaughlin, J. L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, *Planta medica*, (45): 31-34.
- Naid, T., Kasim, S., Marzuki, A., dan Sumarheni, 2013, Produksi Antibiotika Secara Fermentasi dari Biakan Mikroorganisme Symbion Rumpuk Laut *Eucheuma cottoni*, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, **17**(3): 61-68.
- Natsir, H., Patong, A. R., Suhartono, M. T., and 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.
- Pechenik, J.A., 1991, *Biology of The Invertebrates*, Second Edition, Dubque, Wm, C. Brown Publisher, USA.

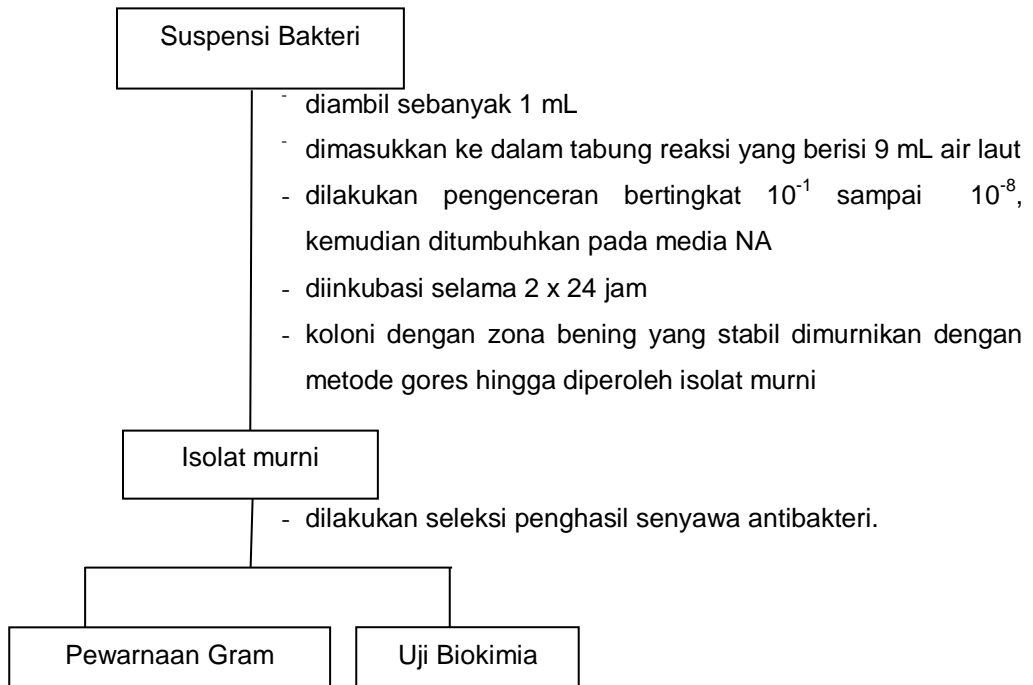
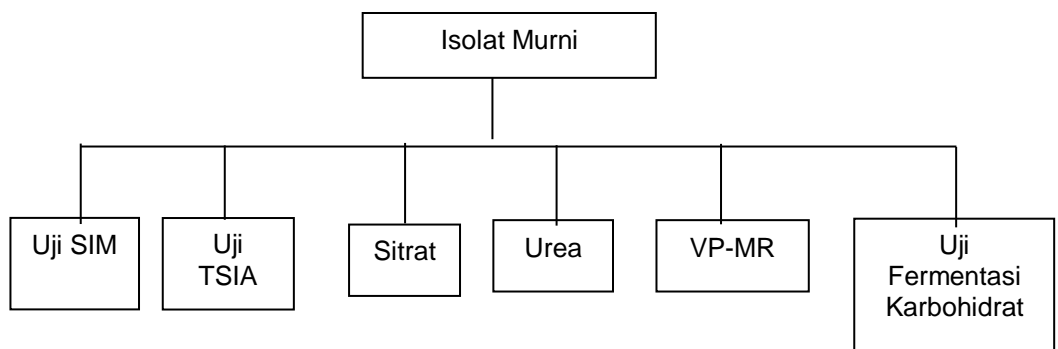
- Pelczar, M., J., dan Chan., E., C., S., 1998, *Dasar- Dasar Mikrobiologi 2*, UI Press, Jakarta.
- Pelezar, M., J., 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta. Prayudo, A. N., Novian, O., Setyadi, dan Antaresti, 2015, Koefisien Transfer Massa Kurkumin dari Temulawak, *Jurnal Ilmiah Widya Teknik*, **14**(1): 26-31.
- Probosari E., 2019, Pengaruh Protein Diet Terhadap Indeks Glikemik, *Journal of Nutrition and Health*, **7**(1): 33-39.
- Rahman, A., 2014, Isolasi, Identifikasi Dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Kloroform Spons *Petrosia Alfiani* dari Kepulauan Barrang Lompo, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Rantekata, S., 2018, Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Kulitbatang Banyuru (*Pterospermum celebicum* Miq.) Dan Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Willd.) Terhadap *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* Dan *Aspergillus niger*, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- 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.
- Restuati, M., dan Gultom, E. S., 2012, Uji Potensi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Asal Pulau Ngge (Sibolga) sebagai Sumber Antibakteri, *Jurnal Sainika*, **12**(2): 98-104.
- Rios, J., L., Recio, M., C., dan Villar, A., 1988, Screening methods for natural product with antimicrobial activity (A Review of Literature), *Journal of Ethnopharmacology*, **23**: 127-149.
- Rutu, I., Natsir, H., and 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.
- Sari, N. P. D. P., 2016, *Aktivitas Antimikroba Jamur Endofit Penicillum oxalicum dari Spons Genus Homaxinella*, Skripsi Tidak Diterbitkan, Fakultas Farmasi, Departemen Farmakognosi dan Fitokimia, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sarker S. D., Latif Z., dan Gray A. I., 2006, *Natural Products Isolation. 2nd ed.*, Humana Press Inc., New Jersey.
- Sartika, 2014, *Potensi Antimikroba Protein Bioaktif dari Bakteri Symbion Alga Coklat Sargassum sp. Asal Perairan Pulau Lae-Lae*, Skripsi tidak diterbitkan, Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Setyaningsih, I., 2004, *Resistensi Bakteri dan Antibiotik Alami dari Laut*, Makalah Falsafah Sains. IPB, Bogor.

- Siswandono dan Soekardjo, 1995, *Kimia Medisinal*, Penerbit Airlangga University Press, Surabaya.
- Slavin, M., Fastenau, J., Sukarom, I., Mavros, P., Crowley, S., 2004, Burden of Hospitalization of Patients with Candida and Aspergillus Infections in Australia, *Int Journal Infect Dis*, **8**: 111–120.
- Soediro, I.S., 1999, *Produk Alam Hayati Bahari dan Prospek Pemanfaatannya di Bidang Kesehatan dan Kosmetika*, Prosidings Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Jakarta, 14–15 Oktober 1998: 41 – 52.
- Sorokin, Y. L., 1989, *Coral Reef Ecology*, Springer-Verlag.
- Sumich, J. L., dan Duedley, G. H., 1992. *Laboratory And Field Investigation In Marine Biology*, 5th edition, Win. C Brown Publisher.
- Sunny, F., Kurniati, T.H., dan Hatmanti, A., 2016, Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Senyawa Antibakteri yang Berasosiasi dengan Karang Batu dari Perairan Bitung dan Spons dari Selat Makassar, *Bioma*, **12**(1): 42- 49.
- Sutedja, L., Udin, L.Z., dan Manupputy, A., 2005, *Antimicrobial Activity of the Spons Petrosia contignata Thiele*, Sistem Informasi Dokumen Kegiatan Pusat Penelitian Kimia LIPI, Bandung.
- Taylor, M. W., Radax. R., Steger D., dan Wagner M., 2007, Spons-Associated microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **71**(2): 295-347.
- 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.
- Wantah, E. D. L., Mangindaan, R. E. P., dan Losung, F., 2018, Uji Aktivitas Larvasida dari Beberapa Ekstrak Spons Terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*, *Jurnal Ilmiah Platax*, **6**(2): 83-88.
- Wardani, A. dan Ahsanatun S., 2012, *Purifikasi dan Strategi Enzim*, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Winarno, F., G., 2004, *Kimia Pangan Dan Gizi*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Yulianti, T., Chasanah, E., dan Tambunan, U.S.F., 2012, Screening and Characterization of L-glutaminase Produced by Bacteri Isolated from Sangihe Talud Sea, *Squalen*, **7**(3): 115-121.

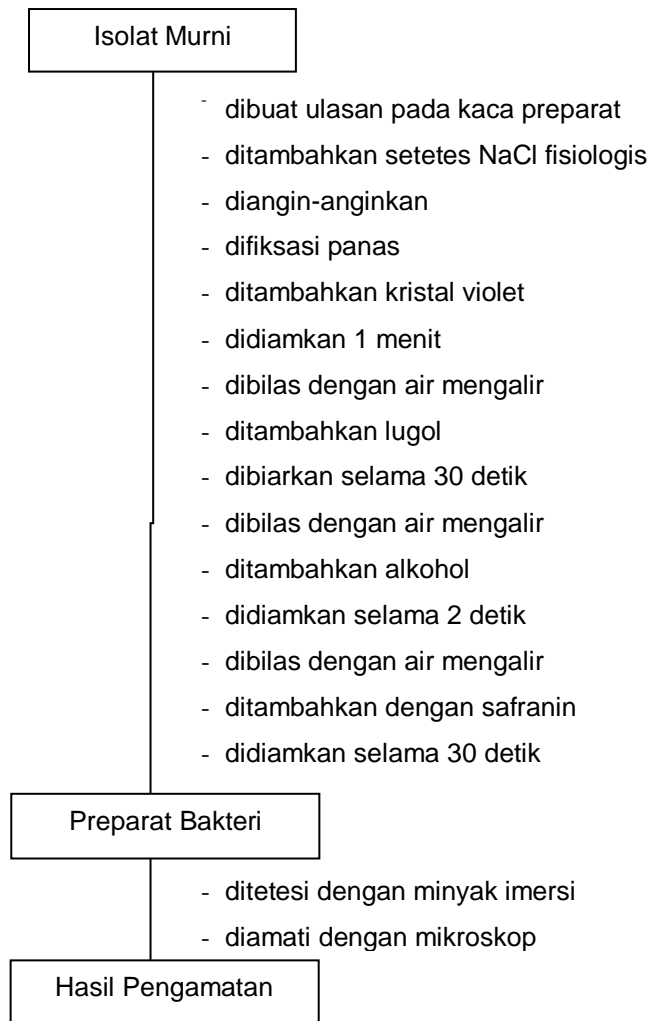
Lampiran 1. Diagram Alir

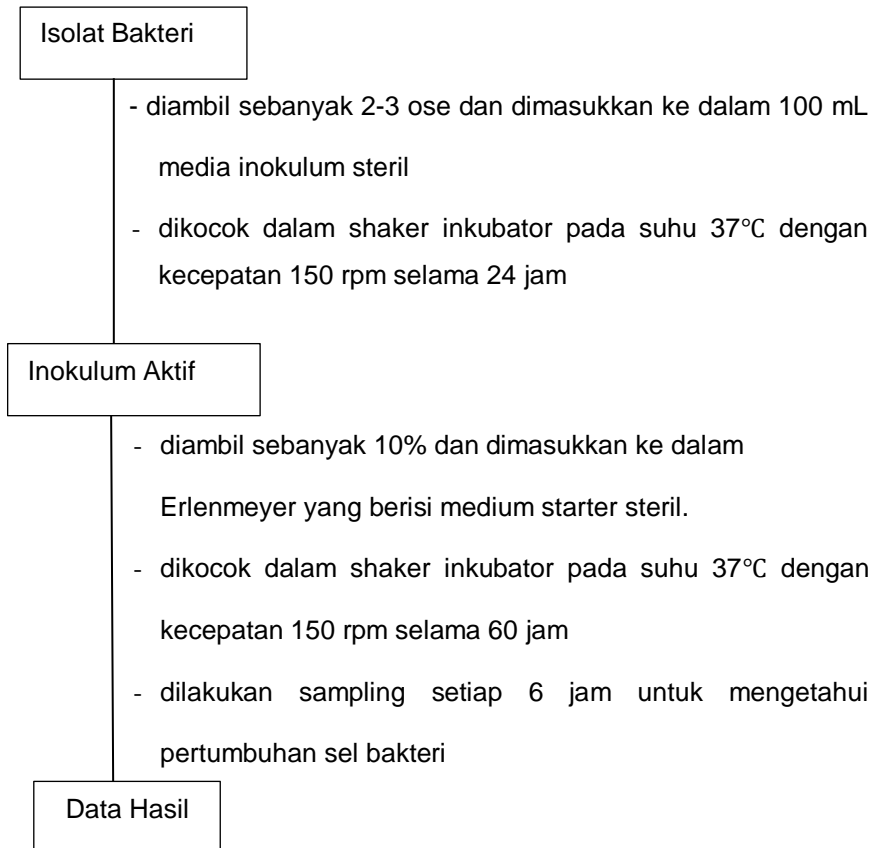


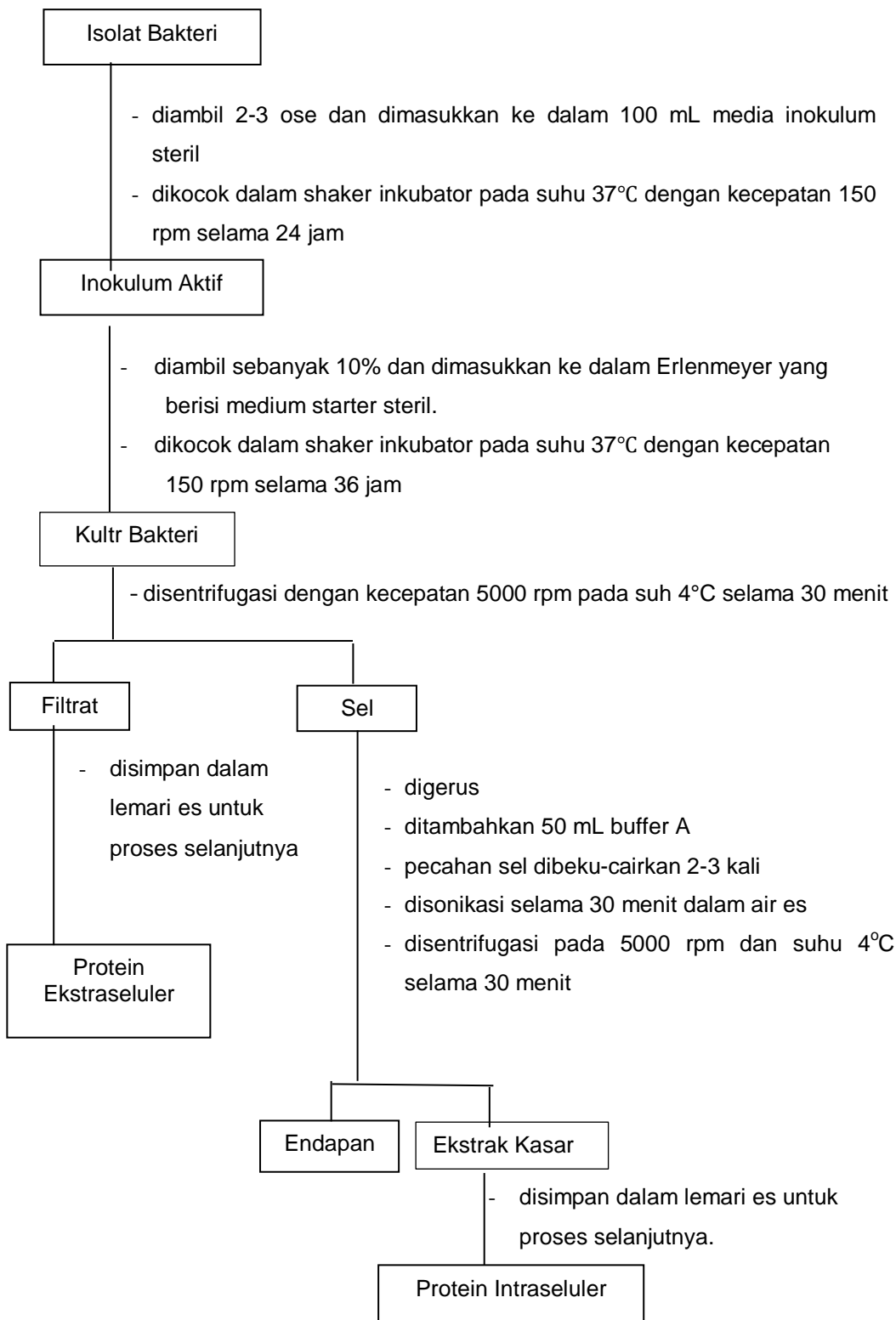
Lampiran 2. Bagan Kerja Penyegaran Sampel dalam Media *Nutrient Broth*

