



**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI
PANTAI BANDEALIT KABUPATEN JEMBER**

SKRIPSI

Oleh

**Dewi Eka Prawita Rani
NIM 081810401050**

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



**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI
PANTAI BANDEALIT 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

**Dewi Eka Prawita Rani
NIM 081810401050**

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

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orangtua saya, