



**ISOLAT BAKTERI BA 9920 ASAL PERAIRAN PANTAI BANDEALIT
JEMBER SEBAGAI SUMBER BARU
ENZIM FIBRINOLITIK**

SKRIPSI

Oleh

**Izzay Afkarina
NIM 111810401005**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**ISOLAT BAKTERI BA 9920 ASAL PERAIRAN PANTAI BANDEALIT
JEMBER SEBAGAI SUMBER BARU
ENZIM FIBRINOLITIK**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Biologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Izzay Afkarina
NIM 111810401005**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua saya, Ibunda Nur Nadhifah dan Ayahanda Muhammad Khurdi Hasan, atas segala dukungan dan untaian doa yang terus terpanjat pada setiap sujudnya;
2. kakak saya Novita Anggraeni dan Iwan Setya Budi yang selalu mendukung setiap langkah saya;
3. Putrawan Anastasya Heru Cahyono yang selalu memotivasi dan mendukung setiap langkah saya;
4. guru-guru saya sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi, atas bimbingan dan dukungannya;
5. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.

Dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya engkau berharap.”

(terjemahan Surat Al-Insyirah (94) : 5-8)¹



¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 1987. *Terjemahan dan Tafsir Al Qur'an*. Medinah Munawwarah: Mujamma' Khadim al Haramain asy Syarifain al Malik Fahd li thiba'at al Mush-haf asy-Syarif.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Izzay Afkarina

NIM : 111810401005

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Isolat Bakteri Ba 9920 Asal Perairan Pantai Bandalit Jember Sebagai Sumber Baru Enzim Fibrinolitik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian yang dibiayai kelompok penelitian dengan ketua Sattya Arimurti, S.P., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 3 November 2015

Yang menyatakan,

Izzay Afkarina

NIM 111810401005

SKRIPSI

**ISOLAT BAKTERI BA 9920 ASAL PERAIRAN PANTAI BANDEALIT
JEMBER SEBAGAI SUMBER BARU
ENZIM FIBRINOLITIK**

Oleh

Izzay Afkarina

NIM 111810401005

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolat Bakteri Ba 9920 Asal Perairan Pantai Bandealit Jember
Sebagai Sumber Baru Enzim Fibrinolitik” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si.
NIP 197509132000032001

Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.
NIP 197807282005012001

Anggota I,

Anggota II,

Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D.
NIP 196805031994011001

Drs. Siswanto, M.Si.
NIP 196012161993021001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno DEA., Ph.D.
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Isolat Bakteri BA 9920 Asal Perairan Pantai Bandalit Jember Sebagai Sumber Baru Enzim Fibrinolitik; Izzay Afkarina; 111810401005; 2015; 56 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Trombosis adalah pembentukan bekuan darah abnormal (trombus) yang menyebabkan terganggunya aliran darah dalam sistem sirkulasi. Hal tersebut akan memicu timbulnya berbagai penyakit berbahaya dan mematikan seperti infark miokard akut dan penyakit kardiovaskuler lainnya. Bekuan darah (trombus) memiliki komponen protein utama yaitu fibrin. Komponen tersebut dapat dihancurkan dengan mekanisme fibrinolisis oleh plasmin sebagai agen fibrinolitik. Beberapa agen fibrinolitik komersial yang banyak digunakan adalah *tissue plasminogen activators* (t-PA), *urokinase* (u-PA), dan *streptokinase*. Namun penggunaan agen fibrinolitik tersebut tergolong mahal dan dapat menimbulkan efek samping yang membahayakan. Oleh karena itu, perlu adanya eksplorasi tentang model terapi fibrinolitik alternatif dengan biaya yang lebih murah dan diharapkan dapat mengurangi efek samping yang mungkin terjadi namun memiliki tingkat efektivitas yang sama.

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang paling dominan dilingkungan, salah satunya dilingkungan Pantai Bandalit Kabupaten Jember. Salah satu isolat bakteri asal perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember yang memiliki aktivitas fibrinolitik adalah BA 9920. Isolat bakteri BA 9920 mampu mendegradasi substrat fibrin pada uji aktivitas fibrinolitik dengan menggunakan metode *fibrin plate assay*. Penelitian lanjutan ini bertujuan melakukan analisis aktivitas fibrinolitik spesifik serta mengidentifikasi fraksi protein spesifik yang memiliki aktivitas fibrinolitik dari isolat bakteri BA 9920 sebagai salah satu isolat yang berpotensi sebagai agen fibrinolitik untuk penyakit trombosis.

Metode yang digunakan meliputi produksi ekstrak kasar protein, pemekatan protein dengan garam amonium sulfat dan pelarut organik etanol, pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford, pengukuran berat molekul protein melalui SDS-PAGE dan penentuan fraksi protein yang memiliki aktivitas fibrinolitik dengan metode zimografi.

Hasil penelitian didapatkan bahwa teknik pemekatan protein ekstrak kasar dari isolat bakteri BA 9920 menggunakan amonium sulfat mampu menghasilkan presipitat protein 67% lebih banyak dibandingkan dengan metode pemekatan protein menggunakan etanol yang hanya menghasilkan presipitat protein sebesar 33%. Konsentrasi presipitat hasil pemekatan dengan amonium sulfat sebesar 0,346 mg/ml. Sedangkan konsentrasi presipitat hasil pemekatan dengan etanol sebesar 0,073 mg/ml. Hasil pemekatan dari masing-masing metode tersebut, selanjutnya diuji aktivitas fibrinolitik dengan metode *fibrin plate assay*.

Hasil *fibrin plate assay* menunjukkan bahwa presipitat hasil pemekatan dengan amonium sulfat memiliki diameter zona bening lebih besar yaitu 1,23 cm dibandingkan dengan aktivitas fibrinolitik dari presipitat protein hasil pemekatan dengan etanol yang menunjukkan diameter zona bening sebesar 0,83 cm. Presipitat hasil presipitasi amonium sulfat yang memiliki konsentrasi protein serta aktivitas fibrinolitik tertinggi selanjutnya dianalisis lebih spesifik dengan metode SDS-PAGE dan zimografi untuk mengetahui fraksi protein yang memberikan aktivitas fibrinolitik. Hasil elektroforesis SDS-PAGE didapatkan lima pita protein dengan berat molekul secara berurutan dari yang terkecil hingga terbesar adalah 62 kDa, 65 kDa, 72 kDa, 74 kDa, dan 93 kDa. Dari kelima fraksi protein tersebut, diketahui satu pita protein dengan berat molekul 93 kDa memberikan aktivitas fibrinolitik pada elektroforesis zimografi.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Isolat Bakteri Ba 9920 Asal Perairan Pantai Bandalit Jember Sebagai Sumber Baru Enzim Fibrinolitik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing utama, dosen pembimbing akademik pengganti, serta ketua grup penelitian TBV dan Bakteri yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi selama berada pada masa perkuliahan sampai dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan membiayai penelitian ini;
3. Kahar Muzakhar, S.Si., Ph.D. dan Drs. Siswanto, M.Si. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. almarhumah Dra. Umiyah M.Sc.agr. selaku dosen pembimbing akademik yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, motivasi dan semangat yang tiada hentinya selama berada pada masa perkuliahan hingga menjelang terselesaikannya skripsi ini;
5. Sattya Arimurti, S.P.,M.Si. selaku pemilik proyek, terima kasih telah bermurah hati untuk mengizinkan penulis bergabung ke dalam grup Bakteri. Terima kasih pula atas saran, dukungan, dan motivasi yang sangat membangun skripsi ini;

6. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf dilingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu selama masa perkuliahan;
7. ibunda Nur Nadhifah, Ayahanda Muhammad Khurdi Hasan dan kakakku Novita Anggraeni serta keluarga besar, yang telah memberikan semangat dan doa serta dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;
8. rekan berbagi pendapat, Putrawan Anasta Heru Cahyono, terima kasih atas segala dukungan, doa dan motivasinya disaat lelah selama pengerjaan skripsi ini;
9. rekan kerja seperjuangan yang tergabung dalam *TBV-Bacterial Group*, Dewi Masrurroh, Zakiyatul Khoiriyah, Hasa Bella, Suci Ummi R.Q., Amatullah Sholihah, Elisa Nurma Riana, M. Mirza N., Renam Putra, Washilul Arham, Ajeng, Novanda dan Esti, terimakasih atas kerjasama dan dukungan serta bantuannya selama ini;
10. adik-adik generasi penerus *TBV-Bacterial Group*, Nur Hayati, Wenny Purwati, Ika Wahyuni, Febri Ramadhan, Alfian, dan Habib, terima kasih atas bantuan dan semangatnya. Terus berjuang sampai akhir, karena hasil tidak akan mengkhianati usaha;
11. teman-teman Biologi angkatan 2011 yang tergabung dalam “Amphibi”, Eriani Eleganty, Yuvi Yuanditra, Ika Novita Sari, Estu Nur H.S., Ade Ayu Gustiari, Qoyyimah Yuliani dan yang lainnya, terimakasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama pengerjaan skripsi ini;
12. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 3 November 2015

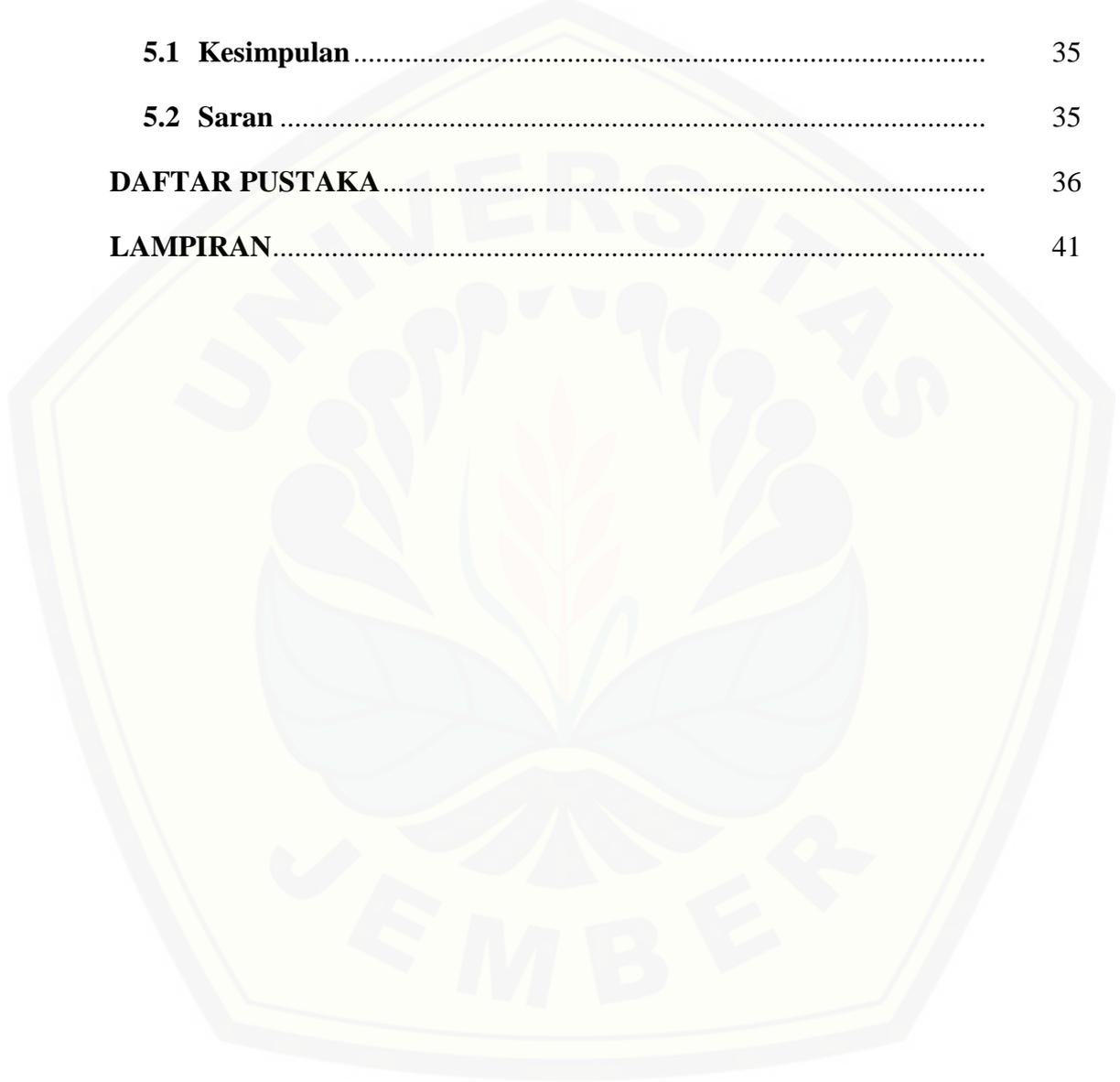
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Batasan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Mekanisme Pembekuan Darah dan Trombosis	5

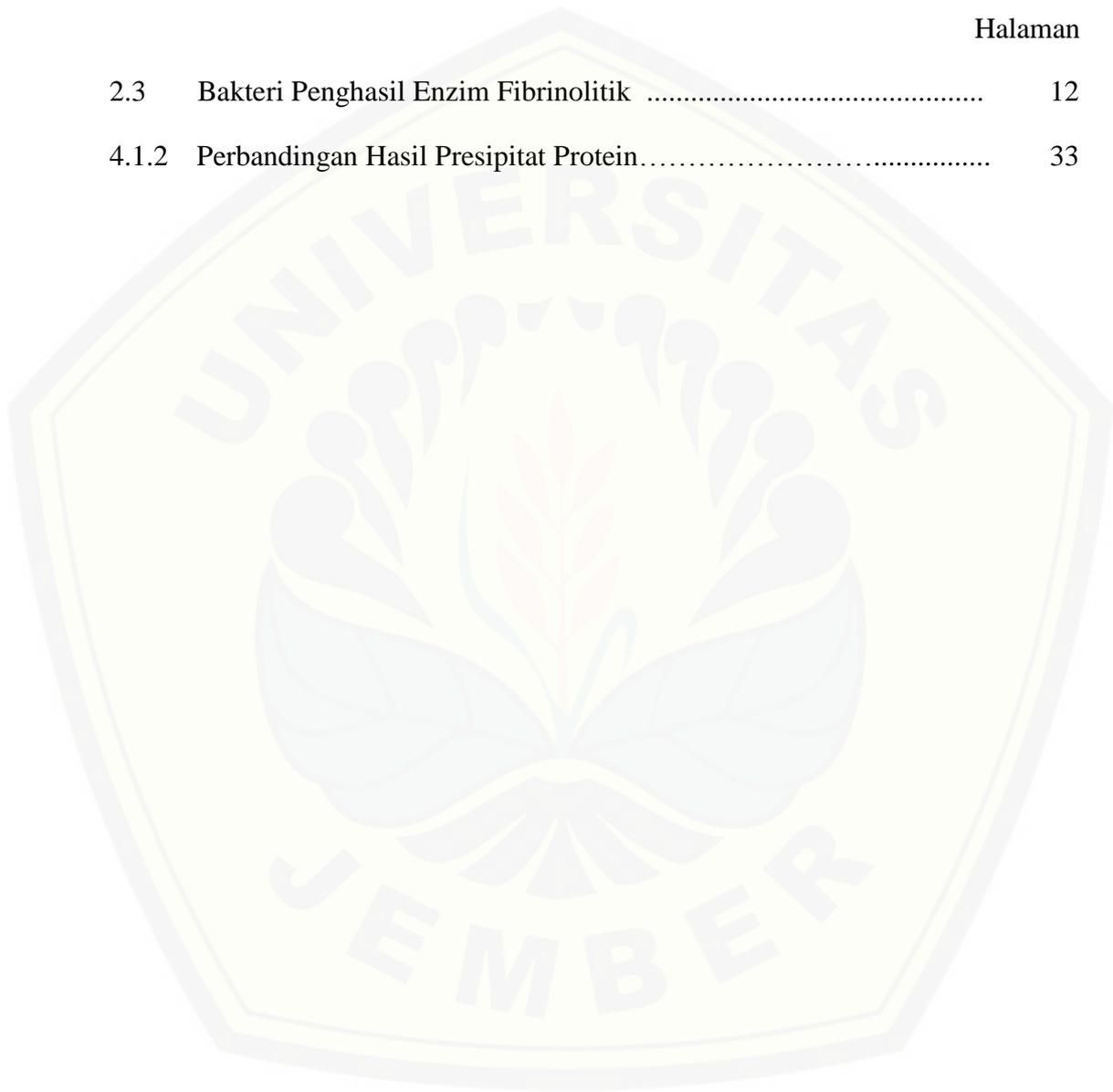
2.2 Penanganan Trombosis Menggunakan Terapi Trombolisis	9
2.3 Enzim Fibrinolitik dan Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik ..	11
2.4 Pemisahan Agen Fibrinolitik	12
2.4.1 Pemisahan Protein Berdasarkan Kelarutan Protein	13
2.4.2 Pemisahan Protein Berdasarkan Berat Molekul Protein	14
2.5 Analisis Konsentrasi Protein	16
2.6 Penentuan Aktivitas Enzim Fibrinolitik Menggunakan Metode Zimografi	17
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Rancangan Penelitian	19
3.3 Alat dan Bahan Penelitian.....	20
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Peremajaan Isolat Bakteri BA 9920.....	20
3.4.2 Produksi Enzim Ekstraseluler	21
3.4.3 Presipitasi Supernatan Isolat Bakteri BA 9920.....	21
3.4.4 Pengukuran Konsentrasi Protein.....	23
3.4.5 Uji Aktivitas Fibrinolitik Presipitat Isolat Bakteri BA 9920 ...	24
3.4.6 Pemekatan Protein Dengan Membran Ultrafiltrasi.....	24
3.4.7 Zimografi.....	25
3.5 Analisis Data.....	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Aktivitas Enzim Fibrinolitik Isolat Bakteri BA 9920	27
4.1.1 Produksi dan Pemekatan Protein	27

4.1.2 Uji Aktivitas Fibrinolitik.....	30
4.2 Berat Molekul Protein dari Isolat Bakteri BA 9920 yang Memiliki Aktivitas Fibrinolitik	32
BAB 5. PENUTUP	35
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN.....	41



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.3 Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik	12
4.1.2 Perbandingan Hasil Presipitat Protein.....	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pembentukan Bekuan Darah	5
Gambar 2.2 Mekanisme Pembentukan Bekuan Fibrin	7
Gambar 2.3 Mekanisme Fibrinolisis.....	10
Gambar 4.1.1 Uji Bebas Amonium Sulfat Dengan Barium Klorida.....	29
Gambar 4.1.2 Aktivitas Fibrinolitik Isolat BA 9920	31
Gambar 4.2 Hasil SDS-PAGE Dan Zimografi.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. ALUR PENELITIAN	41
B. DAFTAR FAKTOR PEMBEKUAN DARAH	42
C. DATA MORFOLOGI ISOLAT BAKTERI BA 9920 ASAL PERAIRAN PANTAI BANDEALIT KABUPATEN JEMBER	43
C.1 Morfologi Isolat Bakteri Perairan Pantai Bandevalit Kabupaten Jember	43
C.2 Gambar Morfologi Koloni Isolat Bakteri BA 9920 Umur 3 Hari	43
C.3 Hasil Pengecatan Gram Isolat Bakteri BA 9920 Umur 3 Hari	44
D. KOMPOSISI BAHAN	45
D.1 Komposisi Media Kultur	45
D.2 Komposisi Bahan untuk Presipitasi dan Dialisis	45
D.2.1 Tabel Presipitasi Amonium Sulfat	45
D.2.2 Optimasi Kejenuhan Amonium Sulfat	46
D.3 Hasil Presipitasi Protein	46
D.4 Komposisi buffer Dialisis	47
D.5 Komposisi Larutan Uji Bebas Amonium Sulfat	47
E. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN	48
E.1 Absorbansi Tingkat Konsentrasi BSA untuk Pembuatan Standar BSA	48
E.2 Kurva Standar BSA	48
E.3 Penentuan Konsentrasi Protein Sampel	49
F. UJI AKTIVITAS <i>Fibrin Plate Assay</i>	50

F.1	Komposisi Media Uji Aktivitas	50
F.2	Pengukuran Diameter Zona Bening Pada Media Fibrin	50
G.	ELEKTROFORESIS SDS-PAGE	51
G.1	Preparasi buffer Elektroforesis SDS-PAGE	51
G.2	Preparasi Gel Elektroforesis SDS-PAGE	52
G.3	Kurva Standar Marker Protein HMW	52
G.4	Jarak Migrasi dan Log Berat Molekul Marker Protein HMW	53
G.5	Penentuan Berat Molekul Protein Sampel	53
H.	ELEKTROFORESIS ZIMOGRAFI	54
H.1	Preparasi Larutan dan buffer Elektroforesis Zimografi	54
H.2	Preparasi Gel Elektroforesis Zimografi	54
H.3	Kurva Standar Marker Protein HMW	55
H.4	Jarak Migrasi dan Log BM Marker Protein HMW	55
H.5	Penentuan Migrasi dan Log BM Marker Protein HMW	55

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Trombosis adalah pembentukan bekuan darah abnormal yang menyebabkan terganggunya aliran darah dalam sistem sirkulasi (Japardi, 2002). Dalam keadaan normal, pembentukan bekuan darah hanya terjadi jika ada cedera pada pembuluh darah. Namun ada beberapa kelainan dalam tubuh yang menyebabkan kecenderungan terjadi trombosis walaupun pembuluh darah tidak mengalami kerusakan. Kelainan tersebut antara lain kelainan genetik dan aterosklerosis. Kelainan genetik dan aterosklerosis akan menyebabkan terbentuknya bekuan darah (*thrombus*) yang mengganggu aliran darah bahkan kematian jaringan. Hal tersebut akan memicu timbulnya berbagai penyakit berbahaya dan mematikan seperti infark miokard akut dan penyakit kardiovaskuler lainnya.

Infark miokard akut (IMA) atau serangan jantung adalah kematian otot jantung (jaringan miokard) akibat berkurangnya suplai oksigen yang disebabkan oleh sumbatan trombus pada pembuluh darah jantung (*arteri coronaria*). Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Kementerian Kesehatan RI (2013), prevalensi infark miokard dengan umur diatas 15 tahun cukup tinggi yakni mencapai 1,5 % per 1000 orang tiap tahunnya.

Bekuan darah memiliki komponen protein utama yaitu fibrin. Bekuan darah yang menyumbat pembuluh darah dapat dihancurkan dengan fibrinolisis oleh plasmin. Proses utama fibrinolisis adalah dengan mengaktifkan plasminogen menjadi enzim proteolitik plasmin. Enzim tersebut akan mengubah bentuk trombus dengan menghancurkan fibrin dalam bekuan darah sehingga perkembangan trombosis terhambat (Black *et al.*, 2013). Beberapa agen fibrinolitik yang banyak digunakan adalah *tissue plasminogen activators* (t-PA), *urokinase* (u-PA), dan *streptokinase* (Vijayaraghavan & Gnana, 2014).

Penggunaan terapi trombolitik tergolong mahal dan dapat menimbulkan efek samping yang membahayakan (Kholis & Ardini, 2011). Oleh karena itu, perlu adanya eksplorasi tentang model terapi fibrinolitik alternatif dengan biaya yang lebih murah dan diharapkan dapat mengurangi efek samping yang mungkin terjadi namun memiliki tingkat efektivitas yang sama.

Model terapi alternatif yang dapat dilakukan adalah penggunaan enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik merupakan enzim mirip plasmin yang secara langsung dapat memecah fibrin dalam bekuan darah. Enzim fibrinolitik dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti mikroorganisme, pangan fermentasi dan hewan (Sajuthi *et al.*, 2010). Hal tersebut karena potensinya yang cukup tinggi sebagai agen pencegah atau terapi penyakit kardiovaskuler dengan memecah fibrin di dalam pembuluh darah (Vijayaraghavan & Gnana, 2014).

Mikroorganisme merupakan sumber yang paling banyak digunakan untuk memproduksi enzim (Vinoth *et al.*, 2014). Salah satu mikroorganisme yang digunakan sebagai objek penelitian untuk digali potensinya sebagai agen fibrinolitik adalah bakteri. Bakteri merupakan mikroorganisme yang sangat potensial sebagai penghasil enzim dan memiliki beberapa keunggulan, yaitu mudah ditumbuhkan, pertumbuhan lebih cepat, kondisi produksi tidak tergantung musim dan waktu yang dibutuhkan relatif tidak lama (Demain & Vaishnav, 2009). Selain itu bakteri merupakan organisme yang paling dominan di lingkungan, salah satunya di lingkungan perairan dengan biodiversitas > 90% dari biomassa perairan. Salah satu lingkungan perairan yang memiliki diversitas isolat bakteri cukup tinggi yaitu perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember.

Hasil penelitian Eka (2013), menunjukkan bahwa satu isolat bakteri asal perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember yang memiliki aktivitas fibrinolitik adalah BA 9920. Isolat bakteri BA 9920 mampu mendegradasi substrat fibrin pada uji aktivitas fibrinolitik dengan menggunakan metode *fibrin plate assay*. Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Menurut Burgess (2009), semakin besar dan jelas zona yang terbentuk, menunjukkan bahwa semakin banyak fibrin yang terdegradasi. Oleh karena itu, pada penelitian lanjutan ini, dilakukan pengujian lebih spesifik terhadap aktivitas fibrinolitik dari

isolat bakteri BA 9920 sebagai salah satu isolat yang berpotensi sebagai agen terapi fibrinolitik untuk penyakit trombosis.

1.2 Rumusan Masalah

Isolat bakteri BA 9920 asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember diketahui memiliki aktivitas proteolitik dan lebih lanjut lagi aktivitas fibrinolitik. Namun demikian, analisis aktivitas spesifik terhadap enzim yang dihasilkan pada isolat tersebut belum dilakukan termasuk juga analisis aktivitasnya. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pengujian lebih spesifik terkait analisis aktivitas fibrinolitik pada presipitat protein serta mengidentifikasi fraksi protein spesifik dari isolat bakteri BA 9920 yang memiliki aktivitas fibrinolitik.

1.3 Tujuan Penelitian

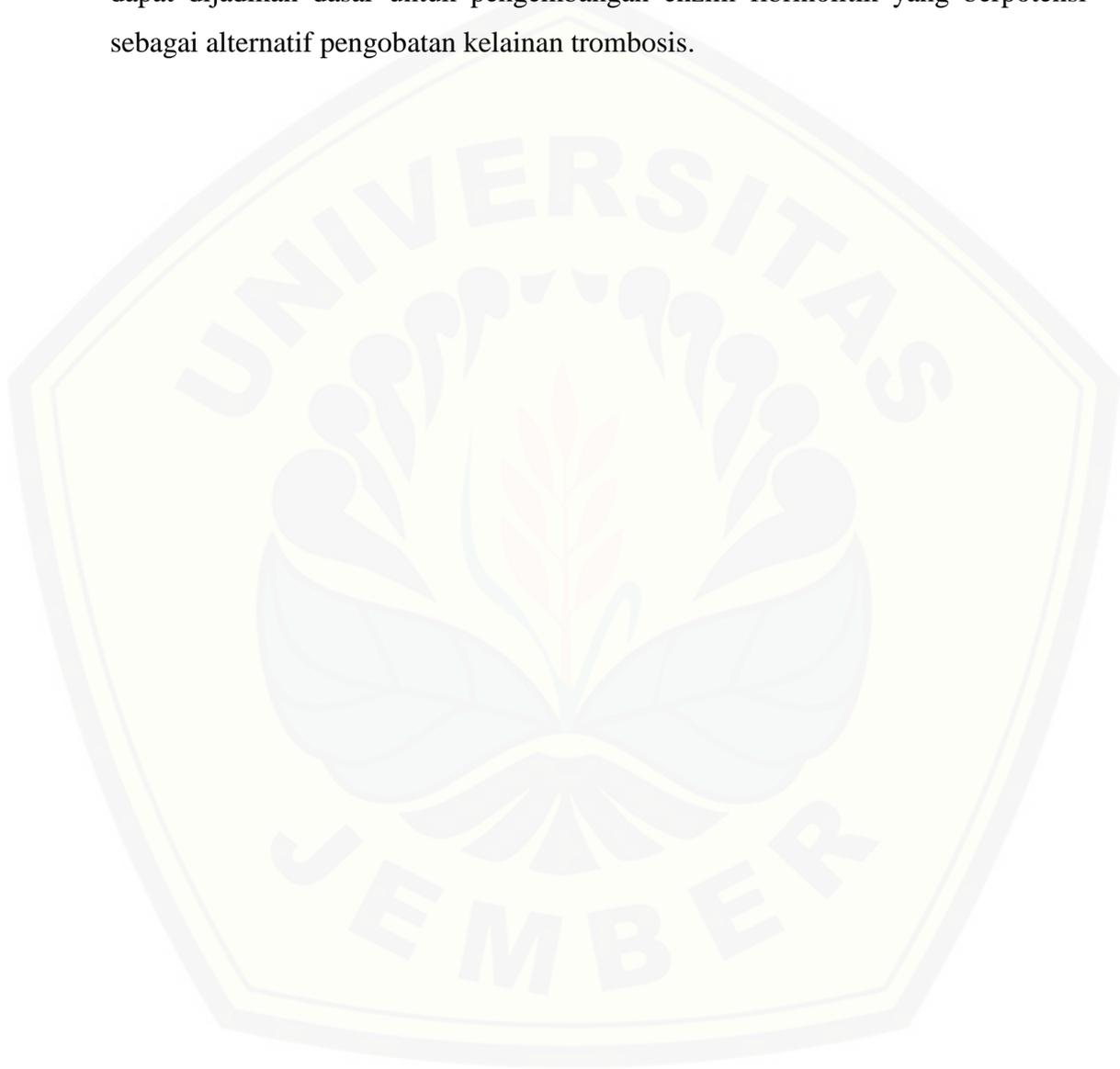
Penelitian ini bertujuan melakukan analisis aktivitas fibrinolitik spesifik serta mengidentifikasi fraksi protein spesifik yang memiliki aktivitas fibrinolitik dari isolat bakteri BA 9920 asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember.

1.4 Batasan Penelitian

1. Uji aktivitas fibrinolitik spesifik hanya dilakukan pada isolat bakteri BA 9920 asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember;
2. Uji aktivitas fibrinolitik spesifik hanya dilakukan pada presipitat protein dari isolat bakteri BA 9920 asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember.

1.5 Manfaat Penelitian

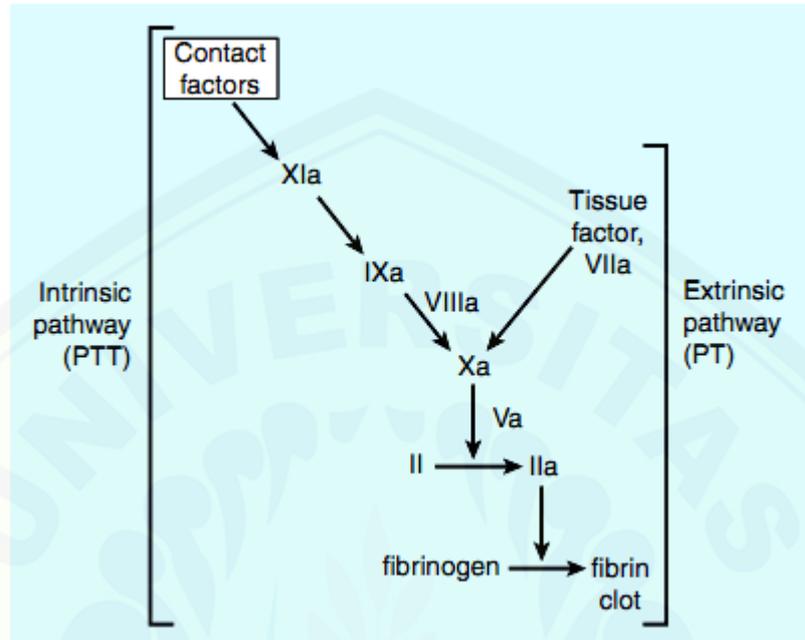
Data yang diperoleh pada penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai fraksi protein dari isolat bakteri BA 9920 asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember yang memiliki aktivitas fibrinolitik dan untuk selanjutnya dapat dijadikan dasar untuk pengembangan enzim fibrinolitik yang berpotensi sebagai alternatif pengobatan kelainan trombosis.



Sel endotelial sebenarnya tidak memiliki sifat koagulasi (membentuk bekuan darah) namun adanya luka yang terbuka akan mengaktifkan protein matrik subendotelial seperti kolagen dan faktor von Willebrand yang menstimulasi serangkaian mekanisme pembentukan bekuan darah (Katzung *et al.*, 2012). Kolagen dan faktor von Willebrand mengakibatkan penempelan trombosit pada dinding pembuluh darah. Hal ini disebabkan oleh adanya ikatan antara reseptor membran trombosit yaitu glikoprotein (GP) Ia dengan kolagen (C) dan reseptor glikoprotein Ib dengan faktor von Willebrand (vWF). Ikatan tersebut menstimulasi sekresi dari *adenosine diphosphate* (ADP), *thromboxane A₂* (TXA₂), dan *serotonin* (5-HT). Ketiga substansi tersebut berfungsi sebagai aktifator trombosit, stimulator agregasi dan vasokonstriktor. Aktivasi trombosit mengubah konformasi reseptor α IIB β III integrin (glikoprotein IIb/IIIa) sehingga mudah untuk mengikat fibrinogen. Fibrinogen akan membentuk ikatan silang dengan trombosit yang berdekatan sehingga terjadi agregasi dan terbentuk agregat trombosit (sumbat platelet) (Hamid, 2013). Agregat trombosit merupakan trombosit-trombosit yang saling terangkai membentuk bekuan darah. Saat terjadi kerusakan pembuluh darah, sistem hemostasis akan mengalirkan darah melalui pembuluh darah lain disekitar pembuluh darah yang rusak untuk mempercepat proses pembekuan darah (Katzung *et al.*, 2012).

Akhir dari proses pembekuan darah adalah pembentukan fibrin melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan intrinsik. Mekanisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.2. Jalur pembentukan bekuan darah dimulai dengan pengaktifan jalur ekstrinsik yaitu aktivasi faktor pembekuan darah yang dipicu oleh kerusakan dinding endotelial pembuluh darah. Jalur ini disebut ekstrinsik karena masuknya faktor jaringan (*Tissue Factor (TF)*) yang juga dikenal sebagai tromboplastin jaringan atau faktor III, senyawa yang tidak ditemukan didalam darah (Marlar *et al.*, 1982). Faktor tersebut dilepaskan oleh jaringan pembuluh yang terluka. Masing-masing faktor akan mengaktifkan faktor pembekuan selanjutnya. Faktor III bersama dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor VII menjadi faktor VIIa. Faktor VIIa bersama dengan faktor III dan ion kalsium dapat memproduksi

trombin dalam jumlah kecil dengan sangat cepat. Selain itu, faktor VIIa juga akan mengaktifkan faktor IX pada jalur intrinsik (Katzung *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Mekanisme pembentukan bekuan fibrin (Sumber: Katzung *et al.*, 2012)

Jalur intrinsik diinisiasi oleh adanya paparan senyawa asing bermuatan negatif seperti kolagen, dinding subendotelial, atau fosfolipida yang dapat mengaktifkan faktor XII menjadi XIIa. Faktor XIIa bersama dengan faktor fitzgerald (*High Molecular Weight Kininogen (HMWK)*) dan faktor fletcher (*Prekallikrein*) akan mengaktifkan faktor XI menjadi XIa (Marlar *et al.*, 1982). Peran HMWK adalah mempercepat aktivasi faktor XI menjadi XIa. Selanjutnya, faktor XIa dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor IX menjadi IXa (Katzung *et al.*, 2012).

Pertemuan jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik adalah pembentukan faktor Xa. Faktor tersebut berfungsi untuk mengkatalis perubahan protombin menjadi trombin (faktor IIa) dengan bantuan faktor Va, fosfolipida faktor keping darah 3 (*platelet factor 3 (PF3)*), dan ion kalsium (Hamid, 2013). Molekul fibrinogen dipotong oleh trombin membentuk monomer fibrin. Monomer tersebut bergabung dengan monomer fibrin yang lain dengan bantuan faktor XIIIa untuk membentuk

protofibril (polimer fibrin yang tidak larut air). Satu per satu protofibril akan bergabung dan mengalami percabangan membentuk jaring fibrin (*fibrin clot*) dalam proses pembekuan darah (Adam *et al.*, 2014), daftar faktor pembekuan darah dapat dilihat pada Lampiran B.

Trombin memiliki beberapa peranan yaitu yang pertama adalah kembali ke siklus sebelumnya untuk mempercepat aktivasi faktor V dan VIII. Peranan kedua adalah mengubah fibrinogen menjadi monomer fibrin yang larut. Peranan ketiga adalah membuat ikatan silang polimer fibrin dengan mengaktifkan faktor XIII menjadi XIIIa. Serta sebagai bioregulator hemostasis darah dalam keadaan normal dan patologis (Hamid, 2013).

Proses hemostasis yang kedua adalah fibrinolisis. Fibrinolisis adalah proses degradasi fibrin secara enzimatik oleh plasmin (Katzung *et al.*, 2012). Proses fibrinolisis ini akan mencegah terjadinya pembekuan darah secara berlebihan serta menghilangkan deposit polimer fibrin hingga menjadi produk degradasi yang larut air, sehingga dinding pembuluh dapat memulai proses penyembuhan (Hamid, 2013).

Abnormalitas sistem hemostasis dapat mengakibatkan terjadinya trombosis. Trombosis adalah pembentukan bekuan darah abnormal yang menyebabkan terganggunya aliran darah dalam sistem sirkulasi (Japardi, 2002). Massa abnormal itu disebut trombus. Dalam keadaan normal, pembentukan bekuan darah hanya terjadi jika ada cedera pada pembuluh darah. Namun ada beberapa kelainan dalam tubuh yang menyebabkan kecenderungan untuk terjadinya trombosis walaupun pembuluh darah tidak mengalami kerusakan. Kelainan tersebut antara lain kelainan genetik dan aterosklerosis. Kelainan genetik yang menyebabkan seseorang menjadi lebih mudah mengalami trombosis antara lain defisiensi zat-zat inhibitor koagulasi seperti antitrombin III, protein S dan protein C (Japardi, 2002). Sedangkan aterosklerosis adalah kondisi pembuluh darah arteri yang mengalami penyempitan akibat timbunan lipid, kolesterol, dan debris sel dalam arteri koroner. Timbunan tersebut berkumpul membentuk plak aterosklerosis. Plak aterosklerosis dapat mengalami ruptur dan menyebabkan luka pada dinding pembuluh darah sehingga memicu terbentuknya trombus (Starry &

Kalim, 2009). Akumulasi trombus pada pembuluh darah arteri koroner ini menyebabkan abnormalitas aliran darah yang mengakibatkan suplai nutrisi dan oksigen ke jaringan target terhambat dan bahkan kematian jaringan.

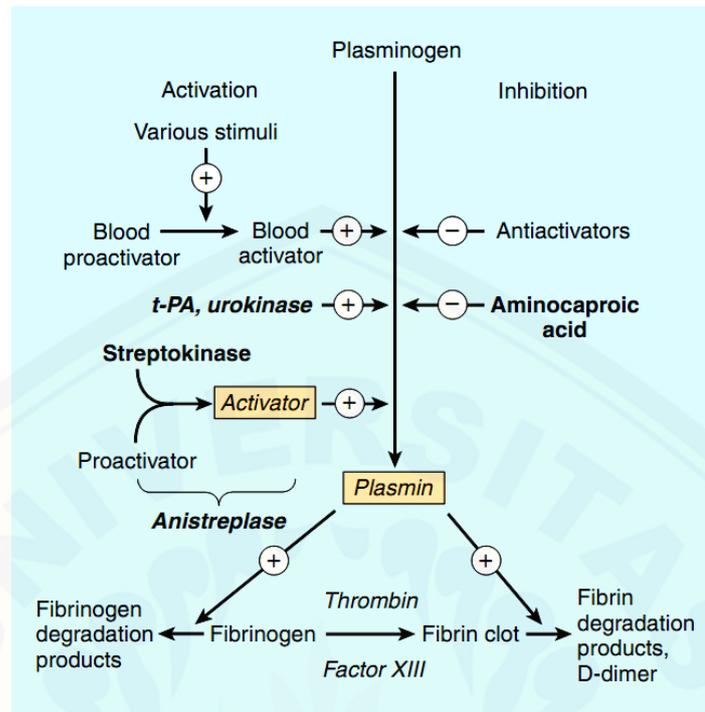
Hambatan aliran darah dan kematian jaringan akan memicu berbagai penyakit berbahaya dan mematikan seperti: jantung koroner (Djohan, 2004), infark miokard akut (Fletcher, 2007), stroke (Kholis & Ardini, 2011), dan trombosis vena dalam (Vascular Disease Foundation, 2012). Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Kementerian Kesehatan RI (2013), prevalensi infark miokard dengan umur diatas 15 tahun cukup tinggi yakni mencapai 1,5 % per 1000 orang tiap tahunnya.

2.2 Penanganan Trombosis Menggunakan Terapi Trombolisis

Penanganan trombosis yang selama ini dilakukan diantaranya adalah dengan operasi yang bertujuan untuk menghilangkan sumbatan trombus atau dengan terapi trombolisis. Terapi trombolisis adalah suatu perlakuan dengan mengandalkan obat-obatan fibrinolitik (trombolitik) yang bekerja dengan cara mendegradasi bekuan darah (Kholis & Ardini, 2011).

Menurut Kotb (2013), enzim fibrinolitik dibagi menjadi dua golongan yaitu aktivator plasminogen dan fibrinolitik (*like plasmin enzyme*). Aktivator plasminogen adalah enzim yang mengaktifasi plasminogen untuk menghasilkan enzim proteolitik plasmin. Obat trombolitik yang digunakan sebagai aktivator plasminogen diantaranya adalah *tissue plasminogen activators* (t-PA), *urokinase* (u-PA), dan *streptokinase* (Vijayaraghavan & Gnana, 2014). Mekanisme dari obat-obatan tersebut adalah menstimulasi konversi plasminogen menjadi plasmin yang mampu melisiskan bekuan fibrin sehingga aliran darah kembali lancar. Mekanisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Enzim mirip plasmin adalah enzim yang secara langsung mampu mendegradasi fibrin dalam bekuan darah tanpa melalui aktivasi plasminogen. Salah satu enzim mirip plasmin adalah enzim fibrinolitik. Titik kerja dari obat-obatan trombolitik secara umum adalah dengan cara mengaktifasi plasminogen menjadi plasmin, serta mendegradasi fibrinogen dan fibrin.



+ = mengaktivasi; - = menghambat

Gambar 2.3 Mekanisme fibrinolisis (Sumber: Katzung *et al.*, 2012)

Penggunaan obat-obatan trombolitik yang termasuk aktivator plasminogen tergolong mahal dan dapat menimbulkan efek samping yang membahayakan (Mohamed *et al.*, 2013). Resiko yang dapat diamati diantaranya adalah, penggunaan *streptokinase* pada stroke iskemik akut dapat menyebabkan pendarahan intraserebral dan resiko kematian yang cukup tinggi. Sementara itu, penggunaan *urokinase* dapat menyebabkan pendarahan intrakranial. Lebih jauh lagi, pemberian t-PA lebih dari 3 jam setelah serangan stroke dapat menyebabkan komplikasi dan gangguan syaraf (Kholis & Ardini, 2011). Oleh karena itu, penggunaan enzim fibrinolitik diharapkan dapat menjadi alternatif terbaik untuk menangani pasien trombosis. Dengan demikian, perlu adanya eksplorasi tentang model terapi trombolisis menggunakan agen fibrinolitik alternatif dengan biaya yang lebih murah dan diharapkan dapat mengurangi efek samping yang mungkin terjadi namun memiliki tingkat efektivitas yang sama.

2.3 Enzim Fibrinolitik dan Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin atau fibrinogen. Enzim protease adalah enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi peptida yang lebih sederhana. Dalam tubuh, enzim fibrinolitik atau plasmin diproduksi oleh sel endotel dalam saluran pankreas. Seiring dengan pertambahan usia dan pola konsumsi yang tidak seimbang, maka produksi plasmin secara alami menjadi semakin berkurang. Apabila hal ini terus berlangsung, maka sistem fibrinolisis tubuh akan terganggu sehingga memicu timbulnya penyakit trombosis yang mengarah pada berbagai penyakit berbahaya seperti stroke, aterosklerosis dan infark miokard akut (Bakta, 2007).

Enzim fibrinolitik dapat diproduksi dari berbagai sumber seperti: mikroorganisme (*Streptokinase*) (Chitte, 2013), hewan (*Lumbrokinase*) (Kusuma, 2004), pangan fermentasi (*Nattokinase*) (Meruvu & Vangalapati, 2011), dan *mushroom* (Mohamed *et al.*, 2013). Hal tersebut karena potensinya yang cukup tinggi sebagai agen pencegah atau terapi penyakit kardiovaskuler dengan memecah fibrin di dalam pembuluh darah. Menurut Vinoth *et al.* (2014), mikroorganisme merupakan sumber yang paling banyak digunakan untuk memproduksi enzim. Salah satu mikroorganisme sebagai sumber potensial penghasil fibrinolitik adalah bakteri.

Bakteri merupakan sumber penghasil enzim yang mudah diisolasi, dikembangkan dan diproduksi. Bakteri merupakan salah satu sumber penghasil enzim fibrinolitik, yaitu enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin dan fibrinogen. Bakteri lebih menguntungkan sebagai agen penghasil enzim karena memiliki beberapa keunggulan, yaitu mudah ditumbuhkan, pertumbuhan lebih cepat, kondisi produksi tidak tergantung musim dan waktu yang dibutuhkan relatif tidak lama (Demain & Vaishnav, 2009).

Dalam perkembangannya telah ditemukan berbagai bakteri yang mampu menghasilkan enzim fibrinolitik. Berikut merupakan beberapa contoh bakteri dari genus *Bacillus* dan *Streptomyces* yang digunakan sebagai agen fibrinolitik seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Bakteri penghasil enzim fibrinolitik

Bakteri	Enzim Fibrinolitik	Pustaka
<i>Bacillus</i>		
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillokina</i>	Mushtaq & Jamil, (2012)
<i>Bacillus substilis</i> A26	<i>Caseinolytic</i>	Agrebi <i>et al.</i> , (2009)
<i>Bacillus substilis</i> FR-33	<i>Urokinase</i>	Chen <i>et al.</i> , (2013)
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	<i>Nattokinase</i>	Yang, <i>et al.</i> , (2012)
<i>Bacillus substilis</i> ICTF-1	<i>Substilis</i>	Mahajan <i>et al.</i> , (2012)
<i>Streptomyces</i>		
<i>Streptomyces megasporus</i> SD5	<i>Actinokinase</i>	Chitte, (2013)
<i>Streptomyces sp.</i> CS684	<i>Actinokinase</i>	Simkhada <i>et al.</i> , (2010)

Di Indonesia, eksplorasi tentang bakteri penghasil enzim fibrinolitik telah banyak diperoleh dari berbagai sumber. Salah satunya dari lingkungan perairan. Diversitas lingkungan perairan yang meliputi suhu, tekanan dan jumlah nutrisi yang beragam menyebabkan bakteri perairan menjadi sangat kompleks dengan berbagai potensi kehidupan mikroskopis. Habitat yang khas dilingkungan perairan menjadikan bakteri memiliki kemampuan metabolisme dan fisiologi yang beragam untuk strategi bertahan hidup. Hal tersebut yang menjadi potensi untuk memproduksi suatu metabolit yang khas dan jarang ditemukan pada bakteri dilingkungan terestrial (Mahajan *et al.*, 2012).

2.4 Pemisahan Agen Fibrinolitik

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease ekstraseluler yang yang disekresikan ke lingkungan dan mampu menghidrolisis senyawa-senyawa yang bersifat protein menjadi produk degradasi yang lebih sederhana seperti oligopeptida, peptida rantai pendek dan asam amino yang berguna bagi kehidupan bakteri. Enzim ekstraseluler yang dihasilkan dipisahkan dari sel bakteri dengan sentrifugasi. Sentrifugasi bertujuan memisahkan enzim dari debris sel, organel sel serta senyawa pengotor yang berasal dari media pertumbuhan. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan tertentu, sehingga enzim yang diisolasi akan tertinggal dalam filtrat (supernatan) dan endapan yang terbentuk adalah kontaminan yang tidak diinginkan (Burgess, 2009).

Proses pemisahan dengan sentrifugasi merupakan pemisahan berdasarkan ukuran dan berat molekul. Partikel dengan berat, ukuran dan bentuk yang berbeda akan mengendap pada kecepatan sentrifugal yang berbeda. Semakin besar ukuran dan berat suatu partikel, semakin kecil kecepatan sentrifugal yang dibutuhkan untuk mengendapkan partikel tersebut. Proses sentrifugasi terhadap enzim-enzim yang bersifat rapuh dilakukan pada suhu rendah, sehingga kehilangan aktivitas enzim dapat diminimalisasi (Oss, 1989).

Perlakuan dengan sentrifugasi mungkin masih meninggalkan kontaminan yang tidak dikehendaki yang dapat mengurangi efektivitas enzim sehingga perlu dilakukan proses pemekatan enzim. Pemekatan enzim dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari komponen biomolekul lainnya (karbohidrat, lipid, dan asam nukleat) yang ada dalam ekstrak kasar protein. Metode yang biasa digunakan adalah presipitasi atau pengendapan protein. Presipitasi protein adalah proses pengendapan protein akibat terganggunya kestabilan koloid yang disebabkan oleh menurunnya muatan elektrostatis protein, sehingga gaya gravitasi akan lebih dominan dibandingkan gaya tolak menolak antar molekul. Berbagai metode yang digunakan dalam pemekatan enzim antara lain pemisahan protein berdasarkan kelarutan protein yang meliputi presipitasi dengan pelarut organik dan garam, serta pemisahan protein berdasarkan berat molekul protein yang meliputi dialisis dan membran ultrafiltrasi (Bollag *et al.*, 1996).

2.4.1 Pemisahan Protein Berdasarkan Kelarutan Protein

Kelarutan sisi hidrofilik protein tergantung pada muatan dan ikatan hidrogen dengan molekul air. Muatan suatu protein tergantung pada nilai pH dari media tempatnya berada. Pada pH isoelektrik (pI), nilai muatan protein adalah nol (netral). Titik isoelektrik adalah derajat keasaman atau pH ketika suatu molekul bermuatan netral akibat bertambahnya proton atau kehilangan muatan oleh reaksi asam-basa. Pada titik ini, suatu protein memperlihatkan nilai repulsi elektrostatis (gaya tolak menolak) yang paling rendah. Oleh karena itu kelarutan protein akan menurun dan akhirnya mudah mengendap (Oss, 1989). Metode ini disebut

presipitasi isoelektrik. Etanol adalah pelarut organik yang banyak digunakan untuk mengendapkan protein karena gugus hidroksil yang ada pada etanol bersifat kuat mengikat molekul air. Hal tersebut menyebabkan pH pelarut protein berubah mendekati titik isoelektriknya. Sehingga nilai muatan protein menjadi nol dan kelarutan protein menjadi berkurang. Akibatnya protein saling berinteraksi dan mengendap (Bollag *et al.*, 1996). Selain itu, waktu yang dibutuhkan pada presipitasi etanol relatif singkat dibandingkan dengan golongan alkohol lainnya seperti metanol dan n-propanol (Oktavia *et al.*, 2012).

Jika nilai *pI* tidak diketahui, maka konsentrasi tinggi pada beberapa garam juga dapat digunakan untuk presipitasi protein. Pada konsentrasi garam tinggi, kekuatan ionik garam akan semakin kuat sehingga garam dapat lebih mengikat molekul air dibandingkan protein. Menurunnya jumlah air yang terikat pada protein menyebabkan gaya tarik menarik antar molekul protein semakin kuat, sehingga mengakibatkan protein saling berinteraksi, beragregasi dan kemudian mengendap. Metode ini disebut *salting out* atau presipitasi garam. Amonium sulfat adalah garam yang sering digunakan karena memiliki kekuatan ionik yang tinggi, tidak merusak struktur protein, dan harganya yang relatif murah (Burgess, 2009).

Protein memiliki asam amino rantai samping hidrofilik yang dapat berinteraksi dengan air. Protein yang memiliki daerah hidrofilik yang sedikit akan beragregasi dan mengendap pada konsentrasi amonium sulfat yang relatif rendah dengan kejenuhan sekitar 20-30%, tabel presipitasi amonium sulfat dapat dilihat pada Lampiran D.2.1. Sebaliknya, protein yang memiliki daerah hidrofilik yang banyak akan beragregasi dan mengendap pada konsentrasi amonium sulfat yang lebih tinggi (Burgess, 2009).

2.4.2 Pemisahan Protein Berdasarkan Berat Molekul Protein

Teknik ini meliputi sentrifugasi, dialisis dan ultrafiltrasi. Kecepatan sentrifugasi yang tinggi (10000-20000g) biasanya digunakan untuk memisahkan debris sel dan organel yang berukuran besar dari protein ekstrak kasar jika protein

yang diinginkan adalah protein ekstraseluler yang larut dalam air. Supernatan kemudian digunakan untuk langkah pemurnian lebih lanjut.

Dialisis adalah metode yang sederhana namun memakan waktu, karena pemisahan tergantung pada difusi. Sampel yang akan dipisahkan ditempatkan didalam kantong dialisis yang terbuat dari membran semipermeabel dengan ukuran pori-pori sebesar 10 kDa. Pori-pori tersebut akan memungkinkan molekul kecil seperti amonium sulfat dan ion lain untuk melewatinya. Sedangkan protein yang memiliki ukuran molekul lebih besar akan tertahan didalamnya (Burgess, 2009). Teknik ini biasanya digunakan untuk menghilangkan garam dari pelarut protein. Dialisis juga digunakan untuk memekatkan pelarut protein. Perlakuan dilakukan beberapa kali hingga ion-ion yang tidak diinginkan tidak lagi terdeteksi. Misalnya, keberadaan amonium sulfat dapat dideteksi dengan larutan Barium klorida. Barium klorida akan berikatan dengan amonium sulfat menghasilkan endapan barium sulfat yang berwarna putih (Bollag *et al.*, 1996).

Teknik yang selanjutnya adalah ultrafiltrasi. Menurut Bollag *et al.* (1996), Ultrafiltrasi mirip dengan dialisis yaitu menggunakan membran dengan ukuran pori yang spesifik sebagai pemisah protein. Dengan menggunakan tekanan atau gaya sentrifugal, molekul dengan ukuran yang lebih kecil dari pori-pori membran akan berpindah melewati membran. Membran ultrafiltrasi dibagi dalam berbagai macam jenis *cut off* tertentu dengan tipe membran *polietersulfone membrane* (PES) Corning Spin-X UF 500 dengan *Molecular Weight Cut Off* (MWCO) 5, 10, 30, 50 dan 100 kDa. Menurut Peng *et al.* (2003), protein atau enzim fibrinolitik memiliki berat molekul yang lebih besar dari 10 kDa. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan membran ultrafiltrasi dengan MWCO 10 kDa.

Hasil pemekatan dengan metode ultrafiltrasi, akan menghasilkan dua fase yaitu *retentate* dan *permeate*. *Permeate* merupakan protein yang dapat melewati membran dan berukuran lebih kecil dari 10 kDa, sedangkan *retentate* adalah protein yang berukuran lebih besar dari 10 kDa sehingga tidak dapat melewati membran.

2.5 Analisis Konsentrasi Protein

Pengukuran konsentrasi protein adalah metode analisis protein lebih lanjut yang digunakan untuk mengetahui kadar protein yang terkandung pada masing-masing sampel presipitat protein. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk analisis konsentrasi protein antara lain metode kjeldahl, metode Lowry, metode Bradford dan lain sebagainya.

Penggunaan metode kjeldahl didasarkan pada penetapan nitrogen total pada asam amino, protein dan senyawa yang mengandung nitrogen. Kadar protein yang ditentukan berdasarkan metode kjeldahl disebut sebagai kadar protein kasar (*crude protein*) karena teranalisis pula senyawa N bukan protein, seperti urea, asam nukleat, purin, dan pirimidin (Bollag *et al.*, 1996).