Lampiran 3. Bagan Kerja Isolasi dan Identifikasi Bakteri**a. Isolasi Bakteri****b. Uji Biokimia**

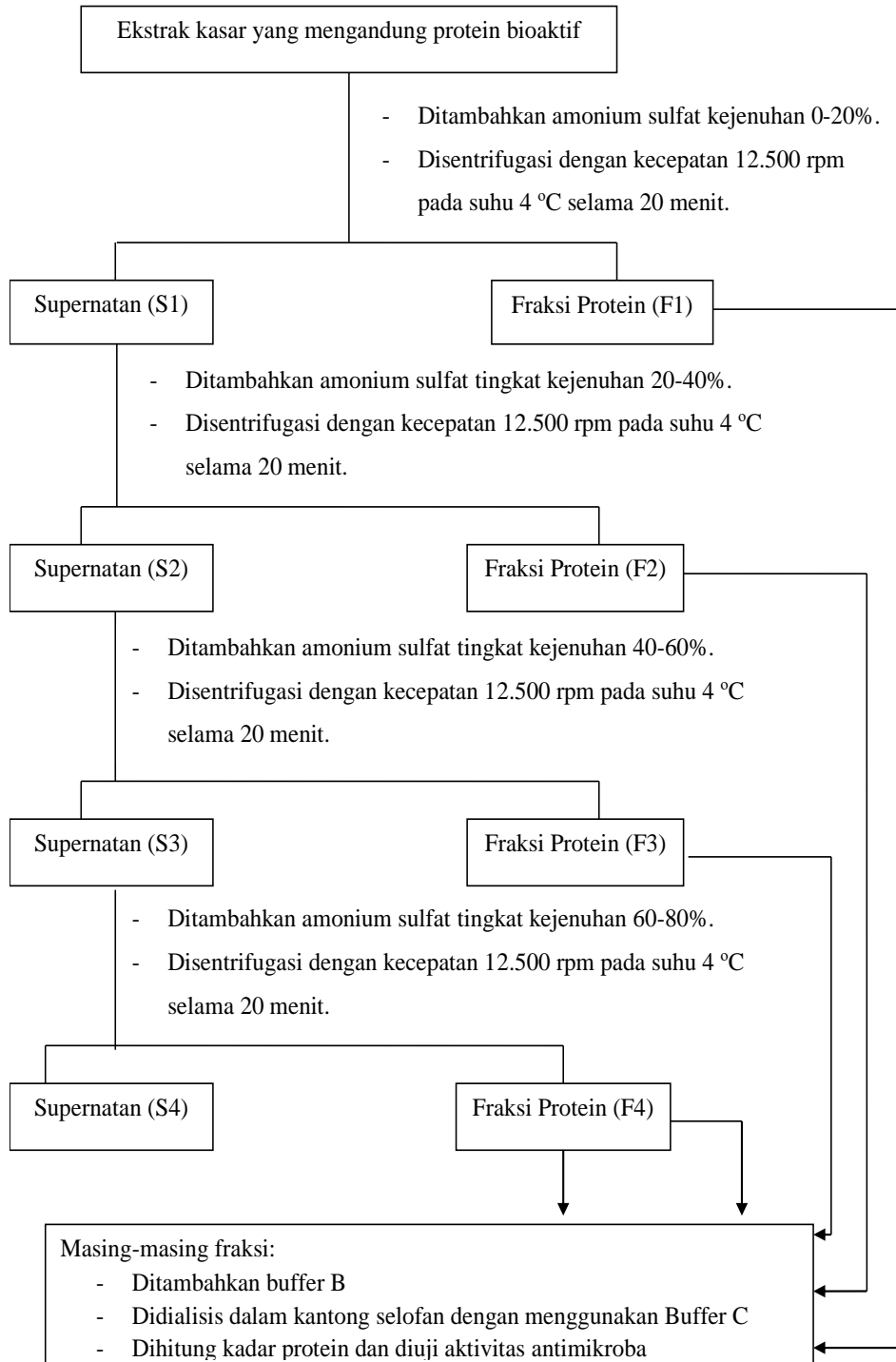
c. Pewarnaan Gram

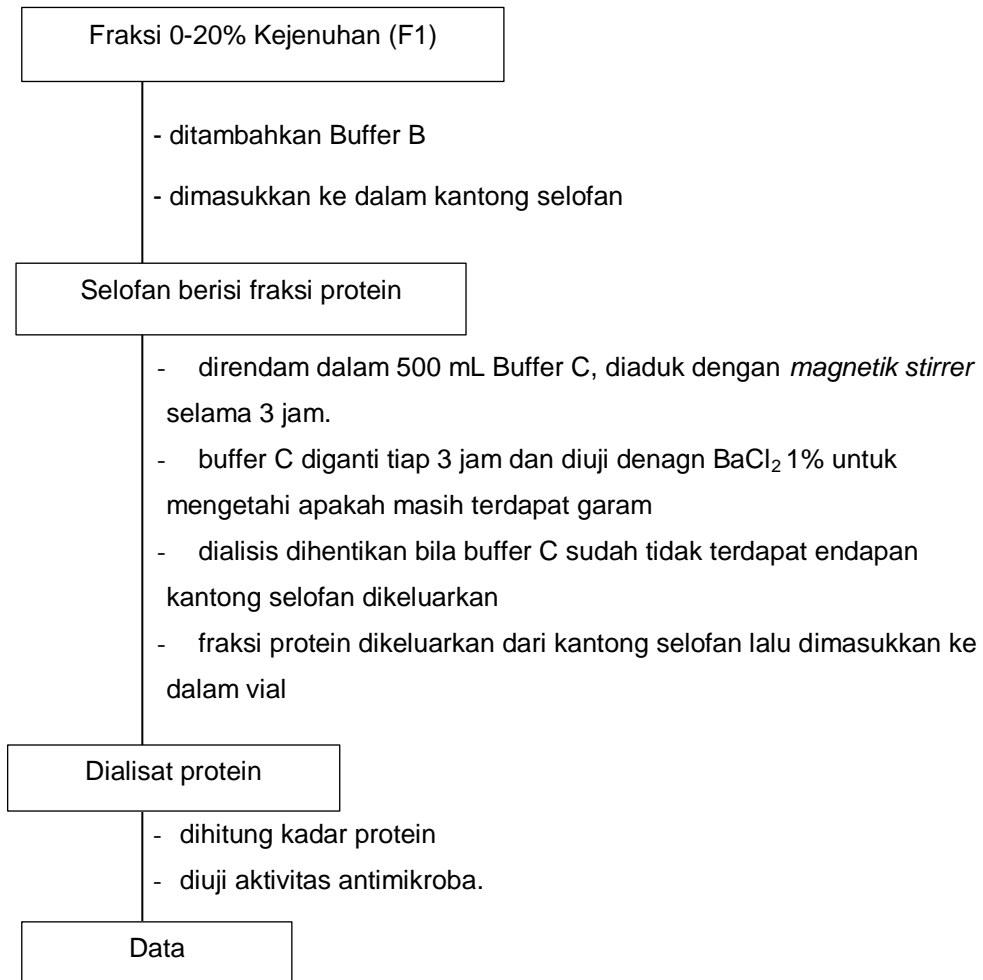


Lampiran 4. Penentuan Waktu Produksi Optimum

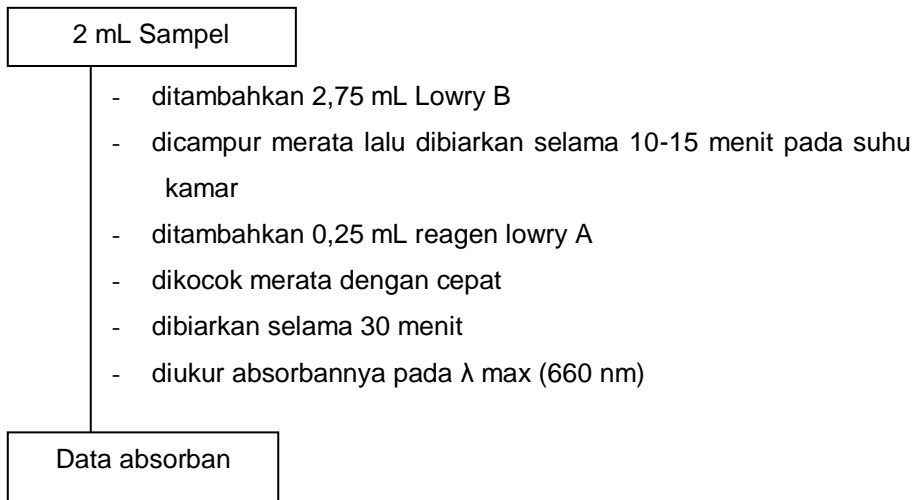
Lampiran 5. Bagan Kerja Produksi dan Ekstraksi Protein Bioaktif

Lampiran 6. Bagan Kerja Fraksinasi Protein Bioaktif dengan Amonium Sulfat

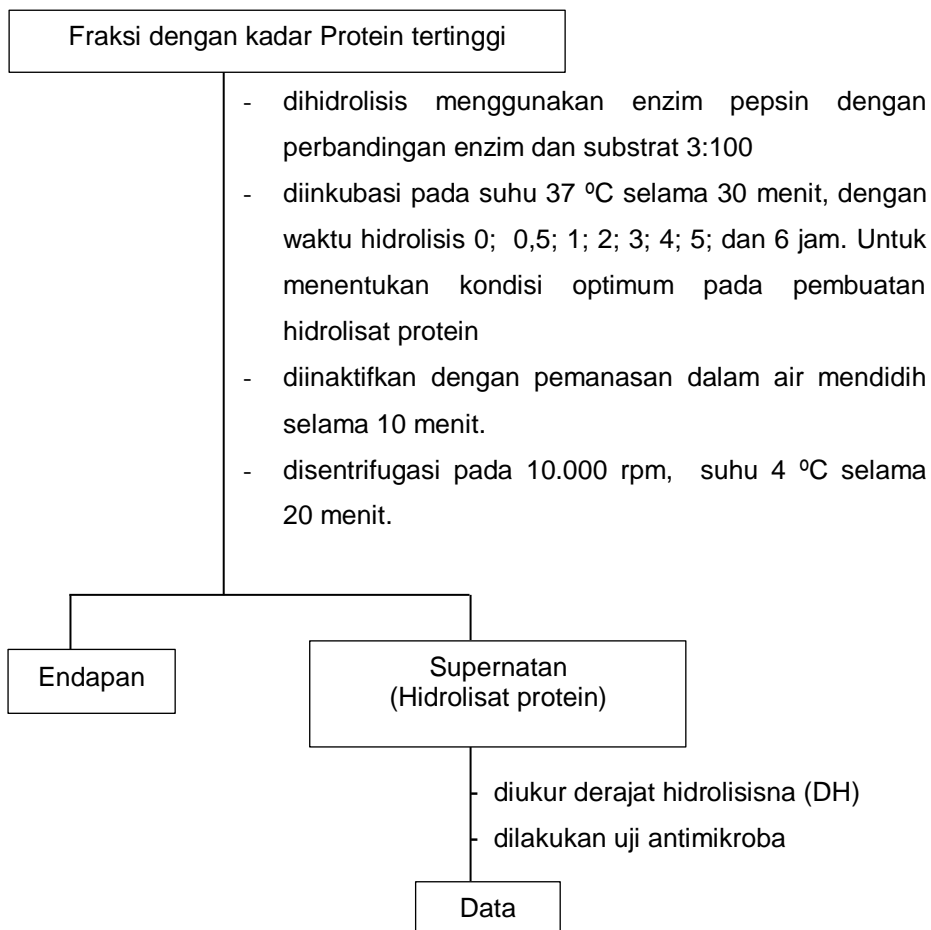


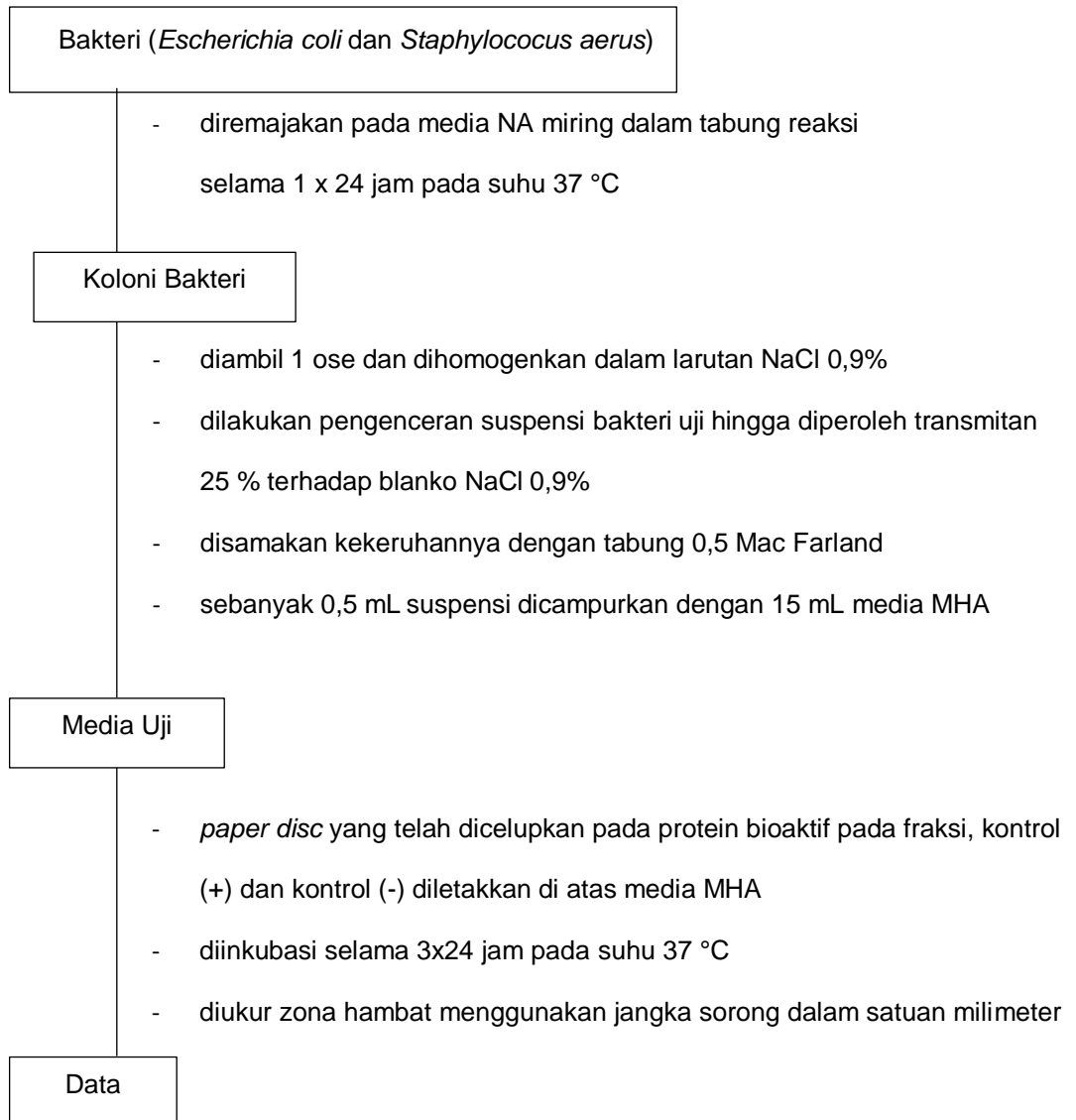
Lampiran 7. Bagan Kerja Dialisis

Catatan: Perlakuan yang sama untuk F2, F3 dan F4

Lampiran 8. Prosedur Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

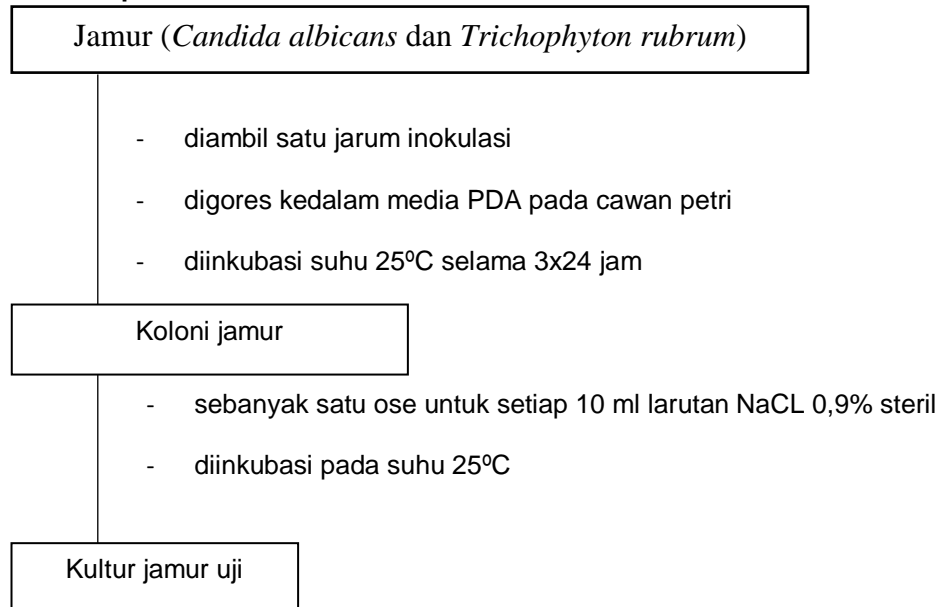
Catatan : Perlakuan yang sama untuk blanko dan larutan standar BSA.

Lampiran 9. Bagan Kerja Hidrolisis Enzimatis Protein

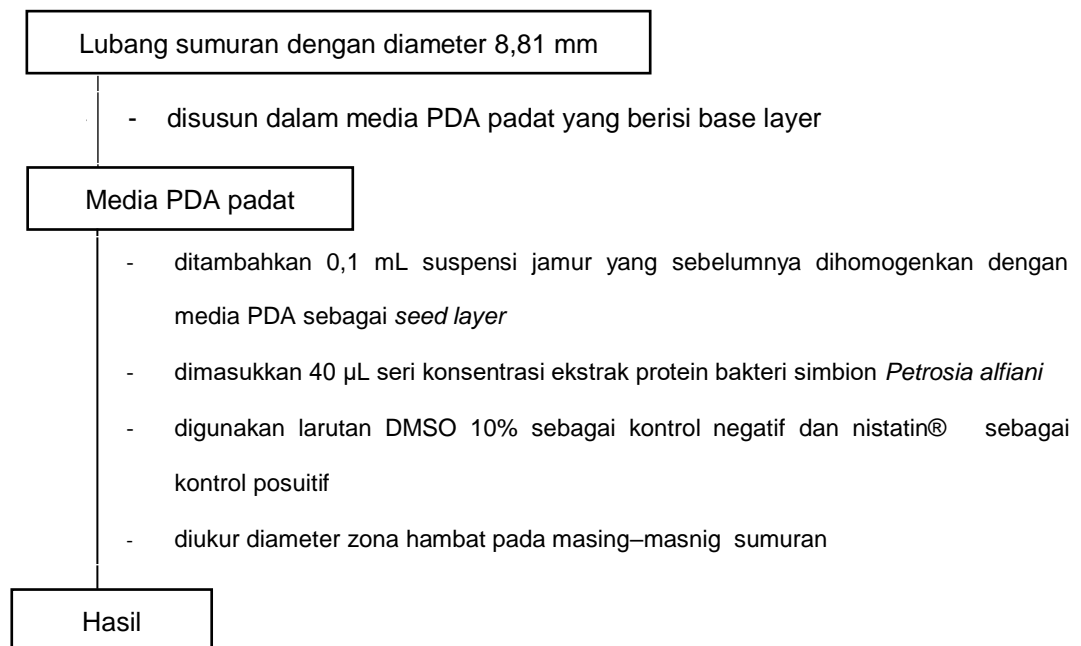
Lampiran 10. Uji Aktivitas Antibakteri

Lampiran 11. Uji Aktivitas Antifungi

a. Persiapan Kultur Jamur



b. Uji Aktivitas Antifungi



Lampiran 12. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

Pereaksi:

1. Pereaksi Lowry A

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

2. Pereaksi Lowry B

Cara pembuatan Lowry B yakni dengan pencampuran Na_2CO_3 2% dalam NaOH 0,1 N, Na-K-Tartat 2%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dengan perbandingan 100 : 1 : 1, dimana diambil larutan Na_2CO_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, dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit
- ditambahkan 0,25 mL Lowry A dan segera dihomogenkan
