

## DAFTAR PUSTAKA

- Amir, I., dan Budiyanto, A., 1996, Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum, *Oseana*, **21** (2), 15-31.
- 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.
- Astutiningsih, C., Limantara, L., dan Radjasa, O.K., 2010, Uji Mutagenik  $\beta$ -Karoten Alga Merah *Rhodomyenia Pseudopalmata* terhadap Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi 7,12-Dimetilbenzen (A) Antrasen (DMBA), *Biosaintifika*, **2** (1), 1-9.
- BD Biosciences., 2009, Hydrolysis to hydrolysate, <http://bdbiosciences.com> [14 Februari 2011].
- Dali, S., Natsir, H., Usman, H., dan Ahmad, A., 2011, Bioaktivitas Antibakteri Fraksi Protein Alga Merah *Gelidium amansii* dari Perairan Cikoang Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan, *Majalah Farmasi dan Farakologi*, **15** (1): 47-52.
- Damodaran S., 1996, Amino Acids, Peptides and Protein, Di dalam: Fennema OR, editor. *Food Chemistry*. Ed ke-3, New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dennison, C., 2002, A Guide to Protein Isolation, *Kluwer Academic Publisher*, New York.
- De voogd, N. J., and 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.
- Ecos., 2007, *Indonesia declares marine reserves biodiversity hotspot*, Conservation International, ISSN.,03114546, (137)
- Fukuda, Y., Sugahara, T., Ueno, M., Fukuta, Y., Ochi, Y., Akiyama, K., Miyazaki, T., Masuda, S., Kawakubo, A., and Kato, K, 2008, The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo, *Anti-Cancer Drugs*, **17** (8), 943-947.
- Gauthier SF, Vachon C, Jones JD, Savoie L. 1982. Assessment of protein digestability in vitro enzymatic hydrolysis with simultaneous dialysis. *Nutr* 112: 1718-1725.
- .C.,Desy, M.H.M., dan Nasprianto., 2018, Biodiversitas Makroalga di perairan Pesisir Tongkaina, Kota Manado, *Jurnal Ilmiah Platax*, **6** (1): 60-173.



- 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)*” *Bul. Penel. Kesehatan*, **34** (3).
- Ngo D-H, Vo T-S, Ngo D-N, Wijesekara I and Kim S-K 2012 Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organism *International Journal of Biological Macromolecules* **51** 378-83.
- Nurhajrah, 2013, *Isolasi dan Identifikasi Protein Bioaktif dari Alga Merah Eucheema spinosum*, Jurnal tidak diterbitkan, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi selatan.
- Ningrum, R.D.S., Hardoko, dan Bambang , B.S., 2013, Pengaruh Ekstrak Kasar Fucoidan Alga Coklat *Sargassum polycystum* terhadap Vibialitas Sel hela, *THPi Student Journal*, **1** (1), 83-92.
- Oktarina, E., 2017, Alga : Potensinya Pada Kosmetik Dan Biomekanismenya (Algae: Potency On Cosmetic And Its Biomechanism), *Majalah Teknologi Agro Industri (Tegi)*, **9** (2).
- Ohba, M., Mizuki, E., and Uemori, A., 2009, Parasporin A New Arurcancer Protein Group From Bacillus Thuringiensis, *Internasional Journal of Cancer Researc and Trearmen*, **29** (1): 927-933.
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes 3rd ed.* West Sussex: Ellis Horwood Limited.
- Panjaitan, R, B., 2011, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alyxiaecortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test (BST)*, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta.
- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, F. M. T., 2005, *Dasar-Dasar Biokimia*, UI-Press, Jakarta.
- Puji, A., Sukardiman, dan Fadjri, H, T., 2012, Uji Sitotoksisitas 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*, Thesis Program Magister Ilmu Lingkungan Program Pasca Sarjana, Universitas Diponegoro Semarang, Semarang.
- Pachmat R., 1999, *Pemanfaatan Produk Alam Algae Laut untuk Obat dan Kosmetik*, Makalah disajikan dalam Prosidings Pra Kipnas VII Forum Komunikasi I Ikatan Fikologi Indonesia (IFI), Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Serpong, 08 September.

F., 1988, *What Are Sponge?*, Quesland Museum, Australia.



- Rachmat R. 2008. Penelitian Pengembangan Obat dari Produk Alami Laut. Orasi Pengukuhan Profesor Riset Bidang Produk Alami Laut. LIPI.
- 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 Pertania*, **1** (16).
- Ruppert EE, dan Barnes RD. 1991. *Invertebrates Zoology*. Ed ke-6. Philadelphia. Saunders College Publishing.
- Rutherford SM. 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of protein hydrolysates: a review. *JAOAC Int.* **93** (5): 1515-1522.
- Sadarun, B., Malaka, H., Wahyuni., dan Sahidin, Toksisitas Akut Senyawa Metabolit Sekunder dari Spons Laut *Clathriasp*, *Majalah Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, **3** (1): 6-9.
- Scopes, R. K., 1994, Protein Purification: Principles and Practice 3rd ed. New York: Springer-Verlag.
- Smit, A. J., 2004, Medical and Pharmaceutical Uses of Seaweed Natural Product: A Review, *Journal of Applied Phycology*, **16** (4), 245-262.
- Sheih, C., Fang, T.J., Wu, T.K., and Lin, P.H., 2010, Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste, *J. Agric. Food Chem*, **58**, 1202-1207.
- Srisadono, A., 2008, Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (*piper betle* linn) Sebagai Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Tes (BLT), *Artikel Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas kedokteran diponegoro, semarang.
- Sudjadi dan Sismindari., 2011, Perkembangan Ribosome-Inactivating Protein (RIP) Sebagai Antikanker, *Traditional Medicine Journal*, **16**: 1-6.
- Suhirman Shinta, *et. al*, Uji Toksisitas Ekstrak Lempuyung Gajah (*Zingiberzerumbet*) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach), *Bul. Litro*, **18** (1).
- Sumich, J.L., 1992, Introduction to the Biology of Marine Life, Wmc. Brown Company Publisher Iowa.
- Sumilat, A. D., 2017, Aktivitas Spons Laut *Lamellodysidea Herbacea* Dari Perairan Malalayang, *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*, (1): 1-7.
- nti, N. W. S., Suaniti, N, M., danSwantara, M, D., 2013, Identifikasi Dan Uji Aktivitas Antikanker Ekstrak Spons *Ianthellabasta* Terhadap Larva *artemiasalina*L, *Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*, **1** (1): 14-19.