Metode lain yang dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi protein sampel adalah metode Lowry. Metode ini didasarkan pada kemampuan reagen Lowry (folin ciocalteu) yang dapat mendeteksi residu tirosin yang terdapat dalam protein. Karena kandungan fenolik dalam residu tersebut, mampu mereduksi fosfotungstat dan fosfomolibdat yang merupakan konstituen utama dalam reagen lowry, menjadi tungsten dan molibdenum yang berwarna biru. Warna biru tersebut dapat dideteksi secara kolorimetri pada panjang gelombang 500 nm (Lowry *et al.*, 1951). Metode Lowry lebih sensitif dibandingkan dengan metode kjeldahl. Namun, metode ini hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur peptida panjang.

Metode selanjutnya untuk mengukur konsentrasi protein adalah metode Bradford. Metode ini lebih mudah, cepat dan lebih sensitif dibandingkan dengan metode Lowry. Metode Bradford didasarkan pada pengikatan zat warna Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) pada protein. Zat warna CBBG bereaksi cepat dengan protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (*tyrosine, tryptophan, dan phenylalanine*). Reagen CBBG bebas berwarna merah-kecoklatan, sedangkan dalam suasana asam reagen CBBG akan berada dalam bentuk anionik yang akan mengikat protein membentuk warna kebiruan. Warna ini dideteksi secara kolorimetri pada panjang gelombang 595 nm (Bradford, 1976).

2.6 Penentuan Aktivitas Enzim Fibrinolitik Menggunakan Metode Zimografi

Elektroforesis adalah pemisahan molekul berdasarkan berat molekul dan muatan elektronnya (Angky, 2011). Salah satu metode elektroforesis yang banyak digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim secara langsung adalah zimografi. Zimografi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memvisualisasikan aktivitas enzim dalam gel tanpa denaturasi protein (Kundapur, 2013). Zimografi banyak digunakan karena bersifat fleksibel, dan memungkinkan peneliti untuk mengubah substrat yang sesuai dengan jenis enzim yang akan diuji. Sensitivitas zimografi ditunjukkan oleh zona bening pada gel yang menunjukkan kemampuan enzim dalam memecah substrat yang telah terpolimerisasi pada media poliakrilamida. Mekanisme zimografi terjadi berdasarkan *electrophoretic mobility* yaitu pemisahan komponen atau molekul bermuatan berdasarkan tingkat migrasi dan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik. Molekul protein yang telah dipisahkan selanjutnya di *renaturasi* untuk mengetahui aktivitas enzim dari fraksi protein tertentu dalam memecah substrat (Bollag *et al.*, 1996). Beberapa molekul detergen non-ionik dapat digunakan untuk *renaturasi* protein setelah elektroforesis SDS-PAGE (Zeng *et al.*, 1996). Detergen non-ionik tersebut antara lain Triton X-100, Lubrol PX, dan Tween 20. Menurut Zeng *et al.* (1996), Tween 20 merupakan detergen non-ionik yang paling efektif dalam *renaturasi* protein setelah elektroforesis SDS-PAGE, yaitu dengan cara mengembalikan stabilitas pengikatan ligan pada protein yang sebelumnya terganggu akibat adanya agen pendenaturasi protein selama proses elektroforesis berlangsung. Oleh karena itu, tween 20 dapat digunakan untuk mengembalikan konformasi protein, sehingga aktivitas dari enzim yang dihasilkan dapat berlangsung secara optimal.

Gel poliakrilamida merupakan media penahan yang digunakan untuk memisahkan molekul protein. Gel poliakrilamida terbentuk oleh adanya polimerisasi dari monomer akrilamida yang membentuk ikatan silang dengan N,N'-metilen-bis-akrilamida. Semakin tinggi konsentrasi akrilamida yang digunakan, semakin lambat pergerakan protein didalam gel karena kisi-kisi yang terbentuk antara akrilamida dengan N,N'-metilen-bis-akrilamida semakin kecil. Komponen lain yang dibutuhkan adalah substrat, N,N,N',N'-tetrametil-etilen-

diamin (TEMED), amonium persulfat, dan deterjen sodium dodesil sulfat (SDS). Substrat merupakan komponen utama dalam mengetahui aktivitas enzimatik suatu protein. Substrat yang digunakan disesuaikan dengan jenis aktivitas yang diinginkan. Substrat tersebut akan berpolimerisasi dengan akrilamida. Sedangkan TEMED adalah katalis yang menyebabkan pembentukan radikal bebas selama reaksi ikatan silang antar molekul akrilamida. Jumlah TEMED menentukan kecepatan pengerasan gel. Amonium persulfat berfungsi menginisiasi pembentukan radikal bebas yang mengikat semua molekul akrilamida. Penggunaan Deterjen SDS memberikan muatan negatif pada protein yang dianalisa (Bollag *et al.*, 1996).

Sampel protein yang diinjeksikan ke dalam sumuran gel diberi warna dengan bromphenol biru yang terionisasi. Fungsi pewarna adalah untuk memonitor jalannya elektroforesis. Pada metode zimografi tidak dilakukan proses pemanasan dan penggunaan β -merkaptoetanol sebagai pendenaturasi protein. Hal tersebut dikarenakan protein dipertahankan untuk tetap aktif sehingga aktivitas enzim dapat diamati (Bollag *et al.*, 1996). Berat molekul protein yang menunjukkan aktivitas dapat diketahui dengan membandingkan jarak migrasi protein sampel dengan penanda protein yang berat molekulnya telah diketahui (Burgess, 2009).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Dasar, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember mulai bulan Desember 2014 sampai dengan bulan Juli 2015.

3.2 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Rancangan penelitian meliputi enam tahap yaitu tahap pertama adalah produksi protein ekstrak kasar dari isolat bakteri BA 9920 dari perairan Pantai Bandalit Jember. Tahap kedua adalah presipitasi dengan dua metode yaitu presipitasi amonium sulfat (*salting out*) dan presipitasi etanol. Tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui metode yang paling optimal dalam memperoleh jumlah protein (presipitat) terbanyak. Tahap ketiga adalah pengukuran kadar protein dari masing-masing presipitat dengan menggunakan metode Bradford. Tahap keempat adalah uji aktivitas fibrinolitik secara semikuantitatif terhadap masing-masing presipitat yang dihasilkan menggunakan metode *fibrin plate assay*. Aktivitas dari uji fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar presipitat bakteri. Tahap kelima adalah pemekatan presipitat protein untuk meningkatkan konsentrasi protein. Serta tahap terakhir yaitu pengukuran berat molekul protein spesifik fibrinolitik dengan metode Zimografi. Diagram alir tahapan penelitian ditunjukkan pada Lampiran A.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu cawan petri, jarum ose, pinset, tabung reaksi, *beaker glass*, *Erlenmeyer glass*, gelas ukur, gelas bunsen, lampu bunsen, tabung *sentrifuge* 100 ml, *microtube* 1,5 ml, *magnetic stirrer*, mikropipet (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), mikrotip (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), pH meter, vortex, neraca analitik, *sentrifuge*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), inkubator 37 °C, inkubator suhu 45-65 °C, inkubator *shaker*, autoklaf, lemari es 4 °C, freezer -20 °C, oven, *hotplate stirrer*, spektrofotometer, membran ultrafiltrasi Spin-X 500 UF MWCO 10 kDa dan seperangkat alat zimografi.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri BA 9920 (Herawati, 2010) yang berasal dari sampel perairan Pantai Bandelait Kabupaten Jember, media *Nutrien Agar* (NA), media *Nutrien Broth* (NB), media *Skim Milk Agar* (SMA), media *Luria Bertani Broth* (LB), media fibrin, trombin, fibrinogen, gliserol, akuadest, akuabidest, alkohol 70 %, amonium sulfat, etanol, membran dialisis, barium klorida, *acrylamide*, *N,N'-metilen-bis-akrilamide*, *ammonium persulphate* (APS) 10%, *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10%, penanda protein (*protein markers*), bufer fosfat 0,05 M pH 8, bufer sampel, *phosphate buffer saline* (PBS) 0,05 M pH 7,4, bufer Tris HCl 1,5 M (pH 8,8), bufer Tris HCl 0,5 M (pH 6,8), bufer elektroda, *N,N,N',N'-tetrametiletilena diamin* (TEMED), Tween 20 2,5%, larutan pewarna (*staining*) dan larutan peluntur (*destaining*).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Peremajaan Isolat Bakteri BA 9920

Peremajaan isolat dilakukan dengan cara mengambil 1 ose biakan isolat bakteri BA 9920 yang telah disimpan dalam stok gliserol, kemudian menggoreskannya secara aseptis dengan metode *streak plate 4 quadrant* pada media NA padat. Setelah itu diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30 °C selama 48 jam.

3.4.2 Produksi Enzim Ekstraseluler

Biakan bakteri BA 9920 hasil peremajaan kemudian diambil *single colony* dan diinokulasikan pada 12 ml media LB sebagai *starter*. Kemudian *starter* diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 130 rpm selama 12 jam (awal fase eksponensial). Pembuatan kultur *starter* sebelum produksi enzim bertujuan untuk memperbanyak sel yang seragam dengan umur fase pertumbuhan yang sama. Kemudian sebanyak 10 ml *starter* (2% (v/v)) ditumbuhkan pada 500 ml media LB cair. Selanjutnya kultur diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 130 rpm selama 12 jam/kisaran fase logaritmik (Eka, 2013). Kemudian kultur yang sudah tumbuh disentrifugasi pada suhu 4 °C dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Kemudian diambil supernatan bebas sel dan diletakkan pada suhu dingin (*on ice*). Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protein.