- 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 13. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl

- A. Pembuatan larutan bufer A (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; NaCl 2 M; CaCl₂ 0,01 M, β-merkaptobetanol 1%, Triton X-100 0,5%)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 6,05 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) 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 gram dan 0,555 gram CaCl₂, β-merkaptobetanol 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; CaCl₂ 0,01 M)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 3,025 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) 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 gram dan 0,2775 gram CaCl₂ dan dicukupkan volumenya sampai 250 mL dengan akuades.

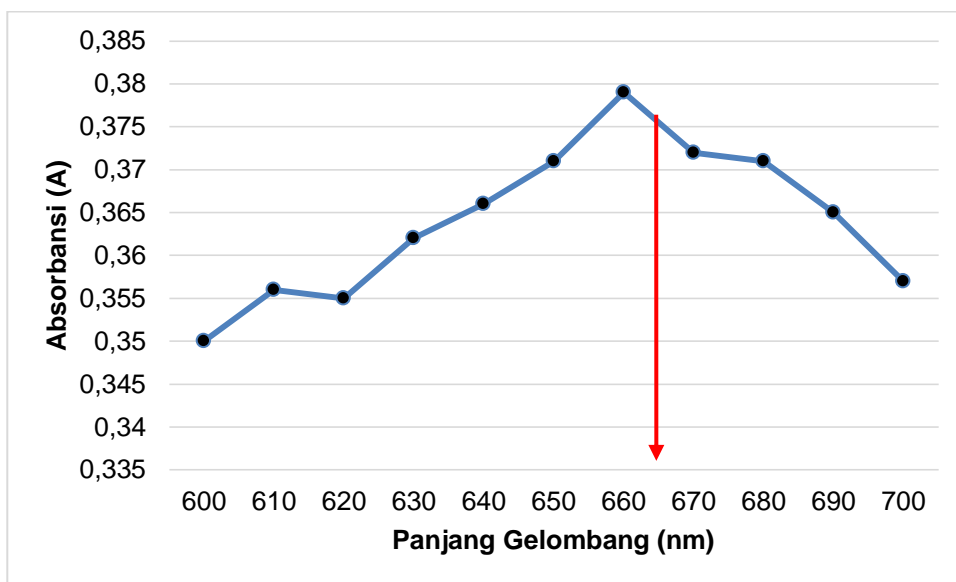
- C. Pembuatan larutan buffer C (Tris-HCl 0,01 M pH 8,3; NaCl 0,2 M; CaCl₂ 0,01 M)

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 0,605 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH₂C(CH₂OH)₃) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 125 mL.
2. Ke dalam 125 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 5,85 gram dan 0,555 gram CaCl₂ dan dicukupkan volumenya sampai 500 mL dengan akuades.

