



**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI DARI  
PERAIRAN PANTAI PAPUMA KABUPATEN JEMBER**

**SKRIPSI**

Oleh

**Arif Setiawan  
NIM 081810401029**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI DARI  
PERAIRAN PANTAI PAPUMA KABUPATEN JEMBER**

**SKRIPSI**

Oleh

**Arif Setiawan  
NIM 081810401029**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI DARI  
PERAIRAN PANTAI PAPUMA KABUPATEN JEMBER**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Arif Setiawan**  
**NIM 081810401029**

**JURUSAN BIOLOGI**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2013**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tuaku tercinta yang telah memberikan kasih sayang dan do'a yang tiada henti;
2. kakak-kakak dan adikku tersayang yang telah memberikan dukungan dan motivasi selama menempuh pendidikan;
3. guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah mendidik dan ilmu yang telah diberikan;
4. Almamater Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

Dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata. Untuk menjadi pengajaran dan peringatan bagi tiap-tiap hamba yang kembali (mengingat) ALLAH.  
(terjemahan Surat *Al-Qaaf* Ayat 7-8)<sup>\*)</sup>

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo.

## **PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Arif Setiawan

NIM : 081810401029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember” adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya. Skripsi ini dibiayai oleh grup penelitian, ketua Dr.rer.nat Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Januari 2013

Yang menyatakan,

Arif Setiawan  
NIM 081810401029

## **SKRIPSI**

# **SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI DARI PERAIRAN PANTAI PAPUMA KABUPATEN JEMBER**

Oleh

Arif Setiawan  
NIM 081810401029

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Sattya Arimurti, S.P., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Sutoyo, M.Si.

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Jember.

### Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Sattya Arimurti, S.P., M.Si.  
NIP 197403311999032001

Drs. Sutoyo, M.Si.  
NIP 196610141992031002

Anggota I,

Anggota II,

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

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

Mengesahkan  
Dekan,

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



## RINGKASAN

**Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember;** Arif Setiawan, 081810401029; 2013: 38 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Bekuan darah yang berlebihan dalam pembuluh darah akan menimbulkan gangguan aliran darah seperti berkurangnya suplai oksigen dan nutrisi ke jaringan (*iskemik*) atau bahkan kematian jaringan (*infark*). Bekuan darah memiliki komponen protein utama yaitu fibrin yang terbentuk dari fibrinogen melalui mekanisme yang melibatkan peran trombin. Akumulasi dari fibrin yang berlebih dalam pembuluh darah biasanya menghasilkan trombosis, yang mengarah pada infark miokard akut dan penyakit kardiovaskular lainnya. Terapi untuk penderita trombosis salah satunya dengan agen fibrinolitik yang bekerja dengan cara mendegradasi fibrin dalam bekuan darah. Mikroba adalah sumber penting bagi agen penghasil enzim fibrinolitik terutama dari bakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan agen fibrinolitik yang dihasilkan oleh isolat bakteri asal Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember. Hasil penelitian ini diharapkan memperoleh agen fibrinolitik baru dalam mengatasi penyakit trombosis.

Penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap analisis laboratorium secara berkesinambungan. Pada tahap pertama dilakukan uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik terhadap 23 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember berdasarkan metode *plate agar*. Uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Tahap kedua adalah dipilih satu isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi dan dibuat kurva pertumbuhannya. Tahap ketiga adalah karakterisasi protein ekstrak kasar meliputi produksi protein dalam media kultur cair dari isolat bakteri terpilih kemudian

dilakukan pemisahan molekul protein menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa sehingga diperoleh *retentate*. Selain itu, protein ekstrak kasar dari *retentate* tersebut ditentukan konsentrasinya menggunakan metode Bradford. Selanjutnya, *retentate* diuji aktivitas fibrinolitiknya secara semikuantitatif pada media fibrin (*fibrin plate assay*) dan penentuan berat molekul protein menggunakan metode (SDS-PAGE). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, dan foto.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 23 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember diperoleh 11 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Hasil uji aktivitas fibrinolitik dari 11 isolat yang bersifat proteolitik diperoleh 3 isolat bakteri memiliki aktivitas fibrinolitik. Isolat dengan kode WU 021055\* menunjukkan nilai indeks aktivitas enzim fibrinolitik tertinggi yaitu sebesar 11. Selanjutnya hasil kurva pertumbuhan isolat bakteri WU 021055\* menunjukkan fase eksponensial dimulai dari jam ke-8 sampai jam ke-20 dengan jumlah sel berturut-turut adalah  $2,4 \times 10^8$  sel/ml dan jumlah sel tertinggi  $8,0 \times 10^8$  sel/ml. Protein dalam supernatan bebas sel dari isolat bakteri WU 021055\* setelah dilakukan pemisahan menghasilkan *retentate* dan *permeate*. *Retentate* sebanyak 5  $\mu$ l memiliki aktivitas fibrinolitik dengan diameter zona bening 1,45 cm dengan konsentrasi protein sebesar 0,0042 mg/ml. Sedangkan *permeate* tidak memiliki aktivitas fibrinolitik dengan konsentrasi protein sebesar 0,0017 mg/ml. Hasil SDS-PAGE dari *retentate* memiliki 11 pita protein dengan perkiraan berat molekul sebesar 26,9, 31,2, 35,9, 39,2, 42,9, 45,7, 58, 59, 63,5, 80,8, dan 82,5 kDa.

Kesimpulan pada penelitian ini bahwa isolat bakteri WU 021055\* memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi dengan indeks fibrinolitik sebesar 11. Substansi *retentate* sampel protein ekstrak kasar dari isolat WU 021055\* memiliki agen fibrinolitik dalam mendegradasi fibrin.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Swt., yang senantiasa melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1 di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember dengan skripsi yang berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember”. Skripsi ini disusun berdasarkan penelitian yang dilakukan penulis di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Dasar, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Sattya Arimurti, S.P., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah sabar dan meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan bimbingan, pengarahan, petunjuk, dan motivasi;
2. Dr.rer.nat Kartika Senjarini, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Utama sebelumnya dan selaku ketua grup penelitian *Transmission Blocking Vaccine* (TBV) dan Bakteri yang telah memberikan bantuan dana sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik, dan Drs. Sutoyo, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota Pengganti yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan meluangkan waktu dalam penulisan skripsi ini;
3. Kahar Muzhakar, S.Si., Ph.D., dan Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang berguna bagi penulis hingga terselesaikannya skripsi ini;
4. Ir. Endang S., selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi, dan Purnama Okviandari, S.P., M.P., selaku teknisi Laboratorium Biologi Dasar yang telah membantu dan memberikan nasehat kepada penulis pada saat penelitian;

5. rekan kerjaku Madaniyah, Dewi Eka, Emy, Puput, atas bantuan, kerjasama, dan dukungan yang diberikan selama penelitian; juga teman-temanku Syubbanul Wathon, Ika Agus, Hidayah, Rinda Medya, Edia Fitri, Imam Hanafy, Siti Nur Azizah, dan Widya Yuniar yang telah memberi dorongan atau semangat selama di Lab. Biodas. dan Lab. Mikro., dan teman-teman seperjuangan angkatan 2008, terima kasih atas kebersamaan selama waktu kuliah;
6. Ibunda Wiji Astutik dan Ayahanda Abdul Razak tercinta yang telah mencurahkan kasih sayang, do'a, dan nasihatnya yang tiada henti demi terselesaikannya skripsi ini; serta
7. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya atas perhatian dan bantuannya selama ini.

Semoga do'a, bimbingan, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan dari Allah Swt. Penulis sangat mengharapkan segala masukan yang bersifat kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis, pembaca, dan kemajuan ilmu pengetahuan di negara Indonesia.

Jember, Februari 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Batasan Masalah</b> .....	2
<b>1.4 Tujuan</b> .....	3
<b>1.5 Manfaat</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Bakteri sebagai Sumber Penghasil Agen Fibrinolitik</b> .....	4
<b>2.2 Mekanisme Kerja Agen Fibrinolitik dalam Mendegradasi Fibrin</b> .....	5
<b>2.3 Pemisahan dan Penentuan Berat Molekul Protein Ekstrak Kasar Agen Fibrinolitik</b> .....	8

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>16</b>
3.4.1 Peremajaan Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember .....	16
3.4.2 Uji Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri .....	17
3.4.3 Uji Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri .....	17
3.4.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan dari Isolat Bakteri Terpilih .....	17
3.4.5 Karakterisasi Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri Terpilih .....	18
<b>3.5 Analisis Data .....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Kemampuan Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri WU .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2 Kemampuan Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri WU .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri WU 021055* .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Karakteristik Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri         WU 021055* .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Berat Molekul Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri         WU 021055* .....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>32</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>DAFTAR ISTILAH .....</b>	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>39</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Bakteri penghasil agen fibrinolitik .....	4
4.1 Aktivitas proteolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember pada Media SMA selam 48 jam .....	24
4.2 Aktivitas fibrinolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember pada Media Fibrin Agar selama 48 jam .....	26

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mekanisme kerja agen fibrinolitik dalam sistem fibrinolisis (Sumber: Katzung, 2006) .....	7
3.1 Diagram alir skrining agen fibrinolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember .....	14
4.1 Zona bening yang menunjukkan aktivitas proteolitik dari isolat bakteri, (a) WU 021005; b) WU 021055*; (c) WU 021012* (d) WU 021015*; (e) WU 021004; (f) WU 021001*; (g) WU 6956; (h) WU 994; (i) WU 991; (j) WU 9918; (k) WU 6970; (l) WU 6917; (m) WU 021042; (n) WU 997; (o) WU 021018; (p) WU 6916; (r) WU 994; dan (s) WU 021052 pada Media SMA .....	23
4.2 Zona bening yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik dari isolat bakteri, (a) WU 021005; (b) WU 021012*; (c) WU 021055*; (d) WU 021015*; (e) WU 021004; dan (f) WU 021001* pada Media Fibrin .....	25
4.3 Kurva pertumbuhan isolat bakteri WU 021055* dari Perairan Pantai Papuma Jember selama 24 jam .....	28
4.4 Aktivitas fibrinolitik protein ekstrak kasar dari isolat bakteri WU 021055* secara semikuantitatif pada Media Fibrin Agar, (a); (d) supernatan bebas sel; (b) <i>retentate</i> ; (c) <i>permeate</i> dan (e) media LB steril .....	30
4.5 Hasil SDS-PAGE protein ekstrak kasar dari isolat bakteri WU 021055*, (a) hasil <i>running</i> SDS-PAGE; (b) visualisasi SDS-PAGE; (M) <i>marker</i> protein HMW; (R) <i>retentate</i> .....	31



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>A. KOMPOSISI MEDIA DAN LARUTAN .....</b>	39
<b>A.1 Komposisi Media Kultur dan Uji Aktivitas .....</b>	39
<b>A.2 Komposisi Larutan Uji .....</b>	39
<b>B. DATA PERHITUNGAN JUMLAH SEL ISOLAT BAKTERI WU 021055* .....</b>	40
<b>C. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN .....</b>	41
<b>C.1 Absorbansi Tingkatan Konsentrasi BSA untuk Pembuatan     Standar BSA .....</b>	41
<b>C.2 Kurva Standar BSA .....</b>	41
<b>C.3 Penentuan Konsentrasi Protein .....</b>	42
<b>D. ELEKTROFORESIS SDS-PAGE .....</b>	43
<b>D.1 Preparasi <i>Buffer</i> Elektroforesis SDS-PAGE .....</b>	43
<b>D.2 Preparasi Gel Elektroforesis SDS-PAGE .....</b>	43
<b>D.3 <i>Marker</i> Protein HMW pada SDS-PAGE .....</b>	44
<b>D.4 Kurva Standar <i>Marker</i> Protein .....</b>	44
<b>D.5 Jarak Migrasi dan Log BM <i>Marker</i> Protein HMW .....</b>	45
<b>D.6 Penentuan Berat Molekul Protein Sampel .....</b>	45

## DAFTAR SINGKATAN

t-PA	= <i>tissue-type plasminogen activator</i>
SK	= streptokinase
UK	= urokinase
Anistreplase (APSAC)	= <i>anisoylated purified streptokinase activator complex</i>
HMW	= <i>high molecular weight</i>
MWCO	= <i>molecular weight cut off</i>
PBS	= <i>phosphate buffer saline</i>
SDS-PAGE	= <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrilamid gel electrophoresis</i>
TEMED	= N,N,N',N'-tetrametiletilena diamin
APS	= amonium persulfat

## **BAB 1. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Infark miokard akut atau yang lebih dikenal dengan serangan jantung merupakan penyakit yang terjadi akibat sumbatan bekuan darah (trombus) pada pembuluh darah jantung (arteri koronaria). Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2002, penyakit infark miokard akut merupakan penyebab kematian utama dengan angka mortalitas 220.000 (14%). Pada tahun 2004, penyakit tersebut juga merupakan penyebab kematian utama di dunia. Terhitung sebanyak 7.200.000 (12,2%) kematian terjadi akibat penyakit ini di seluruh dunia (World Health Organization, 2008).

Salah satu penyebab dari infark miokard akut adalah trombosis yang diakibatkan oleh ruptur dari plak aterosklerosis pada dinding pembuluh darah jantung sehingga menghasilkan bekuan darah. Bekuan darah terbentuk disebabkan karena sistem sirkulasi yang tidak seimbang dalam *hemostasis* sehingga terjadi penyumbatan pembuluh darah (Prasad *et al.*, 2007).

Tubuh kita memiliki beberapa jalur mekanisme untuk melisiskan bekuan darah dalam pembuluh darah. Agen yang berperan dalam melisiskan yaitu agen trombolitik, fibrinolitik, antikoagulan, dan antiplatelet (Arbind, 2011). Dibandingkan dengan agen trombolitik, agen fibrinolitik memiliki biaya produksi efektif dan efek samping yang rendah (Arunachalam dan Aiswarya, 2011). Agen fibrinolitik dapat diperoleh dari tanaman, hewan, atau mikroba. Menurut Peng *et al.*, (2005) menyatakan, agen fibrinolitik yang berasal dari mikroba lebih menarik digunakan dibidang kesehatan dalam dekade ini (Peng *et al.*, 2005).

Penggunaan mikroba khususnya bakteri telah banyak diteliti sebagai penghasil agen fibrinolitik. Menurut Meyrath dan Volavsec (1975) menyatakan, penggunaan mikroba sebagai sumber agen fibrinolitik mempunyai beberapa

keunggulan dibandingkan dari tanaman dan hewan, diantaranya kemudahan sel mikroba untuk ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan, kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu yang dibutuhkan relatif tidak lama. Eksplorasi sumber-sumber baru penghasil agen fibrinolitik penting untuk dilakukan karena memiliki spesifitas tinggi terhadap fibrin dan memiliki waktu paruh yang panjang.

Sejauh ini, belum didapatkan informasi mengenai mikroba dari perairan khususnya bakteri yang menghasilkan agen fibrinolitik. Bakteri yang menghasilkan agen fibrinolitik diperoleh dari berbagai jenis makanan fermentasi. Sejumlah besar bakteri adalah bagian dari mikroba perairan yang memiliki potensi sebagai sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan dan dikembangkan. Antara lain sebagai penghasil agen fibrinolitik. Penelitian terdahulu diperoleh 60 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember (Huda, 2010). Eksplorasi potensi fibrinolitiknya belum diteliti. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap isolat bakteri yang fibrinolitik.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Agen fibrinolitik dari bakteri bila diproduksi memiliki biaya yang lebih efektif dan efek sampingnya rendah dibandingkan lainnya dalam mengatasi penyakit trombosis. Sejauh ini, bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember yang memiliki aktivitas fibrinolitik masih belum pernah dilaporkan, sehingga pada penelitian ini dilakukan skrining terhadap isolat bakteri sebagai penghasil substansi yang potensial sebagai agen fibrinolitik?

## **1.3 Batasan Masalah**

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian adalah sebanyak 23 isolat bakteri dengan kode WU koleksi di Laboratorium Mikrobiologi. Aktivitas fibrinolitik dilakukan secara semikuantitatif pada satu isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember yang memiliki aktivitas tertinggi. Isolat bakteri terpilih dibuat

kurva pertumbuhannya. Selanjutnya dilakukan karakterisasi protein ekstrak kasar dari *retentate* hasil dari pemisahan sampel substansi agen fibrinolitik dari cairan media kultur isolat bakteri yang menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa. Penentuan berat molekul protein tersebut menggunakan metode SDS-PAGE 12%.

#### **1.4 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan agen fibrinolitik yang dihasilkan oleh isolat bakteri asal dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember.

#### **1.5 Manfaat**

Dalam jangka panjang penelitian ini untuk mendukung penyediaan alternatif obat yang memiliki efek samping rendah untuk mengatasi permasalahan penyakit trombosis melalui penemuan agen fibrinolitik dari isolat lokal yang siap dikomersialisasikan setelah melalui proses formulasi dan uji farmakokinetikanya

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri sebagai Sumber Penghasil Agen Fibrinolitik

Mikroba khususnya bakteri merupakan salah satu sumber agen fibrinolitik. Selain agen fibrinolitik, saat ini agen trombolitik yang digunakan dalam mengatasi penyakit trombosis adalah streptokinase yang berasal dari bakteri *Streptococcus hemolyticus* dan stafilokinase dari *Staphylococcus aureus*. Dua agen trombolitik tersebut yang lebih dahulu diketahui efektif untuk terapi trombolitik (Collen dan Lijnen, 1994). Dalam perkembangannya, agen fibrinolitik memiliki efek samping lebih rendah dibandingkan agen trombolitik dan banyak digunakan di bidang kesehatan dalam dekade ini. Beberapa contoh bakteri dari genus *Bacillus* dan *Streptomyces* yang menghasilkan agen fibrinolitik seperti ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Bakteri penghasil agen fibrinolitik

Bakteri	Pustaka
<i>Bacillus</i>	
<i>Bacillus subtilis</i> BK-17	Jeong <i>et al.</i> , (2001)
<i>Bacillus subtilis</i> A1	Jeong <i>et al.</i> , (2004)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Kho <i>et al.</i> , (2005)
<i>Streptomyces</i>	
<i>Streptomyces megasporus</i> SD5	Chitte dan Dey, (2000)
<i>Streptomyces lividans</i>	Pimiento <i>et al.</i> , (2007)
<i>Streptomyces</i> sp. CS684	Simkhada <i>et al.</i> , (2010)

Dalam perkembangannya telah ditemukan berbagai bakteri yang mampu menghasilkan agen fibrinolitik dari berbagai jenis-jenis makanan fermentasi antara lain seperti nattokinase (NK) diperoleh dari *Bacillus subtilis* dari makanan natto (Sumi *et al.*, 1987), *Bacillus subtilis* DC33 dan *Bacillus subtilis* LD-8547 dari makanan Douchi (Wang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008) dan *Bacillus* sp. strain CK 11-4 dari makanan fermentasi tradisional Korea Chungkook-Jang (Kim *et al.*, 1996).

Selain itu, bakteri *S. megasporus* SD5 telah berhasil diisolasi dari air panas. Bakteri ini menghasilkan enzim fibrinolitik tahan panas (Chitte dan Dey, 2000).

## **2.2 Mekanisme Kerja Agen Fibrinolitik dalam Mendegradasi Fibrin**

Fibrin merupakan protein tidak larut yang berasal dari degradasi fibrinogen oleh trombin selama proses pembekuan darah. Terbentuknya fibrin dalam bekuan darah, pada sistem fibrinolisis terjadi proses degradasi yang dikatalisis oleh agen (enzim) fibrinolitik seperti enzim plasmin atau fibrinolisin dengan hasil berupa peptida-peptida berukuran lebih kecil dan larut (Sadikin, 2001).

Proses fibrinolisis secara otomatis diaktifkan bersamaan dengan pembekuan darah, yaitu ketika terjadi luka pada dinding endotelial. Proses fisiologis ini akan menghilangkan deposit polimer fibrin secara bertahap hingga menjadi produk degradasi yang larut air. Produk degradasi yang dihasilkan kemudian akan dibuang dari peredaran darah oleh makrofag-makrofag yang ada pada sistem retikuloendotelial. Fungsi penting proses ini adalah untuk membebaskan pembuluh dari bekuan darah dan memulai proses penyembuhan dinding pembuluh (Escobar, *et al.*, 2002).

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin atau fibrinogen. Dalam tubuh, enzim fibrinolitik atau plasmin diproduksi oleh sel endotel dalam saluran pankreas. Seiring dengan pertambahan usia dan juga pola konsumsi pangan yang tidak seimbang, maka produksi plasmin alami oleh tubuh akan semakin berkurang sehingga kerja sistem fibrinolitik dalam tubuh akan terganggu. Bila hal ini berlangsung terus secara berkala maka akan memicu timbulnya penyakit trombosis yang akhirnya mengarah pada berbagai penyakit degeneratif, seperti stroke, aterosklerosis, hipertensi, dan diabetes (Suhartono, 1992). Enzim fibrinolitik dapat diaplikasikan pada penderita trombosis karena enzim ini dapat menghancurkan fibrin dalam bekuan darah menjadi produk degradasinya yang lebih larut dalam darah (Sajuthi *et al.*, 2010).

Secara umum obat trombolitik dibagi menjadi dua golongan yaitu fibrinolitik (enzim mirip plasmin) dan aktivator plasminogen (Tjay dan Rahardja, 2002). Enzim mirip plasmin adalah enzim yang secara langsung mampu mendegradasi fibrin dalam bekuan darah tanpa melalui aktivasi plasminogen, sedangkan aktivator plasminogen adalah enzim yang mengaktivasi plasminogen bebas (Pg) untuk menghasilkan plasmin (Pm). t-PA dan SK merupakan aktivator plasminogen yang bekerja dengan cara mengaktifkan plasminogen menjadi protease aktif yang disebut plasmin. Plasmin yang dihasilkan selanjutnya akan mendegradasi bekuan darah (Kunamneni *et al.*, 2007).

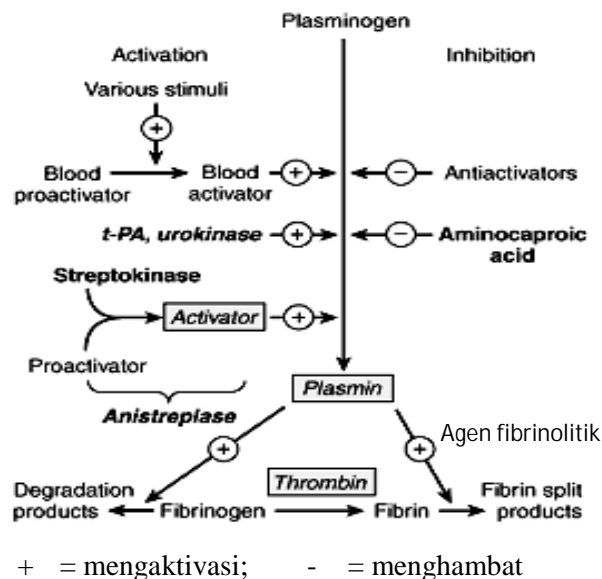
Beberapa contoh obat trombolitik yang digunakan pada pencegahan penyakit trombosis seperti infark miokard, serebrovaskular, dan emboli paru (Olson, 2004). Obat trombolitik efektif melisiskan trombin jika diberikan secara intravena (Katzung, 2006). Obat trombolitik dari beberapa sumber telah diidentifikasi seperti stafilokinase dan streptokinase. Kedua senyawa ini tidak memiliki aktivitas proteolitik dan bekerja secara tidak langsung melalui pembentukan kompleks dengan plasminogen. Kompleks plasminogen dengan stafilokinase atau dengan SK akan memotong ikatan peptida plasminogen bebas antara Arg560-Val561 pada plasminogen bebas sehingga menjadi protease aktif yang disebut plasmin (Collen dan Lijnen, 1994). Aktivitas stafilokinase sebagai aktivator plasminogen dipengaruhi oleh keberadaan fibrin dan bekuan darah yang banyak mengandung trombosit. Sedangkan aktivitas SK bisa melalui mekanisme fibrin sebagai kofaktor atau tanpa adanya fibrin (*fibrin dependent* dan *fibrin independent mechanism*) karena SK memiliki daerah "*catalytic switch*" pada ujung amino (Reed *et al.*, 1999).

Anistreplase (APSAC) merupakan kompleks plasminogen murni manusia dengan streptokinase yang telah diasilasi untuk melindungi sisi aktif enzim (Katzung 2002). Kelompok asil akan dihidrolisis pada saat digunakan sehingga kompleks streptokinase plasminogen aktif akan terbebaskan. Plasmin yang terbentuk akan menguraikan jaringan fibrin. Kelebihan dari anistreplase adalah selektivitasnya lebih tinggi dan aktivitas trombolitiknya lebih kuat dan lama. Secara endogenus



plasminogen dapat diaktifkan oleh t-PA, yaitu suatu protease serin yang berasal dari sel melanoma manusia. Enzim ini akan mengaktifkan plasminogen yang terikat pada fibrin sehingga fibrinolisis yang terjadi hanya terbatas pada trombus yang terbentuk saja (Mycek *et al.*, 2001). Contoh t-PA yang diperoleh dari teknik *deoxyribonucleic acid recombinant* (DNA rekombinan) dari t-PA manusia adalah alteplase dan reteplase. Alteplase merupakan tPA manusia yang belum dimodifikasi sedangkan reteplase adalah t-PA manusia yang telah dihilangkan beberapa sekuen asam aminonya (Katzung, 2002).

Mekanisme kerja agen fibrinolitik mirip plasmin yaitu menghidrolisis fibrin menjadi produk terlarut dalam sistem fibrinolisis yang ditunjukkan pada Gambar 2.1. Selain itu, titik kerja dari obat-obatan trombolitik secara umum dengan cara mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin, mendegradasi fibrinogen, dan mendegradasi fibrin. t-PA, UK, dan streptokinase mengaktifkan sistem fibrinolisis. Sedangkan *aminocaproic acid* secara klinis adalah inhibitor fibrinolisis.



Gambar 2.1 Mekanisme kerja agen fibrinolitik dalam sistem fibrinolisis (Sumber: Katzung, 2006)

Aktivitas fibrinolitik diukur untuk menentukan kemampuan enzim protease yang didapat untuk mendegradasi fibrin. Metode cawan (*fibrin plate assay*) adalah menggunakan campuran fibrinogen dan trombin yang dilarutkan dalam media agar. Metode ini sangat spesifik terhadap fibrinolisis, namun membutuhkan waktu ekstra untuk pengerjaannya (Pan *et al.*, 2009). Aktivitas fibrinolitik memiliki aktivitas serupa tripsin, yaitu dengan pemotongan rantai  $\alpha$ -fibrinogen. Sedangkan terhadap rantai  $\beta$ -fibrinogen laju pemotongannya lebih lambat (Hwang *et al.*, 2002).

### **2.3 Pemisahan dan Penentuan Berat Molekul Protein Ekstrak Kasar Agen Fibrinolitik**

Teknik pemisahan yang dilakukan pada penelitian ini adalah untuk pemurnian secara parsial protein agen fibrinolitik dari protein ekstrak kasar. Pemurnian protein adalah salah satu cara untuk memisahkan protein dari protein jenis lain dan kontaminannya. Secara umum, pemurnian enzim dibagi dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi, pemekatan, dan fraksinasi. Sedangkan teknik pemisahan adalah cara lain dari pemurnian enzim. Menurut Scopes (1987), salah satu tujuan pemurnian enzim adalah untuk mengidentifikasi fungsi dan struktur protein. Enzim yang murni dari senyawa kontaminan dapat digunakan untuk keperluan medis, farmasi, dan penelitian biokimia karena spesifitasnya yang tinggi (Lehninger, 1993).

#### **2.3.1 Pemisahan Agen Fibrinolitik**

Metode ekstraksi adalah tahap awal pemurnian yang digunakan tergantung pada sumber dan lokasi enzim. Enzim yang dihasilkan dipisahkan dari sel dengan sentrifugasi. Protein atau enzim ekstraseluler adalah tahap isolasi yang bertujuan memisahkan biomassa sel serta senyawa pengotor yang berasal dari media pertumbuhan. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi dengan kecepatan tertentu. Enzim yang diisolasi akan tertinggal dalam filtrat (supernatan) dan endapan yang terbentuk adalah kontaminan yang tidak diinginkan (Scopes, 1987). Proses pemisahan dengan sentrifugasi merupakan sistem pemisahan berdasarkan ukuran dan

berat molekul. Partikel dengan berat, ukuran, dan bentuk yang berbeda akan mengendap pada kecepatan yang berbeda. Dengan metode ini spora bakteri dan sel dapat dipisahkan pada proses klarifikasi dengan bagian enzimnya. Proses sentrifugasi terhadap enzim-enzim yang bersifat rapuh dilakukan pada suhu rendah, sehingga kehilangan aktivitas enzim dapat dijaga seminimal mungkin (Suhartono, 1989).

Tahap kedua adalah dilakukan pemekatan enzim untuk memisahkan konsentrat protein dari komponen biomolekul lainnya (karbohidrat, lipid, dan asam nukleat). Berbagai metode pemekatan yang biasa digunakan dalam pemurnian enzim adalah presipitasi dengan garam, pelarut organik, dialisis, membran ultrafiltrasi, dan liofilisasi (Scopes, 1989).

Metode pemisahan dengan membran ultrafiltrasi memiliki kelebihan yaitu pengaruhnya lebih kecil terhadap denaturasi protein dibandingkan presipitasi dengan polietilen glikol ataupun *salting out*. Penggunaan membran ultrafiltrasi akan sangat menghemat, walaupun tidak semua protein dapat dipisahkan dengan membran ultrafiltrasi yang memiliki ukuran membran tertentu. Menurut Bollag dan Edelstein (1991), prinsip pemisahan dengan proses ultrafiltrasi adalah memisahkan komponen berdasarkan berat molekul. Meskipun retensi molekul merupakan fungsi dan ukuran molekul, namun terbukti berat molekul dapat digunakan sebagai peubah yang lebih praktis, khususnya pada molekul dengan berat molekul tinggi. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan teknik pemisahan agen fibrinolitik dari bakteri menggunakan membran ultrafiltrasi.

Pemisahan protein ekstrak kasar agen fibrinolitik dengan membran ultrafiltrasi pada kondisi optimum diharapkan hanya untuk protein yang berukuran lebih besar dari 10 kDa. Hal ini dikarenakan agen fibrinolitik yang telah banyak diteliti memiliki ukuran molekul di atas 10 kDa. Hasil pemisahan diperoleh 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.

Protein atau enzim fibrinolitik yang berat molekulnya lebih besar dari 10 kDa dapat dipisahkan dengan membran ultrafiltrasi.

Membran ultrafiltrasi dibagi dalam berbagai macam jenis *cut off* tertentu dengan tipe membran *polietersulfone membrane* (PES) Corning Spin-X UF 500 dengan MWCO 5, 10, 30, 50, dan 100 kDa. Pemisahan protein dengan berat molekul yang diinginkan dilakukan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 15.000xg pada suhu 4° C (Corning Incorporated, 2009). Pemisahan protein dengan berat molekul tertentu akan diperoleh dua fase yaitu fase atas (*retentate*) dan fase bawah (*permeate*). *Retentate* adalah fase cair yang mengandung molekul protein akan tertahan atau tidak dapat melewati membran. Sedangkan *permeate* adalah fase cair yang mengandung molekul protein dengan berat molekul lebih kecil tidak tersaring atau dapat melewati membran *filter*. *Retentate* yang merupakan protein ekstrak kasar yang didapat dengan ultrafiltrasi berkecepatan tinggi, diresuspensi menggunakan *buffer* untuk menghindari denaturasi atau kerusakan protein. Menurut Campbell dan Farrell (2006), protein ekstrak kasar (enzim) yang diperoleh dari pemisahan membran ultrafiltrasi diresuspensi menggunakan *buffer*. Resuspensi harus dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah kerusakan enzim.

### 2.3.2 Penentuan Berat Molekul Protein Ekstrak Kasar Menggunakan SDS-PAGE

Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) adalah metode yang paling banyak digunakan karena memiliki kapasitas pemisahan yang tinggi. Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan adalah SDS-PAGE (Harris dan Angal, 1989). Prinsip analisis SDS-PAGE adalah pemisahan protein berdasarkan berat molekul. Mekanisme pemisahan pada SDS-PAGE berdasarkan *electrophoretic mobility* yaitu pemisahan komponen atau berat molekul bermuatan berdasarkan tingkat migrasi dan berat molekulnya dalam sebuah medan listrik.

Menurut Nur dan Adjuwana (1988), radikal-radikal bebas yang terbentuk dari TEMED sebagai katalisator dan APS akan bereaksi dengan akrilamida di mana terjadi penyimpanan radikal bebas di dalam molekul akrilamida sehingga terbentuk

akrilamida aktif. Akrilamida aktif ini akan bereaksi dengan cara yang sama dengan akrilamida yang lain sehingga dihasilkan suatu rantai polimer yang panjang. Gel poliakrilamida terbentuk oleh adanya polimerisasi dari monomer akrilamida dan pembentukan ikatan silang kovalen antar rantai panjang akrilamida. *Cross linking agent* yang digunakan adalah N,N'-metilen-bis-akrilamida. Kompleks APS-TEMED mengkatalisis pembentukan radikal bebas dari persulfat yang selanjutnya berfungsi sebagai inisiator polimerisasi.

Lembaran elektroforesis gel poliakrilamida terdiri atas dua bagian, yaitu gel penahan (*stacking gel*) dan gel pemisah (*separating gel*). Gel penahan terletak pada bagian atas dari gel pemisah. Gel penahan berfungsi sebagai tempat dicetaknya sumur untuk memasukkan sampel. Selain itu, gel penahan berfungsi untuk mengkonsentrasikan sampel membentuk pita yang tajam sebelum memasuki gel pemisah. Gel pemisah berfungsi sebagai tempat terjadinya pemisahan protein (Nur dan Adijuwana, 1988).

SDS-PAGE yang merupakan penambahan SDS pada gel poliakrilamida digunakan untuk sampel protein yang terdenaturasi. SDS adalah detergen anionik yang bersama dengan  $\beta$ -merkaptoetanol dan pemanasan akan merusak struktur tiga dimensi protein dengan cara memecah ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus sulfhidril. Protein yang mengalami denaturasi sempurna akan diikat oleh SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut. Setiap 1,4 gram SDS dapat mengikat 1 gram protein (Harris dan Angal, 1989). Pergerakan kompleks SDS-protein yang berukuran besar akan memiliki mobilitas yang lebih kecil. Protein berukuran kecil memiliki mobilitas lebih cepat dibandingkan protein berukuran lebih besar (Copeland, 1994). Adanya gliserol dalam *buffer* sampel berfungsi untuk meningkatkan berat jenis larutan sampel sehingga dapat masuk dengan mudah ketika diinjeksi ke dalam sumur gel. *Buffer* sampel berfungsi untuk membantu memonitor jalannya elektroforesis karena didalamnya mengandung pewarna *bromphenol blue*. Jika pewarna telah mencapai bagian bawah gel, maka elektroforesis dihentikan (Wilson dan Walker, 2000).

Pita-pita protein hasil pemisahan dengan elektroforesis diperjelas dengan teknik pewarnaan. Syarat dari pewarna yang digunakan untuk *staining* adalah dapat berikatan kuat dengan protein, tetapi tidak bereaksi dengan gel. Ikatan antara pewarna dan gel adalah ikatan non kovalen sehingga mudah dilepaskan dengan pencucian secara intensif (Scopes, 1987). Proses penghilangan warna (*destaining*) dilakukan dengan merendam gel dalam larutan peluntur sampai diperoleh latar belakang yang relatif jernih sehingga pita-pita protein yang dihasilkan dapat diamati dengan jelas (Nur dan Adijuwana, 1988).

Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan mobilitas relatif (Rf) protein dengan protein standar yang berat molekulnya sudah diketahui. Rf protein merupakan perbandingan jarak antara titik awal ke pita protein dengan titik awal ke titik akhir elektroforesis (Wilson dan Walker, 2000).

Jumlah pita-pita protein hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan jumlah subunit protein yang terdapat dalam protein tersebut. Pita protein yang berada pada posisi paling atas merupakan subunit terbesar, dan protein yang berada di posisi lebih bawah menunjukkan ukuran subunit yang lebih kecil. Besar atau kecil ukuran suatu subunit protein ditentukan oleh jumlah atau jenis asam-asam amino penyusunnya. Secara umum, subunit yang berukuran lebih besar memiliki jumlah asam amino penyusun yang lebih banyak (Garfin *et al.*, 2003).

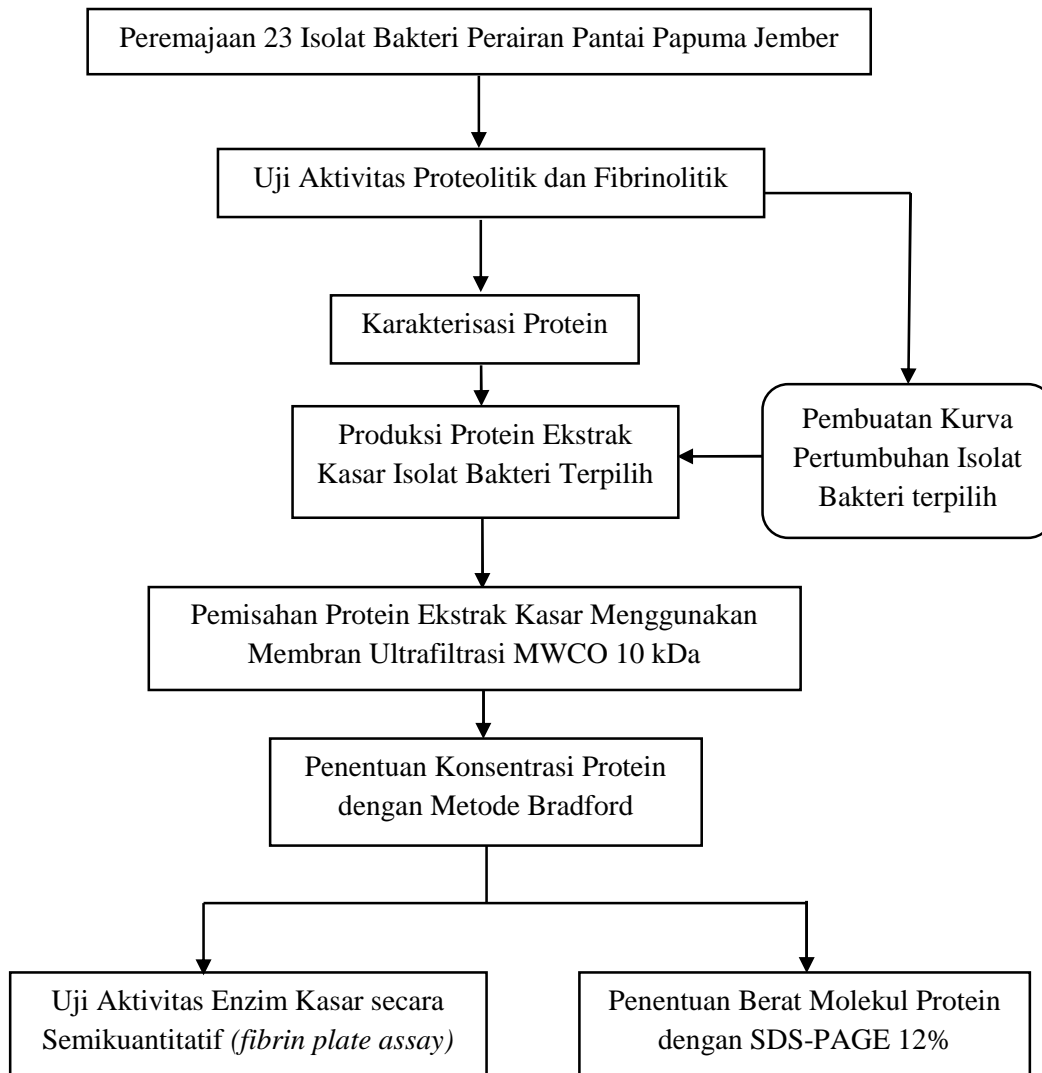
## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **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. Waktu penelitian dimulai pada bulan Mei sampai Desember 2012.

### **3.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Rancangan penelitian meliputi tiga tahap yaitu tahap pertama uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik terhadap 23 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember berdasarkan metode *plate agar*. Aktivitas dari uji proteolitik dan fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni bakteri. Tahap kedua adalah satu isolat bakteri hasil uji aktivitas fibrinolitik tertinggi dipilih dan dibuat kurva pertumbuhannya. Tahap ketiga adalah karakterisasi protein ekstrak kasar meliputi produksi protein ekstrak kasar dalam kultur cair dan dilakukan pemisahan sampel substansi agen fibrinolitik dari cairan media kultur isolat bakteri menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa. Selanjutnya, hasil pemisahan diperoleh *retentate* dan ditentukan konsentrasi proteinnya menggunakan metode Bradford. Selain itu, *retentate* diukur aktivitasnya secara semikuantitatif pada media fibrin (*fibrin plate assay*) dan berat molekul protein tersebut ditentukan menggunakan metode SDS-PAGE 12%. Diagram alir tahapan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir skrining agen fibrinolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember

### 3.3 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan untuk uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik adalah jarum ose, spatula, penggaris *Stainless Hardened V-TEC* (30 cm), lampu Bunsen, kertas saring, *laminar air flow* (LAF), *freezer -80° C*, *hotplate stirrer*, *autoklave*, inkubator 30° C, inkubator *shaker*, oven (suhu 45° C dan 50° C). Peralatan gelas yang digunakan adalah *petridish*, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, gelas ukur, botol Schott,



*beaker glass*, *Haemocytometer* (Petroff-Hauser). Alat yang digunakan untuk pembuatan kurva pertumbuhan adalah mikropipet, mikrotip, tabung mikrosentrifuga, vorteks, mikroskop Olympus CX21. Alat ukur yang digunakan adalah spektrofotometer, timbangan digital, dan pH meter. Selain itu, alat yang digunakan untuk penentuan berat molekul protein adalah seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE. Peralatan yang digunakan untuk pemisahan protein adalah tabung mikrosentrifuga membran ultrafiltrasi Spin-X 500 UF MWCO 10 kDa, dan sentrifuga.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah koleksi 23 isolat bakteri dengan kode WU dari Perairan Pantai Papuma Jember yaitu WU 021015\*, WU 021004, WU 021012\*, WU 021055\*, WU 021001\*, WU 021005, 021018, WU 991, WU 994, WU 6916, WU 6970, WU 997, WU 021002\*, WU 021003, WU 021042, WU 021008\*, WU 021052, WU 9918, WU 6975, WU 6934, WU 6917, WU 021033\*, WU 6956. Media yang digunakan untuk penelitian ini adalah media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB) cair, media Luria bertani (LB) cair, media *Skim Milk Agar* (SMA), dan media fibrin. Komposisi bahan dalam pembuatan media dapat dilihat pada Lampiran A. Bahan yang digunakan untuk kurva pertumbuhan adalah *formaldehyde* 10% (v/v). Selain itu, larutan dan bahan kimia pendukung yang digunakan adalah gliserol steril, spirtus, alkohol 70%, akuades, 0,5 M  $\text{CaCl}_2$  (b/v), 50 mM PBS pH 7,4 (b/v). Pengukuran konsentrasi protein bahan yang digunakan adalah 50 mM *buffer* fosfat pH 6,5, BSA, dan pewarna Bradford. Selain itu, bahan-bahan untuk analisis SDS-PAGE adalah sodium dodesil sulfat (SDS) 10% (b/v), akrilamid, N,N'-bis-akrilamid, gel *separating* SDS-PAGE, gel *stacking* SDS-PAGE, *buffer* elektroforesis SDS-PAGE pH 8,3, *buffer* sampel SDS-PAGE, standar *marker* protein HMW, amonium persulfat 10% (b/v), TEMED, larutan pewarna atau *staining* dan larutan peluntur atau *destaining*. Komposisi bahan untuk *buffer* dan gel elektroforesis SDS-PAGE tertera pada Lampiran D.

### 3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan 23 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember dengan kode WU untuk diuji kemampuan aktivitas fibrinolitiknya. Selain itu, satu isolat bakteri terpilih sebagai penghasil agen fibrinolitik dilakukan karakterisasi protein ekstrak kasar secara semikuantitatif dengan metode *fibrin plate assay* serta ditentukan berat molekul proteinnya.

#### 3.4.1 Peremajaan Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember

Isolat bakteri dari stok gliserol (-80° C) ditumbuhkan dengan cara mengambil 1 ose, kemudian menggoreskannya secara aseptis pada media NA padat. Setelah itu biakan bakteri diinkubasi pada inkubator dengan suhu ruang selama 48 jam. Kemudian biakan bakteri yang tumbuh digoreskan dengan cara *streak plate* 4 kuadran pada media NA padat untuk mendapatkan koloni tunggal (*single colony*). Jika hasil peremajaan didapat 1 morfologi koloni maka isolat disimpan pada *refrigerator* (4° C). Koloni tunggal hasil peremajaan ditumbuhkan pada media NB cair dan dikonservasi dengan metode *cryo conserved*.

Penyimpanan isolat bakteri dilakukan dengan metode *cryo conserved*. Koloni tunggal (*single colony*) isolat bakteri ditumbuhkan pada media NB cair steril sebagai kultur. Kemudian kultur diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 130 rpm selama  $\pm 12$  jam (*overnight*). Kultur cair yang telah tumbuh diambil sebanyak 800  $\mu$ l dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml yang telah diisi 200  $\mu$ l gliserol steril. Kemudian kultur isolat bakteri dikonservasi dan disimpan *freezer* pada suhu -80° C. Penyimpanan isolat bakteri dilakukan dengan 3 kali pengulangan (*triplo*). Pada waktu yang sama, kultur cair isolat bakteri digoreskan pada media NA padat untuk membuat *working plate* dengan cara *streak plate* 4 kuadran. Sehingga akan diperoleh koloni tunggal untuk uji aktivitas proteolitik dan fibrinolitik.

### 3.4.2 Uji Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri

Sebanyak 23 isolat bakteri dari *working plate* diambil satu ose menggunakan tusuk gigi lalu dititik pada media SMA. Bakteri ditumbuhkan dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30° C selama 48 jam. Bakteri yang menghasilkan enzim protease ekstraselular adalah bakteri yang memiliki zona bening di sekitar koloni bakteri. Diameter zona bening dan koloni diukur menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm). Pengukuran diameter zona bening dan koloni dilakukan sebanyak 3 kali pengukuran diameter yang berbeda dan hasilnya pengukuran dijumlahkan dan dirata-rata. Aktivitas proteolitik isolat bakteri ditentukan dengan menghitung Indeks Aktivitas Enzim (IAE) dengan cara mengukur diameter zona bening dan diameter koloni. Aktivitas proteolitik ditentukan dengan menghitung IAE

berdasarkan rumus: 
$$\frac{\text{diameter zona bening (cm)}}{\text{diameter koloni (cm)}}$$

### 3.4.3 Uji Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri

Semua isolat bakteri yang memberikan hasil positif pada uji aktivitas proteolitik selanjutnya ditumbuhkan pada media fibrin untuk uji aktivitas fibrinolitik. Kemudian isolat bakteri diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30° C selama 48 jam. Bakteri penghasil agen fibrinolitik adalah bakteri yang tumbuh dan memberikan zona bening di sekitar koloni. Aktivitas fibrinolitik isolat bakteri ditentukan dengan mengukur indeks aktivitas enzim fibrinolitik seperti pada uji aktivitas proteolitik. Selanjutnya, satu isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi dipilih dan dikarakterisasi selanjutnya.

### 3.4.4 Pembuatan Kurva Pertumbuhan dari Isolat Bakteri Terpilih

Satu isolat bakteri terpilih dibuat kurva pertumbuhannya untuk melihat pola pertumbuhan bakteri sehingga didapat fase adaptasi (*lag phase*), fase eksponensial (*log phase*), fase stasioner dan fase kematian (*death phase*). Satu koloni tunggal isolat

bakteri ditumbuhkan pada 10 ml media LB cair (sebagai *starter*) pada suhu ruang selama  $\pm 12$  jam (*overnight*). Kemudian sebanyak 500  $\mu\text{l}$  inokulum atau *starter* (5% (v/v)) ditumbuhkan pada 50 ml media LB cair. Selanjutnya setiap 2 jam sekali isolat bakteri difiksasi dengan mengambil 900  $\mu\text{l}$  kultur dan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge 1,5 ml yang sudah berisi 100  $\mu\text{l}$  *formaldehyde*. Kemudian jumlah bakteri dihitung di mikroskop Olympus CX21 dengan metode perhitungan langsung menggunakan *haemocytometer* sampai jam ke-26. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri ditentukan berdasarkan (Schlegel, 1995) dengan rumus sebagai berikut:

$$\mu = \frac{\lg N_t - N_o}{\lg e (t - t_o)} = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{t - t_o}$$

$$N_t = N_o \cdot e^{\mu \cdot t}$$

T = waktu ke t

$\mu$  = kecepatan pertumbuhan

$t_o$  = waktu ke 0

$N_o$  = Jumlah sel pada waktu  $t_o$

$N_t$  = Jumlah sel pada waktu ke t

Analisis untuk mendapatkan kurva sigmoid dilakukan dengan menggunakan aplikasi SOLVER pada program *microsoft office excel 2007* (Arifin dan Utami, 2012).

Isolat bakteri terpilih ditentukan kurva pertumbuhannya untuk memperoleh fase-fase pertumbuhan dari isolat bakteri tersebut. Sehingga dapat menentukan waktu optimum produksi protein kasar yaitu awal fase eksponensial.

### 3.4.5 Karakterisasi Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri Terpilih

#### a. Produksi dan Pemisahan Protein Ekstrak Kasar Menggunakan Membran Ultrafiltrasi

Sebanyak satu koloni tunggal isolat bakteri diinokulasikan pada 10 ml media LB cair (sebagai *starter*) dan ditumbuhkan selama 10 jam (awal fase eksponensial) pada inkubator *shaker* pada suhu ruang. Pembuatan kultur *starter* sebelum produksi enzim bertujuan untuk memperbanyak sel yang seragam dengan umur fase pertumbuhan yang sama. Kemudian 0,5 ml inokulum atau *starter* (5% (v/v))

ditumbuhkan pada 10 ml media LB cair untuk produksi protein kasar lalu diinkubasi pada inkubator *shaker* pada suhu ruang selama 10 jam. Protein kasar diproduksi seiring dengan pertumbuhan sel selama 10 jam (awal fase eksponensial) lalu suspensi dari kultur bakteri tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 9.503xg pada suhu 4° C selama 15 menit. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan supernatan yang mengandung protein kasar ekstraseluler dengan sel bakteri. Pelet hasil sentrifugasi adalah sel bakteri yang terendapkan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah (4° C) untuk meminimalkan kerusakan struktur enzim.

Supernatan bebas sel diambil dan dilakukan pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa. Teknik adalah memisahkan protein berdasarkan berat molekul. Proses pemisahan protein dengan berat molekul diatas 10 kDa dilakukan dengan sentrifugasi. Proses sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 9.503xg pada suhu 4° 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 pemisahan molekul protein dari supernatan bebas sel diperoleh 2 fase yaitu fase atas (*retentate*) dan fase bawah (*permeate*). *Retentate* adalah fase cair yang mengandung molekul protein dengan berat molekul lebih besar dari 10 kDa sehingga akan tertahan atau tidak dapat melewati membran. Sedangkan *permeate* adalah fase cair yang mengandung molekul protein dengan berat molekul lebih kecil dari 10 kDa sehingga tidak tersaring atau dapat melewati membran. Protein ekstrak kasar dari fase *retentate* yang telah dipisahkan kemudian dilarutkan dalam 50 mM *buffer* fosfat pH 6,5 untuk karakterisasi protein selanjutnya.

#### b. Penentuan Konsentrasi Protein Ekstrak Kasar

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan membandingkan hasil pengukuran kurva standar protein BSA dan sampel protein yang diinginkan (Bollag *et al.*, 1996). Total volume reaksi untuk pengukuran serapan sampel maupun protein standar adalah 1000 µl. Komposisi larutan tersebut terdiri

dari 100  $\mu\text{l}$  sampel dan ditambahkan 900  $\mu\text{l}$  pewarna Bradford. Sebanyak 5  $\mu\text{l}$  larutan sampel protein diencerkan dengan 95  $\mu\text{l}$  *buffer* fosfat 50 mM pH 6,5 (pengenceran 20 kali) lalu ditambahkan pewarna Bradford 900  $\mu\text{l}$ . Perubahan warna larutan sampel menjadi biru karena kompleks protein berikatan dengan pewarna Bradford atau *Comassie Brilliant Blue* G-250 didalamnya dibawah kondisi asam. Lalu larutan sampel diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang untuk mengoptimumkan perubahan warna larutan sampel protein. Perubahan warna yang terjadi, menghasilkan spektrum warna yang berbeda dari berwarna coklat (panjang gelombang atau  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ ) sampai biru ( $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm}$ ). Kemudian larutan tersebut diukur absorbannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm. Panjang gelombang 595 nm merupakan standar yang digunakan pada pengukuran konsentrasi total protein. Blanko yang digunakan adalah *buffer* fosfat 50 mM pH 6,5. Absorbans larutan sampel diplotkan pada persamaan matematik kurva standar BSA sehingga didapatkan konsentrasi protein sampel dalam mg/ml.

Pembuatan kurva standar protein diawali dengan pembuatan larutan standar BSA. Larutan standar dibuat dengan menimbang 10 mg BSA yang dilarutkan dengan 10 ml akuades sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml. Larutan stok tersebut dibuat dengan konsentrasi 0, 0,15, 0,20 0,30, dan 0,35 mg/ml. Kemudian dilakukan pengukuran terhadap standar protein dengan menambahkan 100  $\mu\text{l}$  seri larutan standar dengan 900  $\mu\text{l}$  pewarna Bradford dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Larutan ini memberikan warna biru dan dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pengukuran absorbans protein pada panjang gelombang tersebut dijadikan sebagai sumbu Y dan konsentrasi protein BSA dijadikan sumbu X dalam kurva standar tertera pada Lampiran C. Dengan menggunakan regresi linear, akan didapatkan persamaan matematik untuk larutan standar protein yang diperoleh dari nilai absorbansi standar yang digunakan untuk pengukuran konsentrasi protein sampel.

c. Uji Aktivitas Enzim Kasar secara Semikuantitatif

Enzim kasar yang diperoleh selanjutnya dianalisis aktivitas fibrinolitiknya menggunakan metode *fibrin plate assay* (Astrup dan Mullertz, 1952). Sebanyak 5  $\mu$ l *retentate* ditetaskan pada membran cakram (dengan diameter 0,55 cm) yang telah diletakkan di atas media fibrin. Selain itu, *permeate*, dan supernatan bebas sel diuji aktivitas fibrinolitiknya sebagai uji evaluasi. Lalu media fibrin diinkubasi pada suhu 30° C selama 24 jam. Uji positif adanya aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar membran cakram. Kemudian zona bening diukur berdasarkan diameternya.

d. Penentuan Berat Molekul (BM) Protein Kasar Menggunakan SDS-PAGE 12%

Sampel enzim dipisahkan berdasarkan berat molekulnya menggunakan elektroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Elektroforesis gel poliakrilamida yang dikombinasikan dengan suatu deterjen sodium dodesil sulfat (SDS) digunakan untuk memisahkan dan meneliti jumlah dan ukuran (berat molekul) rantai protein dan rantai subunit protein. Gel SDS-PAGE menggunakan konsentrasi *separating* gel 12% (b/v) dan *stacking* gel 4% (b/v). Komposisi bahan tertera pada Lampiran D.

Seluruh bahan untuk pembuatan gel pemisah dicampurkan dalam beaker glass, kemudian dituang pada cetakan gel pemisah sebanyak  $\frac{3}{4}$  volume cetakan. Pada cetakan tersebut ditambahkan akuades hingga terisi penuh. Hal ini bertujuan untuk meratakan sisi atas gel pemisah. Setelah gel pemisah memadat, akuades dibuang dari cetakan. Setelah terbentuk gel pemisah, bahan-bahan untuk pembuatan gel penahan yang telah dicampurkan dimasukkan kedalam cetakan pelat elektroforesis. Pembuatan sumuran gel, sebelum gel penahan memadat, dipasang sisir sumuran gel. Jika gel *stacking* telah memadat, sisir sumuran dilepas dari gel dan siap untuk *running* SDS-PAGE.

*Running* elektroforesis SDS-PAGE dilakukan dengan menambahkan 16  $\mu$ l sampel protein *retentate* ke dalam 4  $\mu$ l *buffer* sampel dengan perbandingan 4:1 (v/v), lalu dipanaskan pada suhu 100° C selama 3 menit untuk denaturasi protein. Kemudian

dinginkan pada suhu ruang. Sampel *retentate* dimasukkan ke dalam sumur gel dengan volume 20  $\mu$ l, sedangkan volume *marker* protein HMW yang digunakan sebanyak 8  $\mu$ l. *Running* dilakukan pada tegangan 30 V dan 70 V selama  $\pm$  3 jam dalam *buffer* elektroforesis. Setelah *running* elektroforesis, gel diwarnai dengan menggunakan larutan pewarna (*Coomassie Brilliant Blue R-250*) selama 2 jam. Pelunturan warna (*destaining*) pada gel dilakukan dengan larutan peluntur secara berulang kali sampai diperoleh pita protein berwarna biru dengan latar gel bening. Gel yang telah didestaining diambil dan dilakukan dokumentasi. Ukuran berat molekul protein diperoleh dengan cara ekstrapolasi terhadap kurva standar antara log BM dan jarak migrasi *marker* protein tertera pada Lampiran D.

### 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel, dan foto. Analisis data ditentukan sebagai berikut:

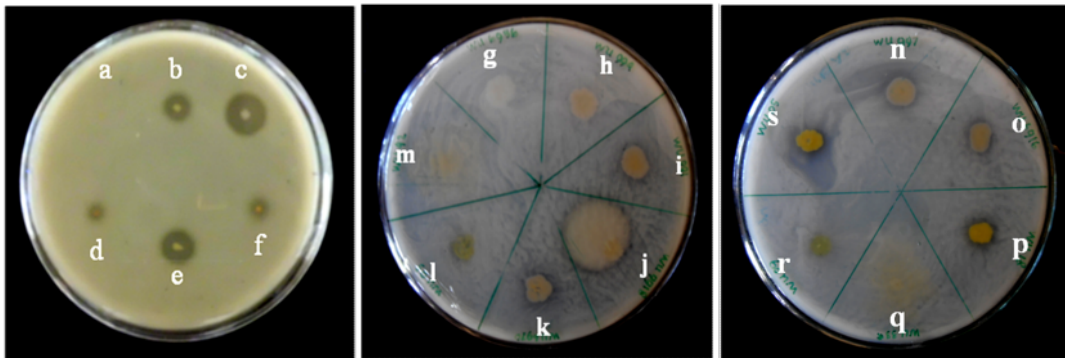
- a. Analisis positif terhadap hasil dari skrining proteolitik dan skrining fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada media selektif agar. Hasil pengukuran indeks aktivitas enzim diperoleh dengan membandingkan diameter zona bening (cm) dengan diameter koloni bakteri (cm) serta disajikan dalam bentuk tabel.
- b. Karakterisasi protein ekstrak kasar dari *retentate* hasil dari pemisahan menggunakan membran ultrafiltrasi MWCO 10 kDa dilakukan melalui uji aktivitas fibrinolitik secara semikuantitatif dengan *fibrin plate assay* dan penentuan berat molekul protein tersebut menggunakan metode SDS-PAGE 12%. Data yang dihasilkan berupa foto dalam bentuk gambar dari hasil pemotretan menggunakan kamera digital.



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kemampuan Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri

Hasil skrining yang dilakukan terhadap kemampuan proteolitik 23 isolat bakteri Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember pada media *Skim Milk Agar* (SMA) menunjukkan bahwa 11 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik, sedangkan 12 isolat bakteri lainnya tidak bersifat proteolitik. Aktivitas proteolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni (Gambar 4.1). Menurut Kaiser (2005), zona bening yang terbentuk disekitar koloni bakteri disebabkan oleh substrat kasein yang tampak putih dalam suspensi koloid media SMA telah dihidrolisis menjadi peptida dan asam amino. Hidrolisat ini merupakan sumber protein yang digunakan untuk metabolisme pertumbuhan dan perkembangan sel.



Gambar 4.1 Zona bening yang menunjukkan aktivitas proteolitik dari isolat bakteri, (a) WU 021005; b) WU 021055\*; (c) WU 021012\* (d) WU 021015\*; (e) WU 021004; (f) WU 021001\*; (g) WU 6956; (h) WU 994; (i) WU 991; (j) WU 9918; (k) WU 6970; (l) WU 6917; (m) WU 021042; (n) WU 997; (o) WU 021018; (p) WU 6916; (r) WU 994; dan (s) WU 021052 pada Media SMA

Isolat bakteri yang bersifat proteolitik menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim protease ekstraseluler. Volk dan Wheeler (1993) menyatakan, bakteri proteolitik adalah bakteri yang mampu menghasilkan enzim

protease ekstraseluler. Enzim protease ekstraseluler merupakan salah satu enzim pendegradasi protein yang diproduksi dalam sel dan dilepaskan ke luar dari sel. Isolat bakteri yang tidak bersifat proteolitik memiliki enzim protease di dalam selnya tetapi tidak dikeluarkan.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh 11 isolat bakteri yang memiliki indeks aktivitas enzim proteolitik yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri WU 021001\*, WU 021055\*, WU 021004, dan WU 021012\* memiliki indeks proteolitik lebih tinggi yaitu berkisar antara 3,0-4,3 dibandingkan isolat bakteri lainnya yaitu WU 997, WU 021018, WU 6970, WU 991, WU 6916, WU 021052, dan WU 021015\* berkisar antara 1,2-2,8. Indeks aktivitas enzim proteolitik yang diperoleh ini tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Mahdiyah *et al.*, (2012) yang menunjukkan bahwa isolat bakteri yang diisolasi dari jenis Spons *Jaspis* sp. di perairan laut sebelah barat dari kepulauan Waigeo, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat diperoleh indeks proteolitik 3.

Tabel 4.1 Aktivitas proteolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember pada Media SMA selama 48 jam

Isolat Bakteri	Indeks Aktivitas Enzim Proteolitik	Keterangan
WU 021012*	4,3	+
WU 021004	4,2	+
WU 021055*	3,4	+
WU 021001*	3,0	+
WU 021052	2,8	+
WU 021015*	2,0	+
WU 6916	1,9	+
WU 991	1,4	+
WU 6970	1,3	+
WU 021018	1,3	+
WU 997	1,2	+
WU 021002*	1,0	-
WU 021003	1,0	-
WU 021042	1,0	-
WU 021008*	1,0	-
WU 021033*	1,0	-
WU 9918	1,0	-

lanjutan Tabel 4.1

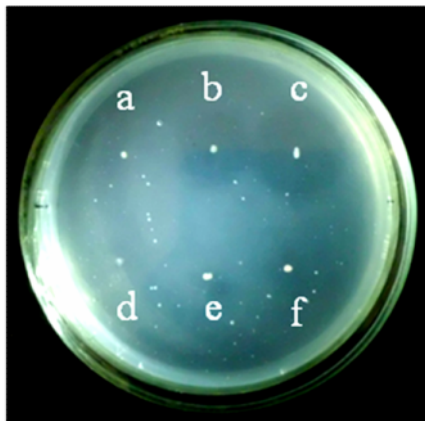
WU 6975	1,0	-
WU 6934	1,0	-
WU 6917	1,0	-
WU 6956	1,0	-
WU 994	1,0	-
WU 021005	1,0	-

+ = ada aktivitas proteolitik

- = tidak ada aktivitas proteolitik

#### 4.2 Kemampuan Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri WU

Kemampuan aktivitas fibrinolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember yang bersifat proteolitik dapat diuji aktivitas fibrinolitiknya pada media fibrin agar. Berdasarkan hasil uji aktivitas fibrinolitik 11 isolat bakteri yang bersifat proteolitik diperoleh 3 isolat bakteri memiliki aktivitas fibrinolitik, sedangkan 8 isolat bakteri lainnya tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Aktivitas fibrinolitik ditentukan oleh kemampuan enzim yang dapat menghidrolisis substrat fibrin, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri (Gambar 4.2). Semakin besar aktivitas fibrinolitik menunjukkan semakin besar zona bening yang terbentuk. Milner dan Makise (2002) menyatakan, terbentuknya zona bening yang semakin lebar dan jelas menunjukkan semakin banyak fibrin yang terhidrolisis oleh enzim fibrinolitik.



Gambar 4.2 Zona bening yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik dari isolat bakteri, (a) WU 021005; (b) WU 021012\*; (c) WU 021055\*; (d) WU 021015\*; (e) WU 021004; dan (f) WU 021001\* pada Media Fibrin

Tabel 4.2 menunjukkan bahwa 3 isolat bakteri dengan kode isolat WU 021055\*, WU 021012\*, dan WU 021001\* mempunyai fibrinolitik yang tinggi masing-masing memiliki indeks fibrinolitik sebesar 11, 10, dan 2,7. Indeks fibrinolitik dari isolat bakteri tersebut memiliki aktivitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat bakteri KJ-31 dari makanan tradisional Korea *Jeot-gal* dengan indeks fibrinolitik sebesar 2,15 (Hwang *et al.*, 2007).

Tabel 4.2 Aktivitas fibrinolitik isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Jember pada Media Fibrin Agar selama 48 jam

Isolat Bakteri	Indeks Aktivitas Enzim Fibrinolitik	Keterangan
WU 021055*	11,0	+
WU 021012*	10,0	+
WU 021001*	2,7	+
WU 021015*	1,0	-
WU 021004	1,0	-
WU 021018	1,0	-
WU 991	1,0	-
WU 6916	1,0	-
WU 6970	1,0	-
WU 997	1,0	-
WU 021052	1,0	-

+ = ada aktivitas fibrinolitik

- = tidak ada aktivitas fibrinolitik

Aktivitas proteolitik dari isolat bakteri juga memiliki aktivitas yang berbeda terhadap fibrin. Perbandingan indeks aktivitas proteolitik (Tabel 4.1) dan fibrinolitik (Tabel 4.2) menunjukkan bahwa isolat bakteri WU 021055\*, WU 021012\*, dan 021001\* memiliki indeks proteolitik yang tinggi dan memiliki indeks fibrinolitik tinggi. Indeks fibrinolitik dari ketiga isolat tersebut lebih tinggi dibandingkan indeks proteolitiknya pada media SMA. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh ketiga isolat bakteri tersebut memiliki sifat *inducible* yang spesifik terhadap substrat fibrin. Lehninger (1993) menyatakan, dalam keadaan normal jumlah enzim yang dihasilkan sedikit, tetapi akan meningkat dengan cepat bila substratnya terdapat dalam media, terutama jika substrat tersebut merupakan

sumber karbon satu-satunya bagi sel. Berbeda dengan isolat bakteri diatas, isolat bakteri WU 021004 memiliki indeks proteolitik tinggi, tapi tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Hal ini diduga karena isolat bakteri tersebut mampu memanfaatkan protein selain fibrin.

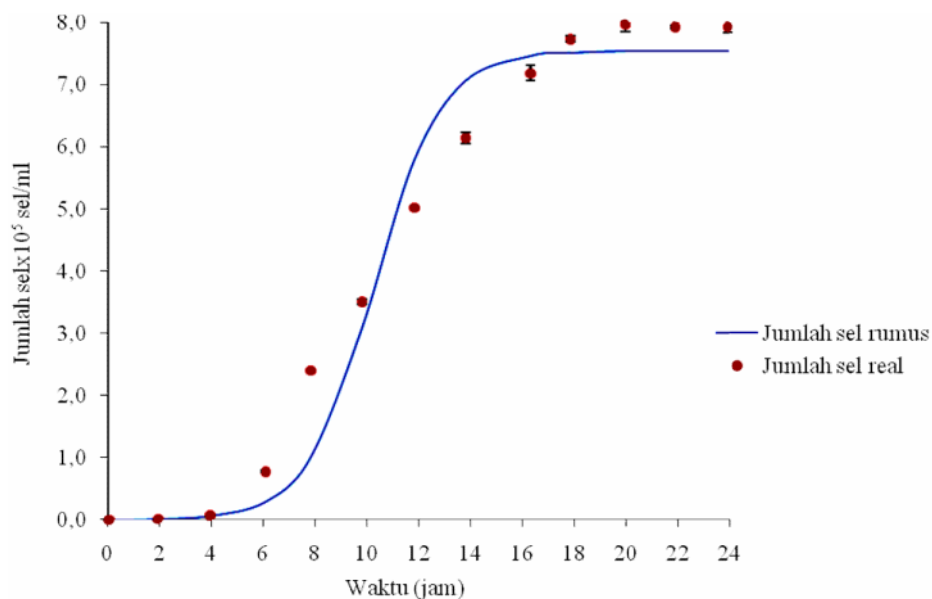
#### **4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri WU 021055\***

Isolat bakteri WU 021055\* yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi ditentukan kurva pertumbuhannya untuk mengetahui fase eksponensial (*log phase*). Kurva pertumbuhan isolat bakteri tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran B. Isolat bakteri WU 021055\* memiliki fase adaptasi dari jam ke-0 sampai jam ke-8. Jumlah sel masing-masing yang dimiliki adalah  $2,9 \times 10^5$  sel/ml dan  $7,8 \times 10^7$  sel/ml. Waktu adaptasi ini dapat dikatakan singkat. Hal ini dikarenakan media yang digunakan sebagai inokulum (*starter*) untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan media kultur. Oleh karena itu, usia sel relatif homogen sehingga fase adaptasi relatif lebih singkat. Menurut Volk dan Wheeler (1993), pada fase adaptasi ini berlangsung selama satu jam hingga beberapa jam bergantung pada jenis bakteri, umur biakan, dan nutrien yang terdapat dalam media.

Setelah sel bakteri mengalami fase pertumbuhan awal maka sel bakteri memasuki fase eksponensial. Pada fase ini sel mulai membelah dengan kecepatan yang sangat cepat dan dapat dikatakan pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang eksponensial. Fase eksponensial isolat bakteri WU 021055\* dimulai pada jam ke-8 sampai jam ke-20 dengan jumlah sel secara berturut-turut  $2,4 \times 10^8$  sel/ml dan jumlah sel tertinggi  $8,0 \times 10^8$  sel/ml. Menurut Kosim dan Putra (2010) bahwa pada fase eksponensial ini bakteri mengalami pertumbuhan eksponensial. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase ini lebih tinggi dibandingkan pada fase lainnya dan pada fase ini sel banyak menghasilkan enzim dan zat-zat metabolit primer yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan pertumbuhan dan perkembangannya. Senjarini (2007) menyatakan, pertumbuhan bakteri yang sangat cepat pada fase eksponensial menunjukkan bahwa pada fase tersebut bakteri memiliki

aktivitas yang tinggi dan metabolisme yang terbaik. Hal ini yang menjadi dasar pengambilan waktu panen produksi ekstrak kasar protein untuk menentukan waktu optimum dari awal fase eksponensial sampai fase eksponensial diperlambat (iodofase) yang merupakan fase diakhir fase eksponensial dan diawal fase stasioner.

Pada penelitian ini, produksi protein ekstrak kasar dari isolat bakteri WU 021055\* dilakukan pada fase eksponensial pada jam ke-10 yang merupakan waktu optimum produksi enzim. Penentuan waktu optimum dalam produksi protein ekstrak kasar yang terlalu singkat akan menghasilkan protein (enzim) yang tidak optimum akibat bakteri belum beradaptasi dengan lingkungannya. Waktu yang terlalu lama akan menyebabkan enzim mengalami inhibisi akibat menumpuknya produk reaksi enzim dengan substrat.



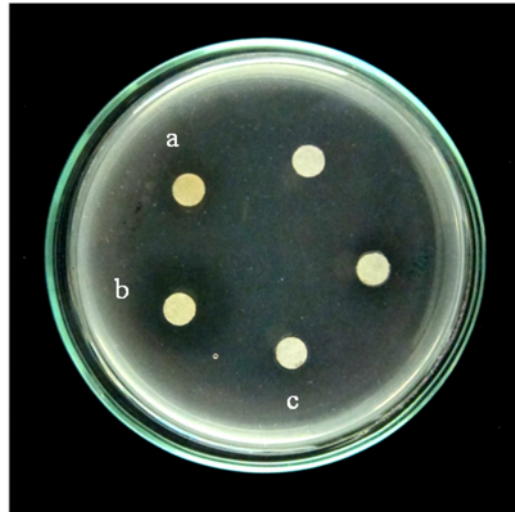
Gambar 4.3 Kurva pertumbuhan isolat bakteri WU 021055\* dari Perairan Pantai Papuma Jember selama 24 jam

#### 4.4 Karakteristik Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri WU 021055\*

Hasil pemisahan protein ekstrak kasar diperoleh 2 fase yaitu fase *retentate* dan *permeate*. Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan pada Gambar 4.4. Aktivitas fibrinolitik fase *retentate* menunjukkan diameter zona bening lebih lebar daripada fase *permeate*.

Hal ini diduga karena enzim dari fase *retentate* memiliki kemampuan mendegradasi substrat fibrin pada media fibrin agar. *Retentate* sebanyak 5  $\mu$ l memiliki aktivitas fibrinolitik dengan diameter zona bening sebesar 1,45 cm dan konsentrasi protein 0,0042 mg/ml. Sehingga pada hasil ini menunjukkan bahwa aktivitas fibrinolitik yang dihasilkan pada *retentate* mengandung agen fibrinolitik. Supernatan bebas sel memiliki aktivitas fibrinolitik dengan diameter zona bening sebesar 0,65 cm. Sedangkan *permeate* dengan konsentrasi 0,0017 mg/ml tidak memiliki aktivitas fibrinolitik.

Hasil ini membuktikan bahwa agen fibrinolitik memiliki berat molekul diatas 10 kDa. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa berat molekul enzim fibrinolitik yang telah dimurnikan dari berbagai isolat bakteri memiliki berat molekul yang bervariasi diatas 10 kDa. Enzim fibrinolitik dari *Bacillus polymaxa* NRC-A memiliki berat molekul 18 kDa (Mahmoud *et al.*, 2011). Enzim trombinase (*fibrinolytic enzyme*) dari *Bacillus sphaericus* (Balaraman dan Prabakaran, 2007) memiliki berat molekul sebesar 18,6 kDa. *Bacillus* sp. strain CK 11-4 (Kim *et al.*, 1996) memiliki berat molekul 28,2 kDa. *Bacillus licheniformis* strain KJ-31 (Hwang *et al.*, 2007) menghasilkan berat molekul 37 kDa. *Bacillus subtilis* IMR-NK1 memiliki enzim fibrinolitik murni dengan berat molekul 30 kDa (Chang *et al.*, 2000). Enzim fibrinolitik menurut Peng *et al.* (2005), juga menunjukkan bahwa semua enzim ini memiliki rentang berat molekul dari 27 sampai 44 kDa.

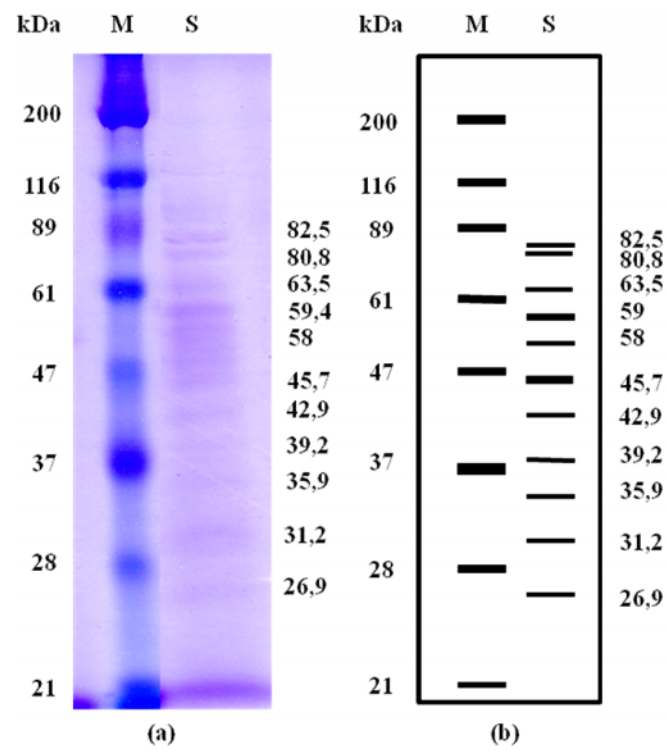


Gambar 4.4 Aktivitas fibrinolitik protein ekstrak kasar dari isolat bakteri WU 021055\* secara semikuantitatif pada Media Fibrin Agar, (a) supernatan bebas sel; (b) *retentate*; dan (c) *permeate*

#### 4.5 Berat Molekul Protein Ekstrak Kasar dari Isolat Bakteri WU 021055\*

Penentuan berat molekul protein kasar dari bakteri WU 021055\* dilakukan dengan cara analisis elektroforesis SDS-PAGE. Berdasarkan hasil analisis SDS-PAGE terhadap fase *retentate* diketahui ada 11 pita protein yang mengandung campuran protein yang ukurannya berbeda sehingga menghasilkan lebih dari 1 pita protein. Pita protein hasil SDS-PAGE dapat dilihat pada Gambar 4.5. *Retentate* diperkirakan memiliki berat molekul masing-masing 26,9, 31,2, 35,9, 39,2, 42,9, 45,7, 58, 59, 63,5, 80,8, dan 82,5 kDa. Hasil perhitungan penentuan berat molekul protein ditunjukkan pada Lampiran D.





Gambar 4.5 Hasil SDS-PAGE protein ekstrak kasar dari isolat bakteri WU 021055\*, (a) hasil *running* SDS-PAGE; (b) visualisasi SDS-PAGE; (M) *marker* protein HMW; (R) *retentate*

## **BAB 5. PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Skrining terhadap 23 isolat bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember diperoleh 11 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik. Setelah diuji aktivitas fibrinolitiknya diperoleh 3 isolat bakteri yang menghasilkan agen fibrinolitik. Aktivitas agen fibrinolitik dengan indeks aktivitas fibrinolitik sebesar 11 ditunjukkan oleh isolat bakteri WU 021055\*. Hasil produksi agen fibrinolitik yang dihasilkan oleh isolat bakteri WU 021055\* berupa protein ekstrak kasar dari *retentate* memiliki aktivitas fibrinolitik dengan diameter zona bening sebesar 1,45 cm. Sedangkan *permeate* tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa agen fibrinolitik berat molekul proteinnya berada diatas 10 kDa. Berat molekul protein dari *retentate* hasil SDS-PAGE dari isolat bakteri tersebut yaitu 26,9, 31,2, 35,9, 39,2, 42,9, 45,7, 58, 59, 63,5, 80,8, dan 82,5 kDa.

### **5.2 Saran**

Pada tahap berikutnya diperlukan pemurnian enzim fibrinolitik dengan teknik kromatografi untuk pemurnian enzim fibrinolitik. Selain itu, dapat pula dilakukan analisis zimografi terhadap protein ekstrak kasar untuk mengetahui berat molekulnya yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik. Karakterisasi lebih lanjut terhadap enzim tersebut sebaiknya dilakukan untuk mengetahui lebih detail karakteristik fibrinolitik yang dihasilkan. Lebih jauh, diharapkan agen fibrinolitik yang diperoleh dari isolat bakteri lokal dapat diproduksi dalam skala industri dalam bidang kesehatan dan kefarmasian.

## DAFTAR PUSTAKA

### Buku

- Arifin, J., & Utami, F. V. 2012. *Eksplorasi Bisnis Microsoft Excel untuk Simulasi Bisnis*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Bollag, D. M., & Edelstein, S. J. 1991. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss. John Wiley and Sons.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., & Edelstein, S. J. 1996. *Protein Methods*. (Edisi Kedua). New York: Willey-Liss.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. 2006. *Biochemistry*. (Edisi Kelima). California: Thomson Learning.
- Copeland, R. A. 1994. *Methods of Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols*. London: Chapman and Hall.
- Escobar, Harmaening, Joiner, Simmons, Smith, & Moore. 2002. "Introduction to Hemostasis". Dalam Harmening, D. M., (Ed). *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. (Edisi Keempat). Philadelphia: FA Davis.
- Garfin, D. E., Davey, J., & Lord, M. 2003. *Essential Cell Biology: Cell Structure, A Practical Approach*. UK: Oxford University Press.
- Harris, ELV. & Angal, S. 1989. *Protein Purification Methods a Practical Approach*. UK: Oxford University Press.
- Kaiser, L. 2005. *Microbiology a Manual*. USA: The Benjamin Publish.
- Katzung, B. G. 2002. "Basic and Clinical Pharmacology". Alih bahasa Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. *Farmakologi: Dasar dan Klinik*. (Edisi Kedelapan). Jakarta: Salemba Medika.
- Katzung, B. G. 2006. *Basic and Clinical Pharmacology*. (Edisi Kesepuluh). San Fransisco: McGraw-Hill.
- Kosim, M. & Putra, S. R.. 2010. Pengaruh Suhu Pada Protease dari *Bacillus subtilis*. Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010. Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya.

- Lehninger, A. L. 1993. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid I. Maggy Thenawidjaja, penerjemah. Jakarta: Erlangga.
- Meyrath, J. & Volavsec, U. 1975. *Production and Microbial Enzyme, in Food Processing* edited by Reed G. New York: Academic Press.
- Milner, M., & Makise, K. 2002. *Natto and Its Active Ingredient Nattokinase: A Potent and Safe Thrombolytic Agent. Alternative and Complementary Therapies*. New York: Marry Ann Liebert Inc.
- Mycek, Harvey, Champe, & Fisher. 2001. "Pharmacology". Alih bahasa Agoes, A., Hartanto, H., (Ed). *Farmakologi: Ulasan Bergambar*. (Edisi Kedua). Jakarta: Widya Medika.
- Nur, M. A. & Adijuwana, H. 1988. *Teknik Separasi Dalam Analisis Pangan*. Bogor: PAU-LSI IPB.
- Olson, J. 2004. "Clinical Pharmacology: Made Ridiculously Simple". Alih bahasa Chandranata L., Mander L. I., (Ed). *Belajar Mudah Farmakologi*. Jakarta: EGC.
- Sadikin, M. 2001. *Biokimia Darah*. Jakarta: Widya Medika.
- Schlegel, G. H. 1995. *General Microbiology*. (Edisi Ketujuh). Cambridge University.
- Scopes, R. K. 1987. *Protein Purification*. New York: Spinger-Verlag.
- Scopes, R. K. 1989. *Protein Purification*. New York: R.R. Donnelley and Sons.
- Suhartono, M. T. 1989. *Enzim & Bioteknologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi*. Bogor: IPB.
- Suhartono, M. T. 1992. *Protease*. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Tjay, T. H., & Rahardja, K. 2002. *Obat-obat Penting*. (Edisi Kelima). Jakarta: Elex Media Komputino.
- Volk, W. A. & Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.
- Wilson, K. & Walker, J. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry 5th Edition*. Cambridge: Cambridge University Press.

World Health Organization. 2008. *The World Health Report 2008: Primary Health Care Now More Than Ever*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication.

### **Tidak Diterbitkan**

Corning Incorporated. 2009. "Corning Spin-X UF 500 µl Concentrator: Technical Data and Operating Instructions for *in vitro* Use Only." New York: USA.

Huda, N. 2010. "*BOX-PCR* dan *BIOLOG GN2 Metabolic Fingerprinting* untuk Menentukan Keanekaragaman Isolat BAKteri dari Perairan Pantai Papuma Jember," Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Biologi FMIPA Universitas Jember.

Senjarini, K. 2007. "Diagnosis of Natural Bacterial Assemblages: Application of Fluorescence Markers for The Analysis of Hydrolytic Enzyme Activity in Aquatic Environments." Tidak Dipublikasikan. Disertasi. Rostock: der Universitat Rostock.

### **Terbitan Berkala**

Arbind, K., Manisha., & Kaur, J. 2011. Fibrinolytic Agents in Reference to Fungi: An overview. *J. of Pharm. Sci.*, 411: 4225-4229.

Arunachalam, C., & Aiswarya, W. 2011. Microbial Fibrinolytic Enzymes- A Deity for Thrombolysis. *Advanced Biotech.*, 10 (9): 8-11.

Astrup, T., & Mullertz, S. 1952. The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40: 346–351.

Balaraman, K., & Prabakaran, G. 2007. Production and Purification of a Fibrinolytic Enzyme (thrombinase) from *Bacillus sphaericus*. *Indian J. Med. Res.*, 126: 459-464.

Chang, C. T., Fan, M. H., Kuo, F. C., & Sung, H. Y. 2000. Potent Fibrinolytic Enzyme from a Mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NKI. *J. Agric. food Chem.*, 48: 3210-3216.

- Chitte, R.R., & Dey, S. 2000. Potent Fibrinolytic Enzyme from a Thermophilic *Streptomyces megasporos* strain SD5. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31 (6): 405-410.
- Collen, D., & Lijnen, H. R. 1994. Staphylokinase a Fibrin-Specific Plasminogen Activator with Therapeutic Potential. *Blood*, 84 (3): 680-686.
- Hwang, Choi, Kim, Park, & Cha. 2007. Purification and Characterization of a New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus subtilis* KJ-31, Isolated from Korean Traditional *Jeot-gal*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17 (9): 1469-1476.
- Hwang, Kim, Kim, Huh, Min, Park, Han, Lee, Kim, Ryu, & Kim. 2002. In vivo Evaluation of Lumbrakinase, a Fibrinolytic Enzyme Extracted from *Lumbricus rubellus*, in a Prosthetic Vascular Graft. *J. Cardiovas Surg.*, 43: 891-894.
- Jeong, Y. K., Park, J. U., Baek, H., Park, S. H., & Kong, I. S. 2001. Purification and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 89-92.
- Jeong, Y., Kim, J., Gal, S., Kim, J., Park, S., Chung, K., Kim, Y., Kim, B., & Jono, W. 2004. Molecular Cloning and Characterization of the Gene Encoding a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* strain A1. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 711-717.
- Kho, Park, Cho, Lee, Myung, & Park. 2005. Confirmation of Vpr as a Fibrinolytic Enzyme Present In Extracellular Proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expre. Puri.*, 39: 1-7.
- Kim, Choi, Kim, Park, Choi, Lee, Oh, Kwon, & Lee. (1996). Purification And Characterization Of A Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2482-2488.
- Kunamneni, A., Abdelghani, T. T. A., & Ellaiah. P. 2007. Streptokinase-the Drug of Choice for Trombolytic Therapy. *J. Thromb.*, 23: 9-23.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Protein during the assembly of the heat of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Mahdiyah, D., Wahyudi, A. T., & Mukti, B. H. 2012. Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis* sp. Penghasil Enzim Protease. *BIOSCIENTIAE*, 9 (1): 1-7.

- Mahmoud, Imam, Ghazy, Ghada, Ibrahim, Fahmy, Mohamed, El-Badry, Azza, & Abdel-Aty. 2011. Purification and Characterization of A New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus polymaxa* NRC-a. *Int. J. of Acad. Res.*, 3 (4): 542-547.
- Pan, R., Zhang, Z.J., & He, R.Q. 2009. Review Article: Earthworm protease. *App Environ. Soil Sci.*, 2010: 1-13.
- Peng, Y., Yang, X., & Zhang, Y. 2005. Microbial Fibrinolytic Enzyme: an Overview of Source, Production, Properties and Trombolytic Activity *in vivo*. *Appl. Microbial Biotechnol.*, 69: 126-132.
- Pimiento, Ayala, Rodriguez, Ramos, Mellaert, Vallin, & Anne. 2007. Recombinant Production of *Streptococcus equismilis* Streptokinase by *Streptomyces lividans*. *Microb. Cell Factor*, 6(20): 1-8.
- Prasad, Kashyap, Deopujari, Purohit, Taori, & Dagainawala. 2007. Effect of *Fagonia Arabica* (Dhamasa) on *in vitro* Thrombolysis. *BMC Comp. and Alt. Med.*, 7: 36.
- Reed, Houg, Seren, Matsueda, Wang, & Hedstorm. 1999. A Catalytic Switch and the Conversion of Streptokinase to a Fibrin-targeted Plasminogen Activator. *Proc. Atl. Sci.*, 96: 8879-8883.
- Sajuthi, Suparto, Yanti, & Praira. 2010. Purifikasi dan Pencirian ENzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang. *Makara, Sains*, 14 (2): 145-150.
- Simkhada, Mander, Cho, & Yoo. 2010. A Novel Fibrinolytic Protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Proc. Biochem.*, 45: 88-93.
- Sumi, Hamada, Tsushima, Mihara, & Muraki. 1987. A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto; A Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet. *Experiantia*, 43(10): 1110-1111.
- Wang, Ji, Nout, Li, Ji, & Chen. 2006. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme of a *Bacillus subtilis* DC33, Isolated from Chinese Traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 750-758.
- Wang, Zhang, Yang, Diao, & Bai. 2008. Screening of a High Fibrinolytic Enzyme Producing Strain and Characterization of the Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus subtilis* LD-8547. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 475-482.

## DAFTAR ISTILAH

### H

**Hemostasis** Hemostasis adalah penghentian spontan perdarahan dari pembuluh darah yang cedera, pecah atau rusak.

### I

**Infark Miokardia** Infark Miokardia adalah nekrosis atau kematian sel miokardia (sel otot jantung).

### P

**Plak Aterosklerosis** adalah kondisi timbunan kolesterol, debris sel dan matriks jaringan ikat sehingga mengalami penyempitan pembuluh darah arteri (vaskular).