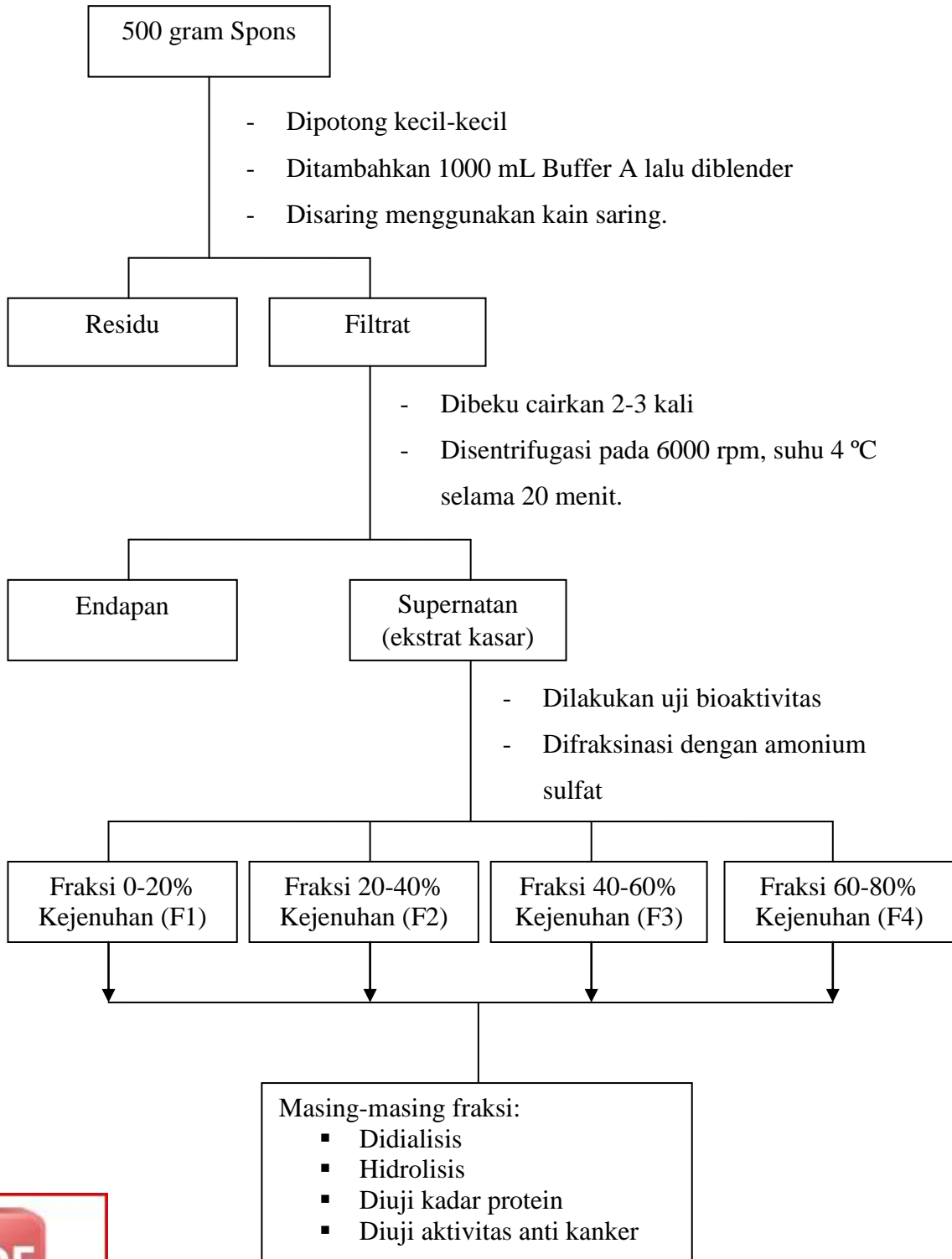
Trainor, F.R., 1978, *Introductory Phycology*, New York: Scientific Publication

Warren L. 1982. *Encyclopedia of Marine Invertebrates*. Di dalam: Walls JG, editor. 15-28.

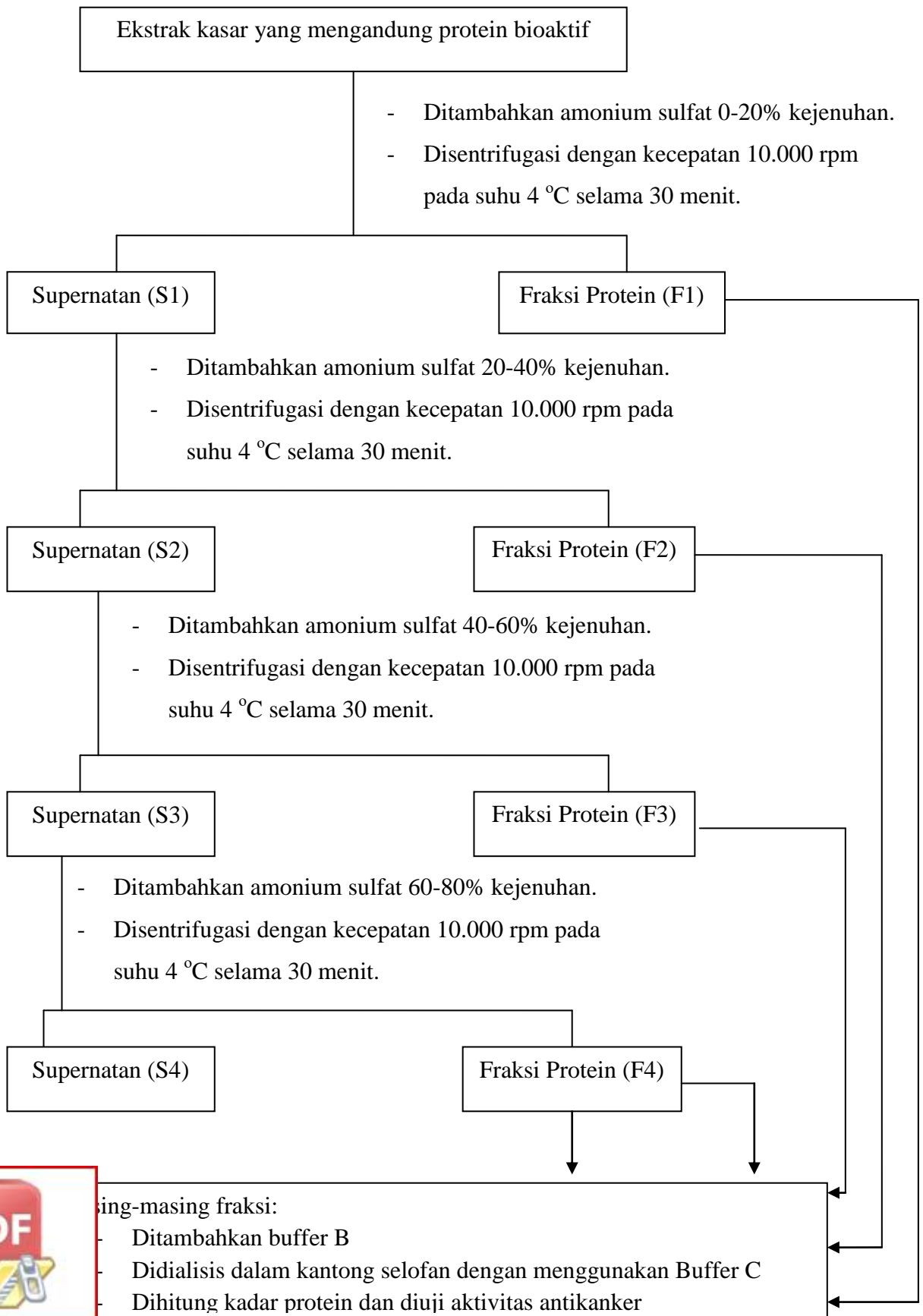
World Health Organization, 2012, *Cancer* (online), (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, diakses 7 November 2018).



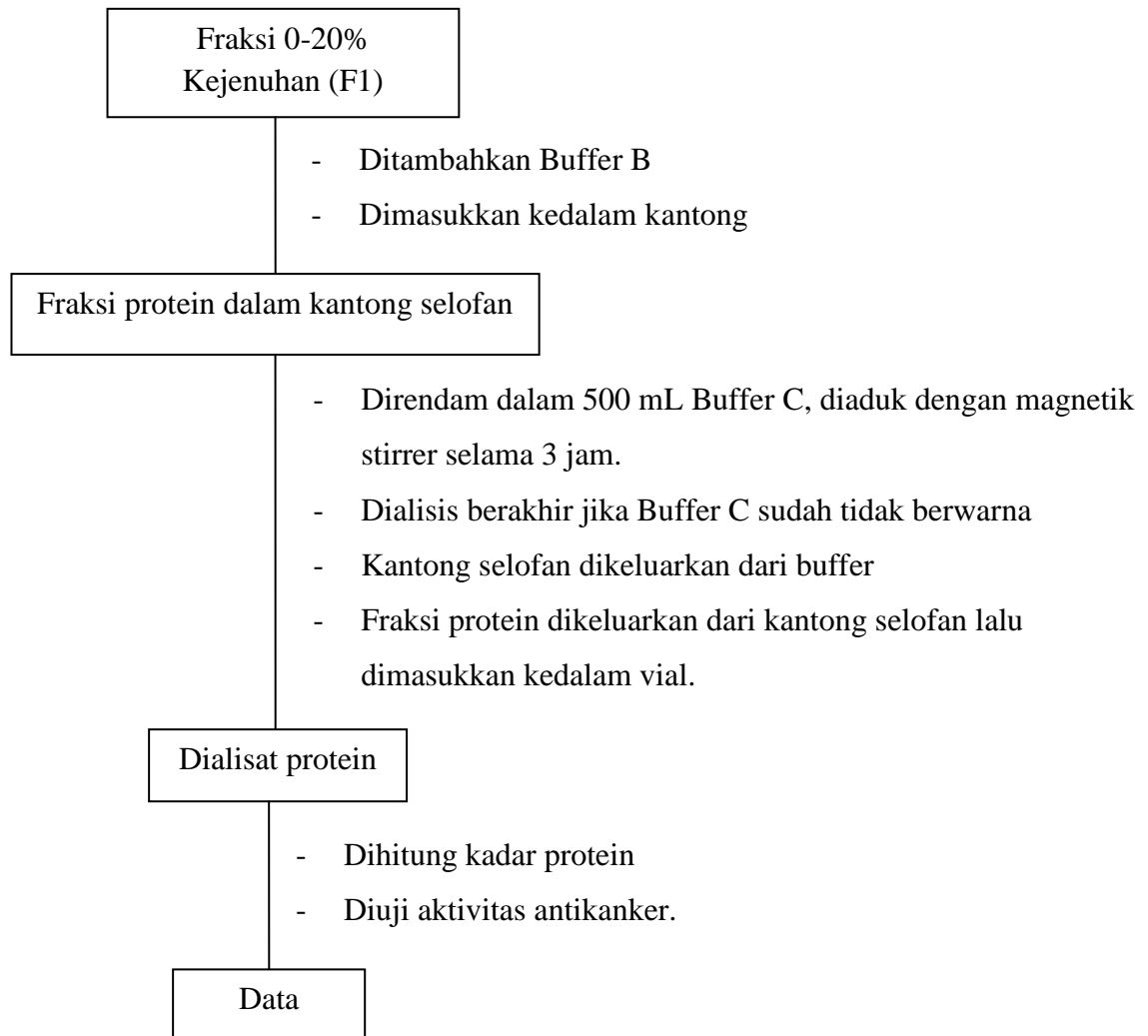
**Lampiran 1.** Bagan Kerja Isolasi, Pemurnian dan Uji Bioaktivitas Protein Bioaktif dari Spons



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



### Lampiran 3. Skema dialisis

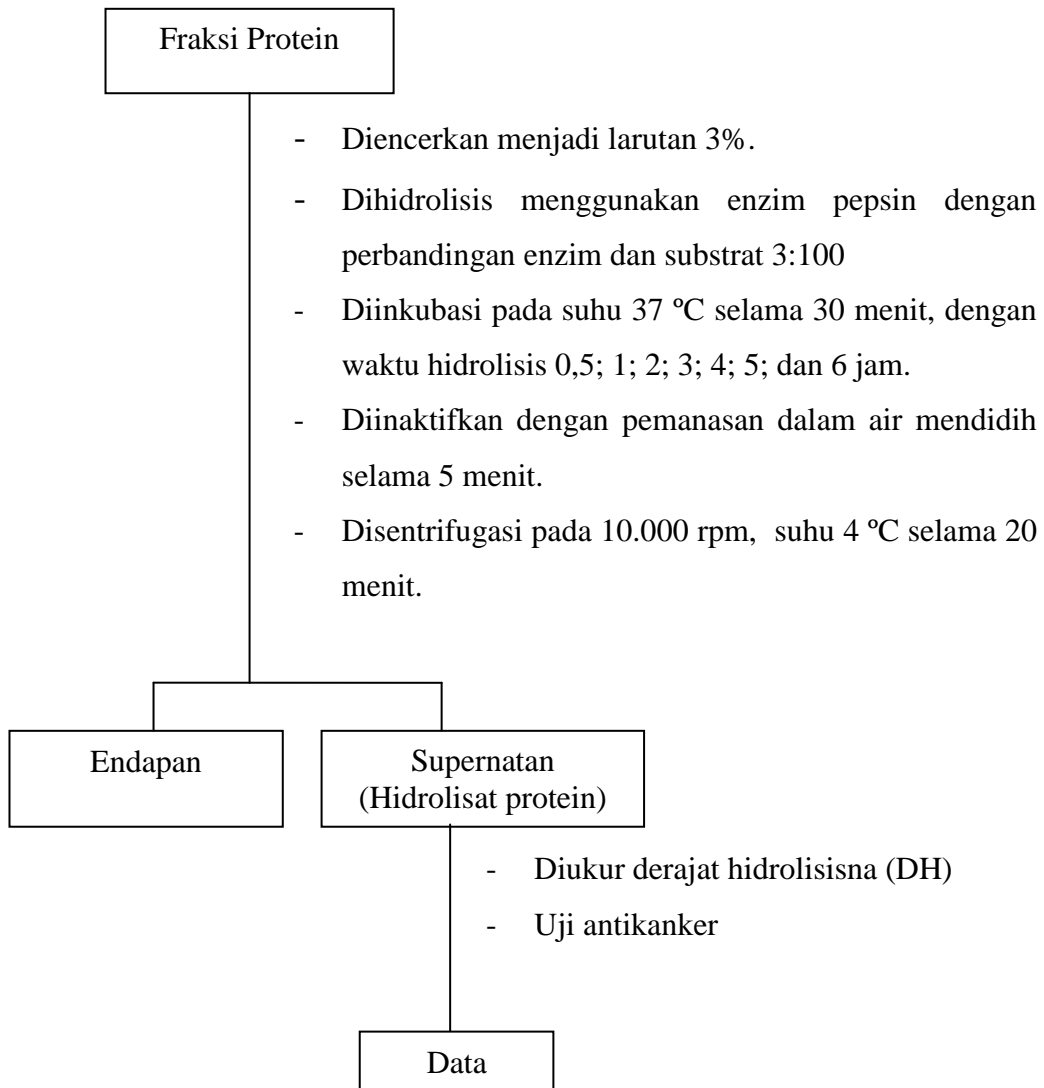


Catatan:

Perlakuan yang sama untuk F2, F3 dan F4

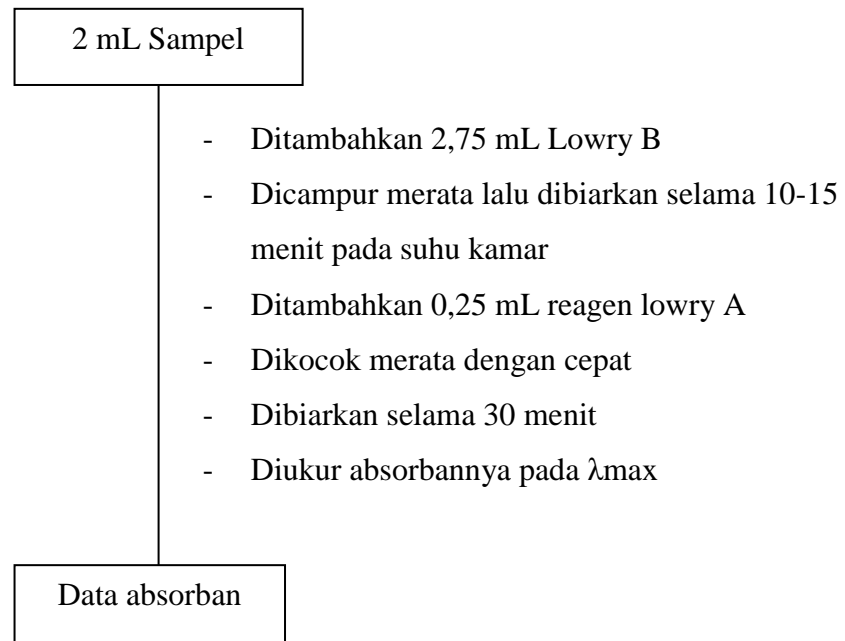


#### Lampiran 4. Hidrolisis protein



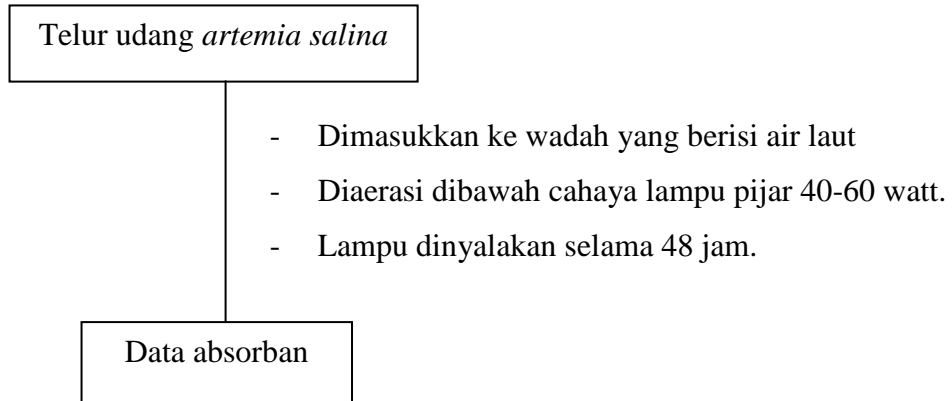


## Lampiran 5. Penentuan kadar protein

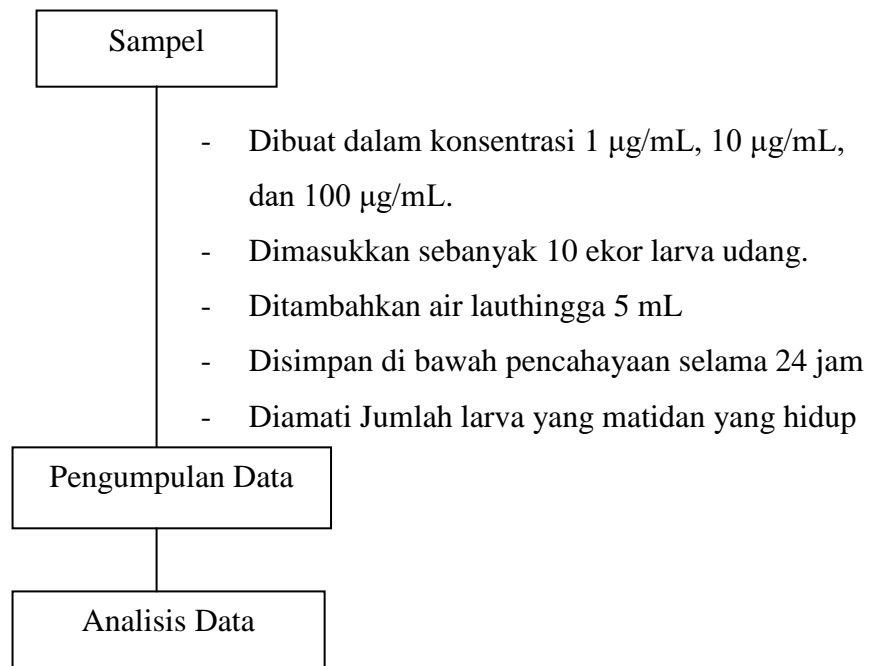


## Lampiran 6. Uji Antikanker Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

### 1. Penyiapan larva udang



### 2. Pelaksanaan uji



Catatan:

yang sama dilakukan juga pada Buffer B tanpa sampel sebagai kontrol dan vinkristin sebagai kontrol positif.



## Lampiran 7. Pembuatan Larutan Buffer tris-HCl

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

Prosedur pembuatan larutan:

1. Ditimbang 12,1 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 250 mL.
2. Ke dalam 250 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 117 gram dan 1,11 gram CaCl<sub>2</sub>, β-mercaptoetanol 10 mL dan triton X-100 5 mL dan dicukupkan volumenya sampai 1000 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 gram 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.

Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 2,925 gram dan 0,2775 gram 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 12,1 gram Tris (Hidroksimetil) aminometana (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) lalu dilarutkan dengan akuades sampai 250 mL.
2. Ke dalam 250 mL larutan Tris (Hidroksimetil) aminometana ditambahkan HCl 1 M sedikit demi sedikit sambil diatur pHnya hingga mencapai 8,3.
3. Selanjutnya ditambahkan NaCl sebanyak 11,7 gram dan 1,11 gram CaCl<sub>2</sub> dan dicukupkan volumenya sampai 1000 mL dengan akuades.



## Lampiran 8. Penentuan Protein dengan Metode Lowry

Pereaksi:

### 1. Pereaksi Lowry A

Pada pembuatan Lowry A yakni dengan pencampuran antara folin ciocalteus dan akuades dengan perbandingan 1 : 1 dan dibuat sebanyak 100 mL.

### 2. Pereaksi Lowry B

Pada 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:

- Di pipet 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 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 dan 16 mg/ mL.



**Lampiran 9.** Jumlah Amonium Sulfat yang Ditambahkan dan Volume Suspensi Endapan Yang Diperoleh Pada Setiap Fraksi Spons *Petrosia alfiani*

No	Fraksi Protein	Bobot Amonium Sulfat (gram)	Volume ekstrak (mL)
1	0-20%	53,00	500
2	20-40%	53,67	475
3	40-60%	57,24	477
4	60-80%	61,02	473

Penambahan amonium sulfat:

$$1. \text{ Fraksi 0-20\%} = \frac{500 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 106 \text{ gram} = 53,00 \text{ gram}$$

$$2. \text{ Fraksi 20-40\%} = \frac{475 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 113 \text{ gram} = 53,67 \text{ gram}$$

$$3. \text{ Fraksi 40-60\%} = \frac{477 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 120 \text{ gram} = 57,24 \text{ gram}$$

$$4. \text{ Fraksi 60-80\%} = \frac{473 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 129 \text{ gram} = 61,02 \text{ gram}$$



**Lampiran 10. 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	10
	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	518	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

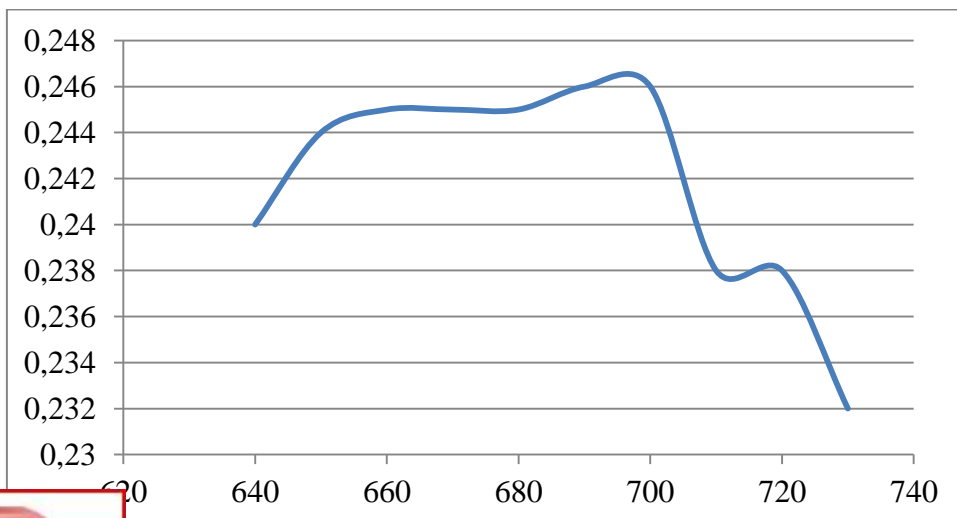


**Lampiran 11. Penentuan Serapan Maksimum ( $\lambda$  maksimum)**

**A. Serapan Maksimum ( $\lambda$  maksimum) pada Konsentrasi BSA mg/mL**

Panjang Gelombang (nm)	Absorban (A)
640	0,240
650	0,244
660	0,245
670	0,245
680	0,245
690	0,246
<b>700</b>	<b>0,246</b>
710	0,238
720	0,238
730	0,232

**B. Kurva  $\lambda$  maksimum**

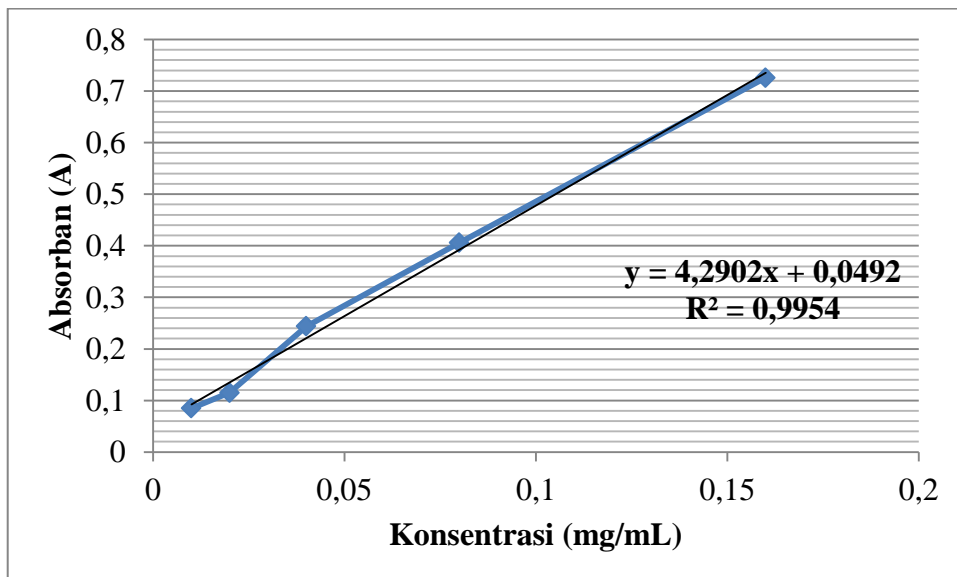




**Lampiran 12.** Kurva Standar Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry pada Panjang Gelombang Maksimal 700 nm

<b>Konsentrasi BSA (mg/mL)</b>	<b>Absorban (A)</b>
0,01	0,085
0,02	0,115
0,04	0,244
0,08	0,406
0,16	0,726

Kurva Kalibrasi Larutan Standar Protein (BSA)



**Lampiran 13.** Pengukuran Kadar Protein Pada Setiap Tahap Pemurnian Spons *Petrosia alfiani*

No	Fraksi Protein	Absorban (Y)	X (mg/mL)	Faktor Pengenceran	X Sebenarnya (mg/mL)
1	Ekstrak Kasar	0,298	0,0579	150 x	8,698
2	0-20%	0,169	0,0279	150 x	4,188
3	20-40%	0,140	0,0212	50 x	1,058
4	40-60%	0,268	0,0509	50 x	2,549
5	60-80%	0,116	0,0155	50 x	0,778

Dari hasil regresi kurva larutan standar diperoleh persamaan garis:

$$Y = 4,2902x + 0,0492$$

Maka data pada tabel diatas diperoleh dengan cara:

1. Ekstrak kasar

$$x = \frac{y-0,0492}{4,2902} = \frac{0,298-0,0492}{4,2902} = 0,0579$$

2. Fraksi 0-20%

$$x = \frac{y-0,0492}{4,2902} = \frac{0,169-0,0492}{4,2902} = 0,0279$$

3. Fraksi 20-40 %

$$x = \frac{y-0,0492}{4,2902} = \frac{0,140-0,0492}{4,2902} = 0,0212$$

4. Fraksi 40-60%

$$x = \frac{y-0,0492}{4,2902} = \frac{0,268-0,0492}{4,2902} = 0,0509$$

5. Fraksi 60-80%

$$= \frac{y-0,0492}{4,2902} = \frac{0,116-0,0492}{4,2902} = 0,0155$$



**Lampiran 15.** Penentuan Total Protein pada Fraksinasi Berbagai Tingkat Kejenuhan

No	Fraksi Protein	Volume Setiap Fraksi (mL)	Konsentrasi Protein (mg/mL)	Total Protein (mg)
1	Ekstrak Kasar	500	8,698	4349
2	0-20%	33,2	4,188	139,04
3	20-40%	12	1,058	12,696
4	40-60%	21	2,549	53,529
5	60-80%	9,8	0,778	7,6244

Penentuan total protein dengan rumus:

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

Ekstrak Kasar = 500 mL x 8,698 mg/mL = 4349 mg

Fraksi 0-20% = 33,2 mL x 4,188 mg/mL = 139,04 mg

Fraksi 20-40% = 12 mL x 1,058 mg/mL = 12,696 mg

Fraksi 40-60% = 21 mL x 2,549 mg/mL = 53,529 mg

Fraksi 60-80% = 9,8 mL x 0,778 mg/mL = 7,6244 mg



**Lampiran 16. 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 17.** Hasil Perhitungan LC<sub>50</sub> Larva Udang (*Artemia Salina Leach*) yang Mati terhadap Beberapa Fraksi Protein dari Spons *Petrosia alfiani*.

<b>Fraksi protein</b>	<b>Nilai LC50 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Toksisitas</b>
Ekstrak Kasar	24,92	Sangat toksik
0-20%	24,14	Sangat toksik
20-40%	21,54	Sangat toksik
40-60%	6899,22	Tidak toksik
60-80%	167,15	Toksik

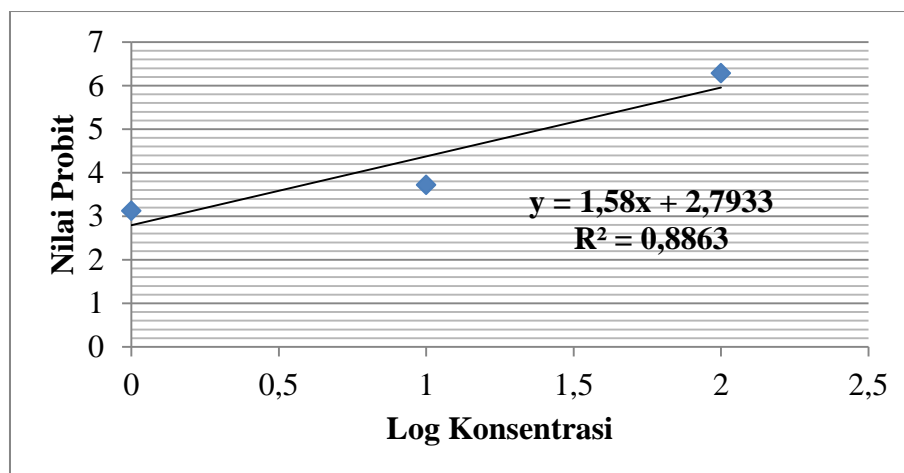


**Lampiran 18.** Perhitungan LC<sub>50</sub>

1. Ekstrak kasar (Supernatan)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
Ekstrak Kasar	1	1	8
	1	1	10
	0	2	10
Jumlah	2	4	28
% Kematian	3,33 %	10%	90%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	10	3,72
100	2	90	6,28



Untuk LC<sub>50</sub>, nilai probit adalah 5, dimasukkan ke persamaan regresi

$$y = 1,58x + 2,7933$$

$$5 = 1,58x + 2,7933$$

$$X = 1,3966$$

$$LC_{50} = 1,3966$$

$$4,92 \mu\text{g/mL}$$

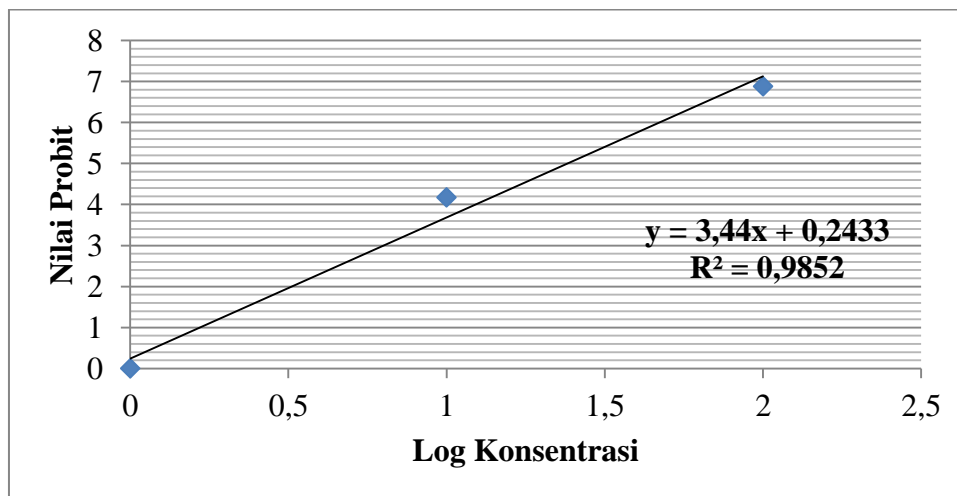
Ekstrak Kasar adalah 24,92 µg/mL



2. F1 (Fraksi 0-20%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
0-20%	0	0	10
	1	5	10
	0	2	10
Jumlah	1	7	30
% Kematian	0%	20%	96,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	0	0
10	1	20	4,17
100	2	96,67	6,88