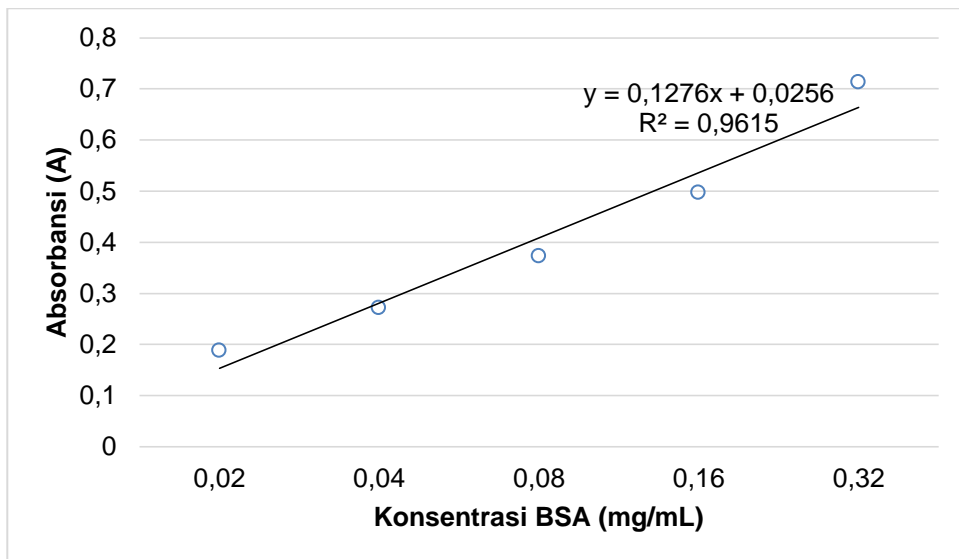
Lampiran 14. Penentuan Serapan Maksimum (λ maksimum)A. Serapan Maksium (λ maksimum) pada Konsentrasi BSA 0,08 mg/mL

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

B. Kurva λ maksimum

Lampiran 15. Kurva Standar *Bovine Serum Albumin* pada λ 660 nm

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



Lampiran 16. 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	0,151	0,893	2,774
2	6	0,163	1,520	4,185
3	12	0,915	1,912	4,655
4	18	0,950	2,618	4,734
5	24	1,100	3,166	4,969
6	30	1,190	3,636	5,204
7	36	1,230	4,755	5,673
8	42	1,110	4,107	4,734
9	48	0,700	3,088	4,342

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

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0,037	0,893
2	6	0,045	1,520
3	12	0,050	1,912
4	18	0,059	2,618
5	24	0,066	3,166
6	30	0,072	3,636
7	36	0,086	4,755
8	42	0,078	4,107
9	48	0,065	3,088

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 0,1276x + 0,0256$, dimana $y = 0,086$ adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui $y = 0,086$, maka:

$$0,086 = 0,1276x + 0,0256$$

$$0,1276x = 0,086 - 0,0256$$

$$0,1276x = 0,0604$$

$$x = 0,4755 \text{ mg/mL}$$

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

$$x = 0,4755 \text{ mg/mL} \times 10$$

$$= 4,755 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 18. Konsentrasi Protein pada Sampel Ekstrak Kasar Intraseluler ($\lambda 660 \text{ nm}$)

No	Waktu Fermentasi (jam)	Absorban	Kadar Protein (mg/mL)
1	0	0,061	2,774
2	6	0,079	4,185
3	12	0,085	4,655
4	18	0,086	4,734
5	24	0,089	4,969
6	30	0,092	5,204
7	36	0,098	5,673
8	42	0,086	4,734
9	48	0,081	4,342

Contoh perhitungan penentuan kadar protein:

Data absorban yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan standar $y = 0,1276x + 0,0256$, dimana $y = 0,098$ adalah absorbansi protein ekstraseluler.

Diketahui $y = 0,098$, maka:

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

$$0,1276x = 0,098 - 0,0256$$

$$0,1276x = 0,0724$$

$$x = 0,5673 \text{ mg/mL}$$

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

$$x = 0,5673 \text{ mg/mL} \times 10$$

$$= 5,673 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 19. Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan pada Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan

Jenis Protein	Fraksi Protein	Bobot Amonium Sulfat (g)
Protein Ekstraseluler	F1	3,18
	F2	3,503
	F3	3,84
	F4	4,257
Protein Intraseluler	F1	3,18
	F2	3,616
	F3	4,08
	F4	4,515

Penambahan Amonium sulfat:

Protein Ekstraseluler

$$F1 = \frac{30 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ g} = 3,18 \text{ gram}$$

$$F2 = \frac{31 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 3,503 \text{ gram}$$

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

$$F4 = \frac{33 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ g} = 4,257 \text{ gram}$$

Protein Intraseluler

$$F1 = \frac{30 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ g} = 3,18 \text{ gram}$$

$$F2 = \frac{32 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ g} = 3,616 \text{ gram}$$

$$F3 = \frac{34 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ g} = 4,08 \text{ gram}$$

$$F4 = \frac{35 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ g} = 4,515 \text{ gram}$$

Lampiran 20. 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
	Penambahan amonium sulfat kristal (gram) untuk pada 1 liter larutan																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70

Lampiran 21. 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	0,061	0,2774	10	2,774
	F2	0,042	0,1285	10	1,285
	F3	0,077	0,4028	10	4,028
	F4	0,045	0,1520	10	1,520
Protein Intraseluler	F1	0,091	0,5125	10	5,125
	F2	0,273	1,9388	-	1,938
	F3	0,538	4,0156	-	4,015
	F4	0,459	3,3965	-	3,396

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

$$X_1 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,061 - 0,0256}{0,1276} = 0,2774 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,042 - 0,0256}{0,1276} = 0,1285 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,077 - 0,0256}{0,1276} = 0,4028 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,045 - 0,0256}{0,1276} = 0,1520 \text{ mg/mL}$$

Protein Intraseluler

$$X_1 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,091 - 0,0256}{0,1276} = 0,5125 \text{ mg/mL}$$

$$X_2 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,273 - 0,0256}{0,1276} = 1,9388 \text{ mg/mL}$$

$$X_3 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,538 - 0,0256}{0,1276} = 4,0156 \text{ mg/mL}$$

$$X_4 = \frac{y - 0,0256}{0,1276} = \frac{0,459 - 0,0256}{0,1276} = 3,3965 \text{ mg/mL}$$

Lampiran 22. 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	5	2,774	13,87
	F2	6	1,285	7,71
	F3	6	4,028	24,168
	F4	4	1,520	6,08
Protein Intraseluler	F1	4	5,125	20,5
	F2	4	1,938	7,752
	F3	3	4,015	12,045
	F4	4	3,396	13,584

Penentuan total Protein dengan rumus:

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

Protein Ekstraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 5 \text{ mL} \times 2,774 \text{ mg/mL} = 13,87 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 6 \text{ mL} \times 1,285 \text{ mg/mL} = 7,71 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 6 \text{ mL} \times 4,028 \text{ mg/mL} = 24,168 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 4 \text{ mL} \times 1,520 \text{ mg/mL} = 6,08 \text{ mg}$$