### R

**Reoklusi** Reoklusi adalah penyumbatan atau penutupan kembali pembuluh darah.

**Ruptur** Ruptur adalah lisis atau pecahnya suatu jaringan didalam lapisan endotel pembuluh darah.

### T

**Trombosis** Trombosis adalah suatu keadaan patologis berupa pembentukan masa bekuan darah (trombus) yang berlebihan dan abnormal intravaskular yang berasal dari konstituen darah sehingga menyebabkan terganggunya aliran darah.



## LAMPIRAN

### A. KOMPOSISI MEDIA DAN LARUTAN

#### A.1 Komposisi Media Kultur dan Uji Aktivitas

Media	Bahan	Komposisi
<i>Nutrient Agar</i>	<i>bacto peptone</i> 0,5% (b/v)	5 gr
	<i>meat extract</i> 0,3% (b/v)	3 gr
	<i>bacto agar</i> 2% (b/v)	20 gr
	akuades	1000 ml
<i>Nutrient cair</i>	<i>bacto peptone</i> 0,5% (b/v)	5 gr
	<i>meat extract</i> 0,3% (b/v)	3 gr
	akuades	1000 ml
<i>Skim Milk Agar</i>	susu skim 10% (b/v)	100 gr
	<i>bacto agar</i> 2% (b/v)	20 gr
	akuades	1000 ml
Luria Bertani cair	<i>yeast extract</i> 0,5% (b/v)	5 gr
	tryptone 1% (b/v)	10 gr
	NaCl 1% (b/v)	10 gr
	akuades	1000 ml
Fibrin Agar	<i>bovine fibrinogen</i> 0,1% dalam 0,05 M PBS pH 7,4 (b/v)	0,01 gr/10 ml
	<i>bovine thrombine</i> dalam 0,5 M CaCl <sub>2</sub> (b/v)	0,2 mg/0,2 ml
	<i>bacto agar</i> 2% (b/v)	0,2 gr

#### A.2 Komposisi Larutan Uji

Larutan	Bahan	Komposisi	Keterangan
larutan 0,5 M CaCl <sub>2</sub> (b/v)	CaCl <sub>2</sub>	5,549 gr	
	akuades	100 ml	
larutan 50 mM PBS (b/v)	KCl	0,373 gr	pH ditera hingga 7,4
	NaCl	0,267 gr	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,680 gr	
	NaHPO <sub>4</sub>	0,710 gr	
	akuades	100 ml	

**B. DATA PERHITUNGAN JUMLAH SEL ISOLAT BAKTERI WU 021055\***

Waktu (jam)	Kepadatan Sel (selx10 <sup>6</sup> sel/ml)		SD	% Kesalahan	Sel Dihitung Berdasarkan Real Sel (No)	Sel Dihitung Berdasarkan Rumus (Nt)
	Jumlah	Rerata				
0	0,9	0,29	0,01	3,448	2,9x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>5</sup>
2	3,1	1,04	0,05	4,824	1,0x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>
4	20,8	6,94	0,04	0,628	6,9x10 <sup>6</sup>	5,7x10 <sup>6</sup>
6	233,7	77,90	1,83	2,353	7,8x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>
8	720,5	240,17	1,26	0,524	2,4x10 <sup>8</sup>	9,9x10 <sup>7</sup>
10	1053,0	351,00	3,60	1,027	3,5x10 <sup>8</sup>	3,1x10 <sup>8</sup>
12	1508,0	502,67	2,52	0,501	5,0x10 <sup>8</sup>	5,8x10 <sup>8</sup>
14	1843,4	614,48	8,42	1,371	6,2x10 <sup>8</sup>	7,1x10 <sup>8</sup>
16	2156,6	718,87	12,29	1,710	7,2x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>
18	2320,0	773,33	4,81	0,622	7,7x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>
20	2392,0	797,34	12,22	1,533	8,0x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>
22	2378,8	792,93	2,39	0,301	7,9x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>
24	2378,7	792,89	9,46	1,193	7,9x10 <sup>8</sup>	7,5x10 <sup>8</sup>

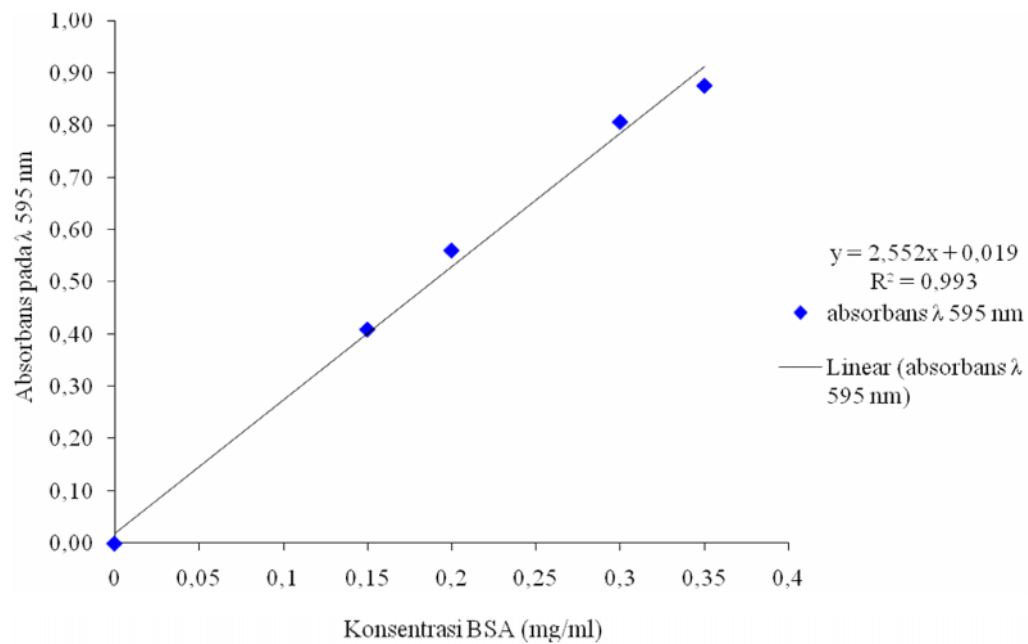
1. Satu koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada 10 ml media LB cair (sebagai *starter*) lalu setelah diinkubasi 12 jam, 500 µl kultur *starter* diinokulasikan ke dalam 50 ml media LB cair sebagai kultur pertumbuhan sel bakteri;
2. Sel bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran kuat 1000 kali;
3. Jumlah sel bakteri dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer*(Petroff-Hauser).

## C. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN

### C.1 Absorbansi Tingkatan Konsentrasi BSA untuk Pembuatan Standar BSA

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbans Larutan
0,00	0,000
0,15	0,409
0,20	0,560
0,30	0,806
0,35	0,875

### C.2 Kurva Standar BSA



$y$  = absorbans pada panjang gelombang ( ) 595 nm  
 $x$  = konsentrasi protein (mg/ml)

### C.3 Penentuan Konsentrasi Protein Sampel

Konsentrasi protein sampel (x) diperoleh dari hasil input absorbans larutan sampel ke dalam persamaan regresi  $y=2,552x+0,019$  hasil dari kurva standar BSA. Hasil penentuan konsentrasi protein sampel ditunjukkan pada Tabel di bawah ini.

Sampel	Absorbans Larutan	Konsentrasi (mg/ml)
Fase <i>retentate</i>	0,554	0,0042
Fase <i>permeate</i>	0,236	0,0017

## D. ELEKTROFORESIS SDS-PAGE

### D.1 Preparasi *buffer* Elektforesis SDS-PAGE

Larutan dan Pewarna	Bahan	Komposisi	Keterangan
akril/bis-akril 40%	akrilamida	37 gr	
	bis-akrilamida	1 gr	
<i>buffer</i> elektroforesis	akuades v/v)	100 ml	
	tris (hidroksimetil)-aminometan	3 gr	pH ditera hingga 8,3
	glisin (b/v)	14,4 gr	
	SDS 0,1% (b/v)	1 gr	
	akuades	1000 ml	
<i>buffer</i> sampel	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml	
	gliserol 50% (v/v)	0,8 ml	
	SDS 10% (b/v)	1,6 ml	
	2-merkptoetanol	0,4 ml	
	bromfenol biru 1% (b/v)	secukupnya	
	akuades	hingga volume total 8 ml	
larutan pewarna ( <i>staining</i> )	<i>coomassie brilliant blue</i> R-250	1 gr	
	metanol 40% (v/v)	450 ml	
	asam asetat glasial	100 ml	
	akuades	hingga volume total 1000 ml	
larutan peluntur ( <i>destaining</i> )	metanol 40% (v/v)	500 ml	
	asam asetat glasial 10% (v/v)	100 ml	
	akuades	hingga volume total 1000 ml	

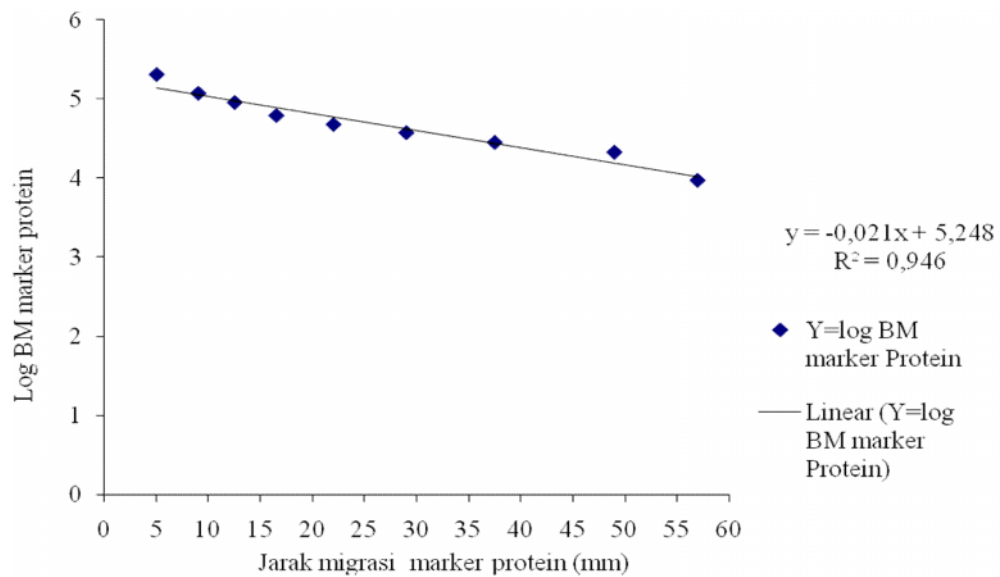
### D.2 Preparasi Gel Elektforesis SDS-PAGE

Pereaksi	Gel Pemisah 12%	Gel Penahan 4%
akril./bis-akril. 40% (v/v)	3 ml	498,5 µl
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2,50 ml	-
0,5 M Tris HCl pH 6,8	-	1,25 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
akuades	4,34 ml	3211,5 µl
amonium persulfat 10% (b/v)	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Total	10 ml	5 ml

### D.3 BM *Marker Protein* HMW SDS-PAGE 12%

<i>Marker Protein</i>	BM (kDa)
Myosin	200,0
-Galactosidase	116,0
Bovine serum albumin	89,0
Glutamate dehydrogenase	61,0
Ovalbumin	47,0
Carbonic anhydrase	37,0
Myoglobin	28,0
Lysozyme	21,0
Aprotinin	9,3

### D.4 Kurva Standar *Marker Protein* HMW



$y = \log \text{ BM protein}$   
 $x = \text{jarak migrasi pita protein (mm)}$

### D.5 Jarak Migrasi dan Log BM *Marker* Protein HMW

Jarak Migrasi <i>Marker</i> (mm)	Log BM <i>Marker</i>
5,0	5,301
9,0	5,064
12,5	4,949
16,5	4,785
22,0	4,672
29,0	4,568
37,5	4,447
49,0	4,322
57,0	3,968

### D.6 Penentuan Berat Molekul Protein Sampel

Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan ekstrapolasi jarak migrasi sampel protein antara log BM *marker* protein terhadap jarak migrasi *marker* protein. Nilai log BM protein sampel ( $y$ ) ditentukan dari hasil input data jarak migrasi sampel ke dalam persamaan linear dari kurva standar *marker* protein yaitu  $y = -0,021x + 5,248$ , kemudian hasil tersebut dimasukkan ke dalam rumus antilog. Lalu hasil antilog didapat berat molekul protein dalam bentuk satuan Dalton (Da). Jika diubah ke dalam satuan kiloDalton (kDa) maka hasil antilog dibagi seribu. Hasil penentuan berat molekul protein sampel dalam Da dan kDa ditunjukkan pada Tabel di bawah ini.

Jarak Migrasi Sampel (mm)	Log BM	Antilog BM (Da)	BM (kDa)
15,80	4,9162	82451	82,452
16,20	4,9078	80872	80,872
21,20	4,8028	63504	63,504
22,60	4,7734	59347	59,347
23,00	4,7650	58210	58,210
28,00	4,6600	45709	45,709
29,30	4,6327	42924	42,924
31,20	4,5928	39156	39,156
32,95	4,5561	35979	35,979
35,90	4,4941	31196	31,196
39,00	4,4290	26853	26,853