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

$$y = 3,44x + 0,2433$$

$$5 = 3,44x + 0,2433$$

$$X = 1,3828$$

$$LC_{50} = 1,3828$$

$$4,1435 \mu\text{g/mL}$$

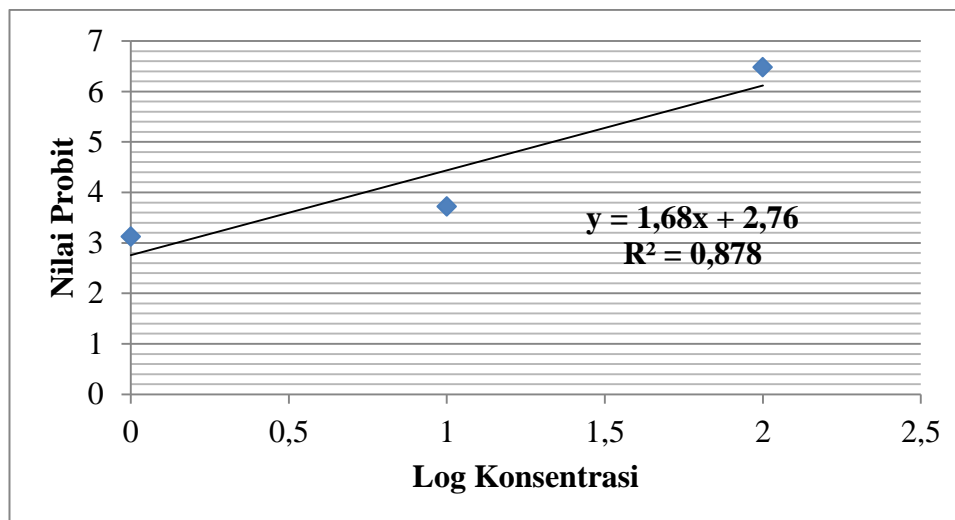
fraksi 0-20% adalah 24,1435 µg/mL



3. F2 (Fraksi 20-40%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
20-40%	0	1	9
	1	1	10
	1	2	10
Jumlah	2	4	29
% Kematian	3,33%	10%	93,33%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	10	3,72
100	2	93,33	6,48



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

$$y = 1,68x + 2,76$$

$$5 = 1,68x + 2,76$$

$$X = 1,3333$$

$$LC_{50} = 1,3333$$

$$1,5427 \mu\text{g/mL}$$

fraksi 20-40% adalah 21,5427 µg/mL

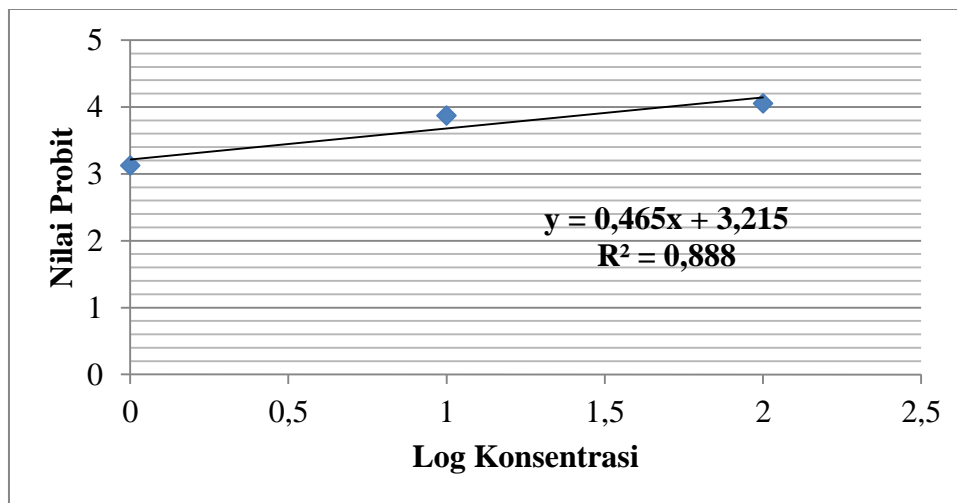




4. F3 (Fraksi 40-60%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
Ekstrak Kasar	1	2	2
	0	2	2
	1	1	2
Jumlah	2	5	6
% Kematian	3,33%	13,33%	16,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	3,33	3,12
10	1	13,33	3,87
100	2	16,67	4,05



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

$$y = 0,465x + 3,215$$

$$5 = 0,465x + 3,215$$

$$X = 3,8388$$

$$LC_{50} = 3,8388$$

$$899,22 \mu\text{g/mL}$$

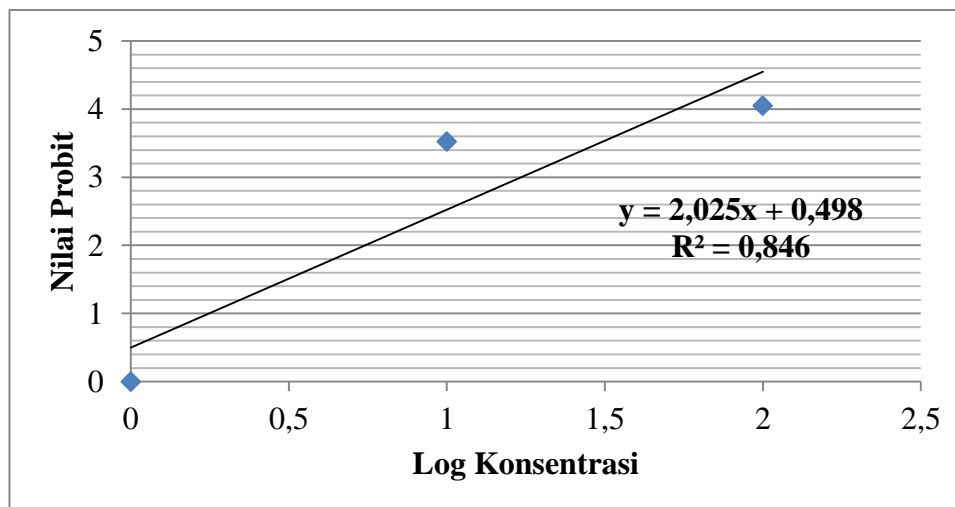
fraksi 40-60% adalah 6899,22 µg/mL



5. F4 (Fraksi 60-80%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
Ekstrak Kasar	0	0	2
	0	1	2
	1	2	2
Jumlah	1	3	6
% Kematian	0%	6,67%	16,67%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	0	0
10	1	6,67	3,52
100	2	16,67	4,05



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

$$y = 2,025x + 0,4983$$

$$5 = 2,025x + 0,4983$$

$$X = 2,2231$$

$$LC_{50} = 2,2231$$

$$67,15 \mu\text{g/mL}$$

fraksi 60-80% adalah 167,15 µg/mL



## Lampiran 19. Hidrolisis protein

### 1. Fraksi 0-20%

Waktu hidrolisis (jam)	Protein terlarut				Protein total (mg/mL)				DH (%)
	absorban	KP	FP	KP sebenarnya	absorban	KP	FP	KP sebenarnya	
0	0,087	0,0088	5	0,0441	0,149	0,0233	10	0,2326	18,9596
0,5	0,482	0,1009	100	10,0881	0,580	0,1237	150	18,5586	54,3580
1	0,510	0,1074	100	10,7404	0,586	0,1251	150	18,7681	57,2278
2	0,518	0,1092	100	10,9272	0,582	0,1242	150	18,6285	58,6585
3	0,520	0,1097	100	10,9738	0,570	0,1214	150	18,2089	60,2661
4	0,524	0,1106	100	11,0671	0,536	0,1135	150	17,0202	65,0233
5	0,522	0,1102	100	11,0205	0,548	0,1162	150	17,4397	63,1920
6	0,518	0,1092	100	10,9272	0,546	0,1158	150	17,3698	62,9092

Keterangan:

KP = Kadar Protein

r Pengenceran

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



2. Fraksi 20-40%

Waktu hidrolisis (jam)	Protein terlarut				Protein total (mg/mL)				DH (%)
	absorban	KP	FP	KP sebenarnya	absorban	KP	FP	KP sebenarnya	
0	0,089	0,0093	5	0,0463	0,124	0,0174	10	0,1743	26,5634
0,5	0,500	0,1051	100	10,5076	0,592	0,1265	150	18,9781	55,3669
1	0,516	0,1088	100	10,8806	0,586	0,1251	150	18,7683	57,9733
2	0,522	0,1102	100	11,0205	0,566	0,1205	150	18,0691	60,8802
3	0,528	0,1116	100	11,1603	0,572	0,1219	150	18,2788	61,0559
4	0,542	0,1148	100	11,4866	0,558	0,1186	150	17,7894	64,5699
5	0,532	0,1125	100	11,2535	0,560	0,1191	150	17,8593	63,0119
6	0,540	0,1144	100	11,4400	0,564	0,1199	150	17,9992	63,5584

Keterangan:

KP = Kadar Protein

FP = Faktor Pengenceran



**Lampiran 20.** Hasil Perhitungan LC<sub>50</sub> Larva Udang (*Artemia Salina Leach*) yang Mati terhadap Beberapa Hidrolisat Protein dari Spons *Petrosia alfiani*.

<b>Fraksi protein</b>	<b>Nilai LC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>Toksisitas</b>
0-20%	33,95	Toksik
20-40%	42,40	Toksik

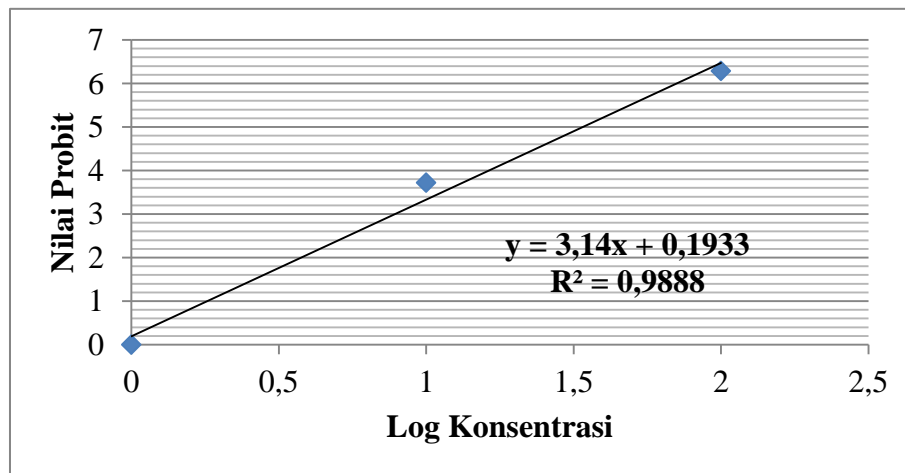


**Lampiran 21. Perhitungan LC<sub>50</sub>**

1. Hidrolisat F1 (Fraksi 0-20%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
0-20%	1	1	10
	0	1	8
	0	2	10
Jumlah	1	4	28
% Kematian	0%	10%	90%

Konsentrasi (µg/mL)	Log Konsentrasi (X)	% Kematian	Nilai Probit (Y)
1	0	0	0
10	1	10	3,72
100	2	90	6,28



Untuk LC<sub>50</sub>, nilai probit adalah 5, dimasukkan ke persamaan regresi

$$y = 3,14 x + 0,193$$

$$5 = 3,14 x + 0,193$$

$$X = 1,5309$$

$$LC_{50} = 1,5309$$

$$3,95 \mu\text{g/mL}$$

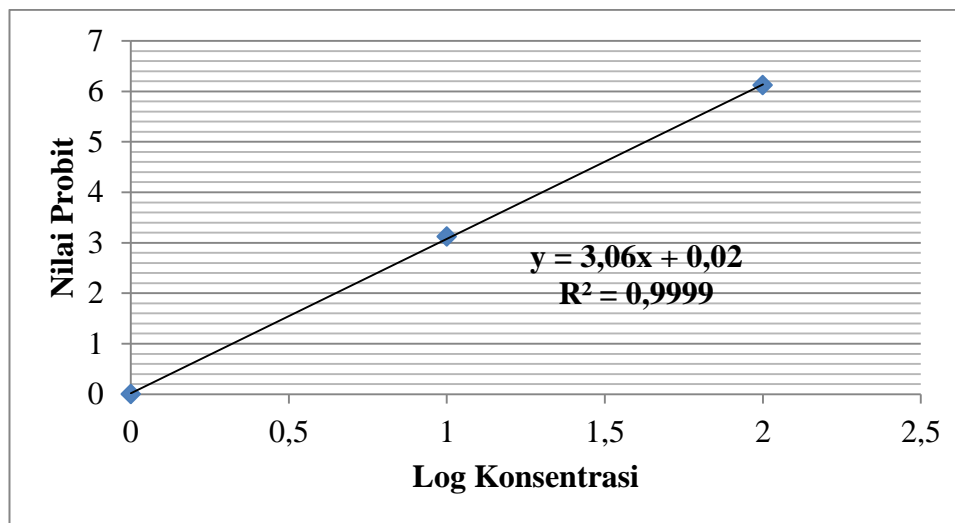
hidrolisat Fraksi 0-20% adalah 33,95 µg/mL



2. Hidrolisat F2 (Fraksi 20-40%)

Fraksi protein	Konsentrasi (µg/mL)		
	1	10	100
20-40%	0	1	8
	0	0	10
	0	1	9
Jumlah	0	2	27
% Kematian	0%	3,33%	86,67%

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



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

$$y = 3,06 x + 0,02$$

$$5 = 3,06 x + 0,02$$

$$X = 1,6274$$

$$LC_{50} = 1,6274$$

$$2,40 \mu\text{g/mL}$$

hidrolisat Fraksi 20-40% adalah 42,40 µg/mL



Lampiran 22. Dokumentasi Penelitian



Gambar 6. Ekstrak kasar spons *Petrosia alfiani*



Gambar 7. Penambahan amonium sulfat

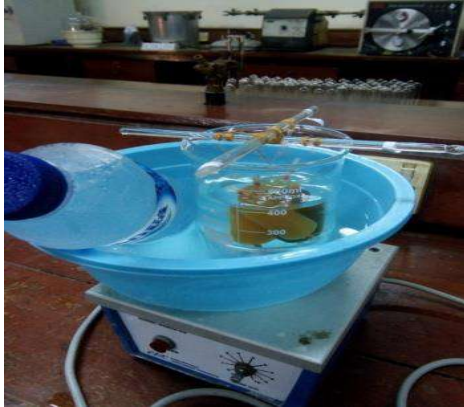


Gambar 8. Sentrifugasi



Gambar 9. Fraksi protein





**Gambar 10.** Dialisis



**Gambar 11.** Pengukuran kadar protein



**Gambar 12.** Hidrolisis protein



**Gambar 13.** Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