Protein Intraseluler

$$\text{Fraksi 0-20 \%} = 4 \text{ mL} \times 5,125 \text{ mg/mL} = 20,5 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 20-40 \%} = 4 \text{ mL} \times 1,938 \text{ mg/mL} = 7,752 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 40-60 \%} = 3 \text{ mL} \times 4,015 \text{ mg/mL} = 12,045 \text{ mg}$$

$$\text{Fraksi 60-80 \%} = 4 \text{ mL} \times 3,396 \text{ mg/mL} = 13,584 \text{ mg}$$

Lampiran 23. Hidrolisis Protein

1. Fraksi 40-60% (F3) Ekstraseluler

Waktu Hidrolisis (jam)	Protein Terlarut (mg/mL)		Protein Total (mg/mL)		DH (%)
	Absorban	Kadar Protein	Absorban	Kadar Protein	
0	0,613	4,6034	1,123	8,6003	53,52
0,5	0,621	4,6661	1,104	8,4514	55,21
1	0,727	5,4969	1,341	10,3088	53,32
2	0,752	5,6928	1,369	10,5282	54,07
3	0,841	6,3903	1,447	11,1395	57,36
4	0,938	7,1505	1,689	13,0361	54,85
5	0,833	6,3276	1,531	11,7978	53,63
6	0,854	6,4922	1,323	10,1677	63,85

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	0,521	3,8824	0,802	6,0846	63,80
0,5	0,512	3,8119	0,813	6,1708	61,77
1	0,493	3,6630	0,829	6,2962	58,17
2	0,538	4,0157	0,817	6,2022	64,74
3	0,547	4,0862	0,822	6,2414	65,46
4	0,615	4,6191	0,927	7,0643	65,38
5	0,612	4,5956	0,912	6,9467	65,29
6	0,592	4,4389	0,903	6,8762	64,55

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

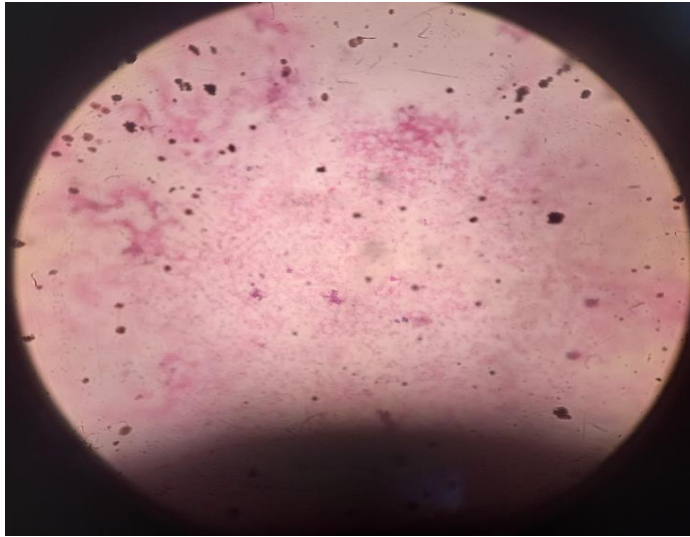
Lampiran 24. Isolat Bakteri

Endofit

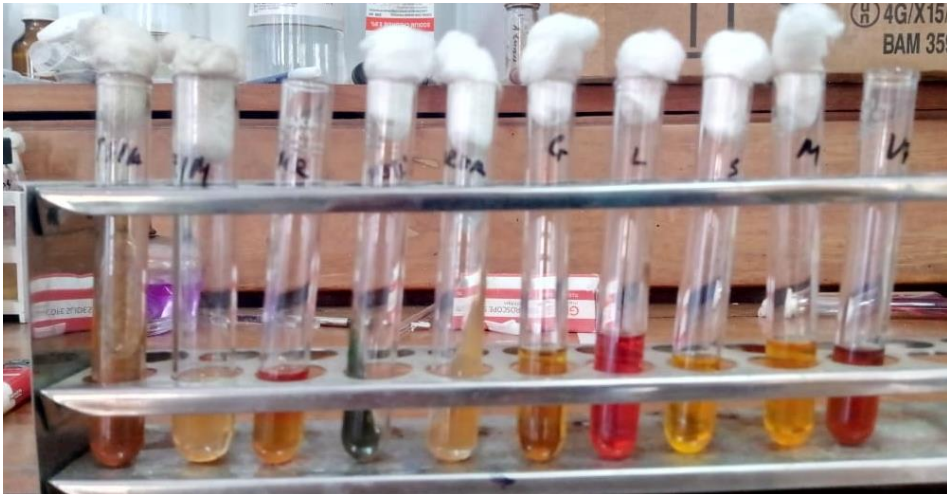
Keterangan kode isolat:

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

*Isolat di atas dipilih berdasarkan kestabilan zona bening setelah inkubasi 2x24 jam dan digores kuadran beberapa kali hingga diperoleh isolat murni.

Lampiran 25. Hasil Pewarnaan Gram dan Uji Biokimia Sederhana

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



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

Lampiran 26. Klasifikasi Spons *Petrosia alfiani* dan bakteri *E. hafniae* PA 8(3)

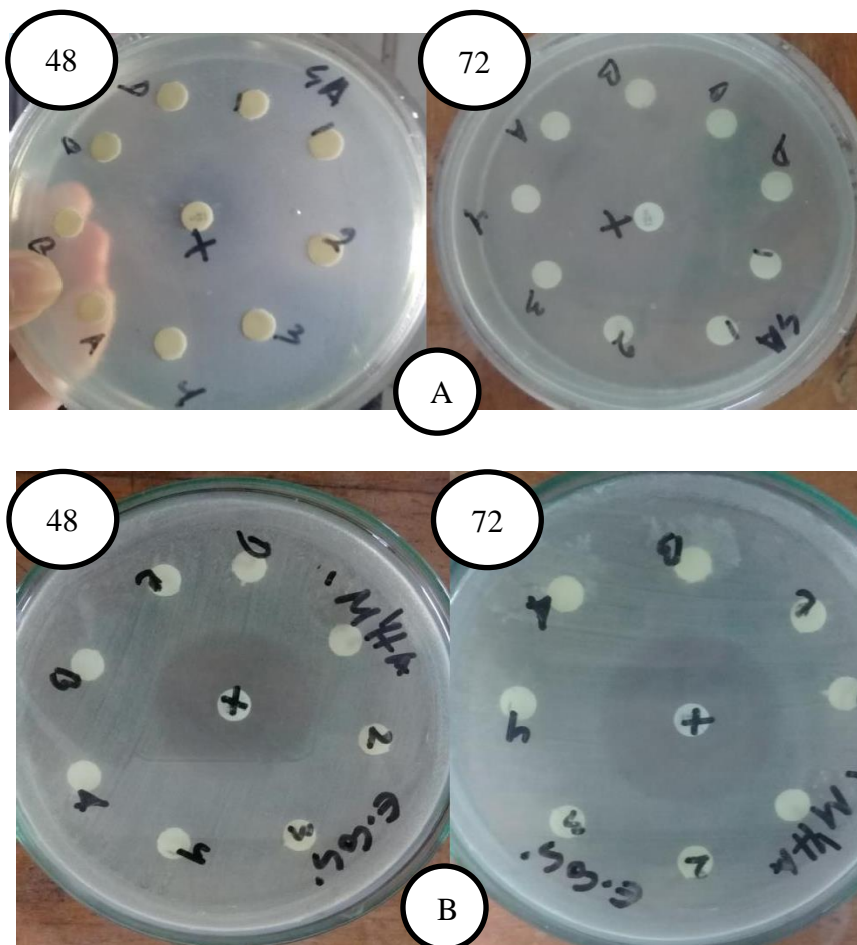
Klasifikasi spesies spons menurut de Voogd dan Van Soest (2002) yang menjadi objek penelitian ini adalah sebagai berikut :

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

Klasifikasi Bakteri *E. hafniae* PA 8(3)

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Order : Enterobacterales
Family : Enterobacteriaceae / Hafniaceae
Genus : *Hafnia*
Species : *Enterobacter hafniae*

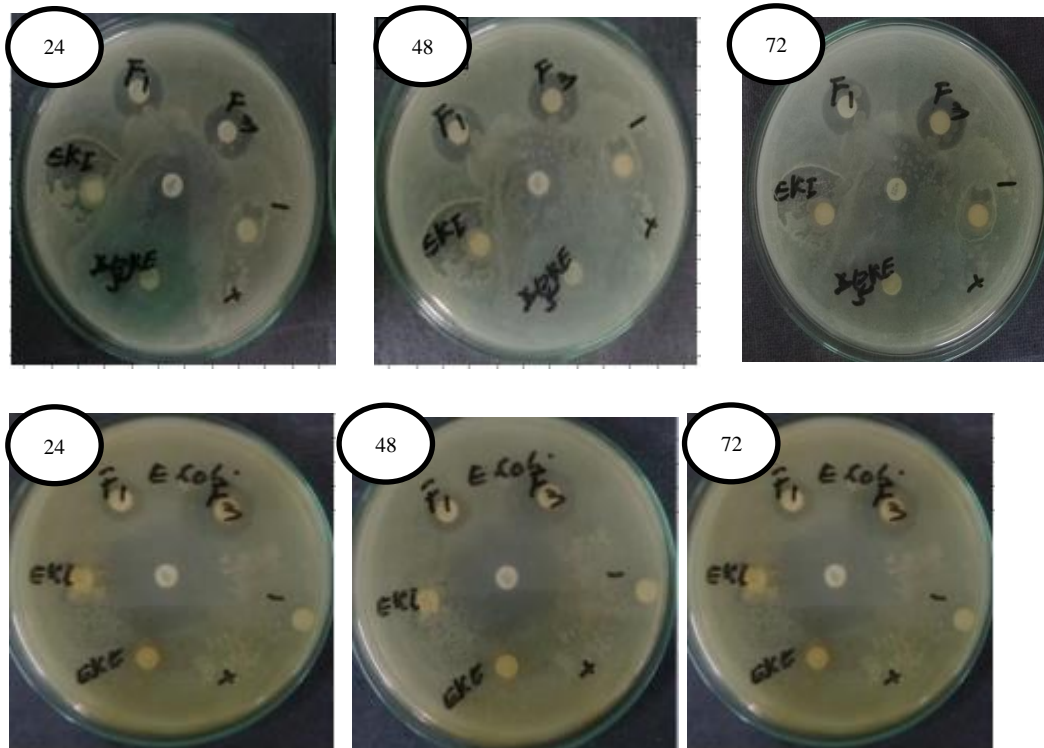
Lampiran 27. Uji Antibakteri Fraksi Protein *E. hafniae* PA 8(3)



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

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

Lampiran 28. Uji Antibakteri Hidrolisat Protein *E. hafniae* PA 8(3)

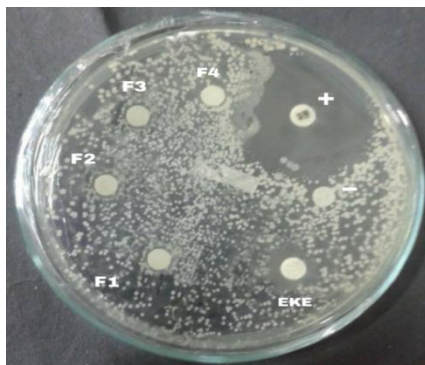


Diameter zona hambatan hidrolisat protein F1 dan F3 terhadap pertumbuhan *S. aureus* (A) dan *E. coli* (B) pada masa inkubasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam.

Keterangan:

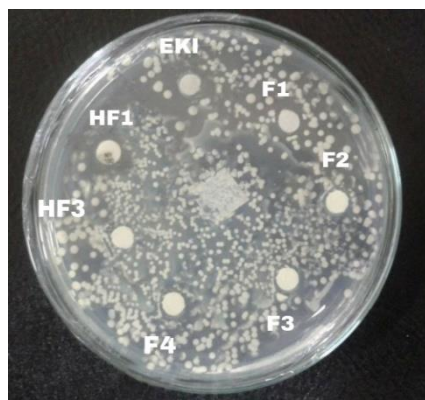
- F1 : Hidrolisat Protein F1
- F3 : Hidrolisat Protein F3
- EKE : Ekstrak kasar ekstraseluler
- EKI : Ekstrak kasar intraseluler
- + : Kontrol positif
- : Kontrol negatif

Lampiran 29. Uji Antifungi Fraksi Protein dan Hidrolisat Protein *E.hafniae* PA8(3)



Diameter zona hambatan protein ekstraseluler terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*

Keterangan:	F1	: Fraksi protein ekstraseluler F1
	F2	: Fraksi protein ekstraseluler F2
	F3	: Fraksi protein ekstraseluler F3
	F4	: Fraksi protein ekstraseluler F4
	EKE	: Ekstrak kasar ekstraseluler
	+	: Kontrol positif
	-	: Kontrol negatif



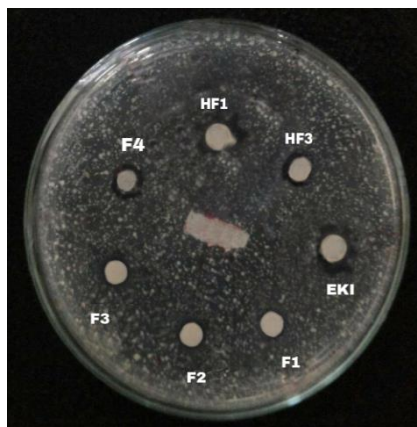
Diameter zona hambatan protein intraseluler dan hidrolisat protein F1 dan F3 terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*

Keterangan:	F1	: Fraksi protein intraseluler F1
	F2	: Fraksi protein intraseluler F2
	F3	: Fraksi protein intraseluler F3
	F4	: Fraksi protein intraseluler F4
	HF3	: Hidrolisat Protein ekstraseluler F3
	HF1	: Hidrolisat Protein intraseluler F1
	EKI	: Ekstrak kasar intraseluler



Diameter zona hambatan protein ekstraseluler terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum*

Keterangan:	F1	: Fraksi protein ekstraseluler F1
	F2	: Fraksi protein ekstraseluler F2
	F3	: Fraksi protein ekstraseluler F3
	F4	: Fraksi protein ekstraseluler F4
	EKE	: Ekstrak kasar ekstraseluler
	+	: Kontrol positif
	-	: Kontrol negatif



Diameter zona hambatan protein intraseluler dan hidrolisat protein F1 dan F3 terhadap pertumbuhan jamur *Trichophyton rubrum*

Keterangan:	F1	: Fraksi protein intraseluler F1
	F2	: Fraksi protein intraseluler F2
	F3	: Fraksi protein intraseluler F3
	F4	: Fraksi protein intraseluler F4
	HF3	: Hidrolisat Protein ekstraseluler F3
	HF1	: Hidrolisat Protein intraseluler F1
	EKI	: Ekstrak kasar intraseluler

Lampiran 30. Dokumentasi



Pengambilan Sampel



Pembuatan Media



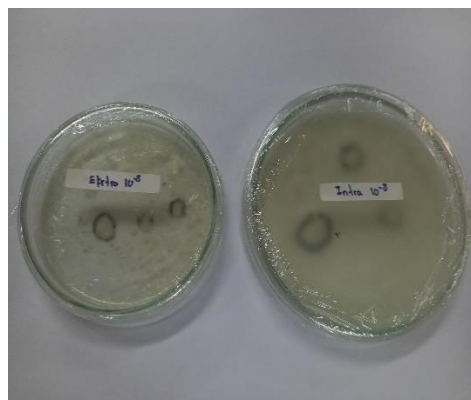
Pembuatan Buffer



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 Aktivitas Anti Bakteri