3.4.3 Presipitasi Supernatan Isolat Bakteri BA 9920

a. Presipitasi Amonium Sulfat

Sebanyak 250 ml supernatan bebas sel kemudian dipresipitasi dengan menambahkan amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Untuk mengetahui persentase kejenuhan amonium sulfat terbaik untuk mengendapkan enzim fibrinolitik (menggunakan Tabel dalam Bollag *et al.*, 1996), terlebih dahulu dilakukan optimasi. Optimasi dilakukan pada persentase kejenuhan amonium sulfat 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% dari supernatan bebas sel dengan volume tertentu. Selanjutnya dihomogenasi menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu dingin dengan kecepatan 150 rpm selama 60 menit. Kemudian disentrifugasi suhu 4 °C dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Kemudian diambil bagian pelet yang dihasilkan. Pelet tersebut selanjutnya di keringkan dengan menggunakan pengeringan beku (*freeze drying*) untuk menghilangkan kandungan air pada presipitat yang dihasilkan. Pelet ditimbang dan dilarutkan kedalam PBS pH 7,4 dengan perbandingan volume pelet dan bufer adalah 1:2. Selanjutnya dilakukan proses dialisis menggunakan 0,05 M bufer PBS pH 7,4.

Presipitat yang diperoleh dari metode presipitasi amonium sulfat, kemudian di dialisis untuk memisahkan protein dari komponen molekul lainnya. Persiapan membran dialisis dilakukan dengan memotong membran selofan sepanjang ± 8 cm. Kemudian membran dimasukkan pada *beaker glass* berisi 500 ml larutan bufer dengan komposisi 0,1 M NaHCO_3 dan 0,05 M EDTA. Selanjutnya membran selofan direbus selama 1 jam pada suhu 60 °C. Setelah satu jam, larutan bufer diganti dengan larutan bufer yang baru dengan komposisi sama untuk kemudian direbus kembali selama 1 jam. Selanjutnya membran direbus dengan aquabidest selama 1 jam. Kemudian membran selofan disimpan dalam 250 ml aquabidest ditambah 0,25 ml kloroform.

Proses dialisis dimulai dengan membilas membran selofan hasil penyimpanan dengan aquabidest. Kemudian salah satu ujung membran diikat dengan benang, untuk selanjutnya dijepit menggunakan klep dialisis. Selanjutnya presipitat yang telah diresuspensi dengan 0,05 M PBS pH 7,4 dimasukkan kedalam membran selofan. Kemudian ujung membran yang lain diikat dan dijepit dengan klep dialisis. Selanjutnya membran yang telah dijepit kedua sisinya dimasukkan kedalam *beaker glass* berisi 0,05 M PBS pH 7,4. Kemudian di *stirring* pada suhu 4 °C selama 12 jam. Setelah 12 jam, bufer diganti dengan 0,05 M PBS pH 7,4 yang baru untuk selanjutnya di *stirring* kembali pada suhu 4 °C selama 12 jam. Selanjutnya dialisat yang ada didalam membran diambil dan diuji bebas amonium sulfat. Uji bebas amonium sulfat dilakukan dengan penambahan BaCl_2 2%. Dialisat yang tidak mengandung amonium sulfat ditunjukkan dengan tidak adanya endapan putih yang terbentuk. Selanjutnya dialisat yang bebas amonium sulfat dicatat volume akhirnya untuk kemudian disimpan pada suhu 4 °C.

b. Presipitasi Etanol

Sebanyak 250 ml supernatan bebas sel pada suhu 4 °C di tambah etanol 95% suhu -20 °C dengan perbandingan supernatan dan etanol adalah 1:4 (Dinoto *et al.*, 2011). Kemudian dihomogenasi menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu dingin dengan kecepatan 150 rpm selama 15 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit. Kemudian diambil bagian pelet yang dihasilkan. Pelet tersebut selanjutnya di keringkan dengan menggunakan pengeringan beku (*freeze drying*) untuk menghilangkan kandungan air pada presipitat yang dihasilkan. Pelet ditimbang dan dilarutkan kedalam aquades dengan perbandingan volume pelet dan aquades adalah 1:2.

3.4.4 Pengukuran Konsentrasi Protein

Protein yang telah dipisahkan, selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford menggunakan standar protein *Bovine Serum Albumin* (BSA). Sebanyak 100 µl sampel protein ditambahkan ke dalam 900 µl pewarna Bradford dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer Vis pada panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah pewarna Bradford. Absorban larutan sampel diplotkan pada kurva standar yang diperoleh dari plot larutan standar sehingga didapat konsentrasi protein sampel.

Pembuatan kurva standar diawali dengan pembuatan larutan standar menggunakan larutan BSA. Larutan standar protein dibuat dengan melarutkan 0,01 gr BSA kedalam 10 ml aquades sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Larutan stok kemudian diencerkan dengan cara melarutkannya kedalam aquades steril dengan perbandingan 1:9. Larutan stok tersebut dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 10, 25, 50, 75, dan 100 µl/ml. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap standar protein dengan menambahkan 100 µl seri larutan standar dengan 900 µl reagen Bradford dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Larutan ini memberikan warna biru dan dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Sehingga didapat kurva standar yang merupakan

persamaan garis regresi ($y = ax + b$) antara nilai absorbansi sebagai ordinat dan konsentrasi protein sebagai absis. Dengan demikian akan didapatkan persamaan matematik untuk mengukur konsentrasi protein sampel.

3.4.5 Uji Aktivitas Fibrinolitik Presipitat Isolat Bakteri BA 9920

Sampel protein dari isolat bakteri BA 9920 yang diperoleh dari hasil pemekatan dengan presipitasi selanjutnya dianalisis aktivitas fibrinolitiknya menggunakan metode *fibrin plate assay*. Sebanyak 100 μ l larutan trombin dimasukkan kedalam Erlenmeyer berisi 4 ml agarosa steril dan 900 μ l fibrinogen 0,1%. Campuran selanjutnya dituang ke dalam cawan petri steril dan didiamkan selama 1 jam hingga memadat. Selanjutnya sebanyak 10 μ g sampel protein hasil presipitasi menggunakan amonium sulfat dan etanol, masing-masing diteteskan pada lubang yang telah dibuat pada media. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 24 jam. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar presipitat. Pengukuran diameter setiap zona bening dilakukan sebanyak tiga kali menggunakan penggaris dengan satuan millimeter (mm). Kemudian hasil yang diperoleh dijumlah dan dirata-rata.

3.4.6 Pemekatan Protein dengan Membran Ultrafiltrasi

Presipitat yang memiliki aktivitas fibrinolitik lebih tinggi, selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa. Teknik ini digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Proses pemisahan protein dengan berat molekul diatas 10 kDa dilakukan dengan sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 10000 rpm pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 2-3 menit. Selama proses ini, molekul-molekul protein dengan berat molekul lebih kecil dari 10 kDa akan melewati pori-pori membran sedangkan protein dengan berat molekul lebih besar dari 10 kDa akan tertahan di dalam membran. Hasil pemekatan tersebut, diperoleh 2 fase yaitu fase atas (*retentate*) dan fase bawah (*permeate*). *Retentate* adalah fase cair yang mengandung protein dengan berat molekul lebih besar dari 10 kDa. Sedangkan *permeate* adalah fase

cair yang mengandung protein dengan berat molekul lebih kecil dari 10 kDa sehingga dapat tersaring melewati membran. Fase *retentate* inilah yang di analisis lebih lanjut menggunakan metode zimografi.

3.4.7 Zimografi

Berat molekul protein spesifik dari presipitat isolat bakteri BA 9920 dianalisis dengan metode Zimografi. Konsentrasi akrilamida yang digunakan pada gel pemisah (*separating*) adalah sebesar 12,5%. Sebanyak 4 ml stok akrilamida dilarutkan dalam 2,5 ml *lower gel buffer* dan 1,2 ml aquadest. Kemudian ditambah 2 ml fibrinogen 0,25%, 0,2 ml trombin, 100 µl ammonium persulfat 10% dan 10 µl TEMED. Gel dicetak dan dibiarkan mengeras. Selanjutnya ditambah gel penahan (*stacking*). Gel penahan mengandung 4,5% akrilamida. Sebanyak 0,45 ml stok akrilamida dilarutkan dalam 0,75 ml *upper gel buffer* dan 1,8 ml aquadest. Kemudian ditambah 10 µl ammonium persulfat 10% dan 5 µl TEMED. Gel dibiarkan memadat dan siap digunakan untuk elektroforesis. Persiapan sampel protein dilakukan dengan menambahkan 10 µl *retentate* dengan 10 µl bufer sampel. Sampel dilarutkan ke dalam bufer yang tidak mengandung β-merkaptoetanol dan tidak memerlukan pemanasan. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel sebanyak 20 µl. Selanjutnya sebanyak 8 µl penanda protein dimasukkan ke dalam sumuran gel. Gel kemudian dialiri listrik pada tegangan 120 V selama 80 menit.

Gel yang telah dielektroforesis kemudian di *renaturasi* dalam larutan Tween 20 2,5% (v/v) sambil di goyangkan selama 1 jam. Kemudian gel direndam dalam 0,05 M bufer fosfat pH 8 pada suhu 60 °C selama 30 menit. Tahap ini disebut dengan *digesti*, yaitu waktu untuk masing-masing fraksi protein melakukan proses hidrolisis fibrin. Selanjutnya gel diwarnai (*staining*) dalam larutan *Coomasie Gel Stain* selama minimal 10 menit. Warna biru akibat pewarnaan kemudian dicuci beberapa kali (*destaining*) dengan *Coomasie Gel Destain* hingga didapatkan pita protein tidak berwarna dengan latar gel yang berwarna biru. Zona bening yang terbentuk merupakan hasil pemecahan substrat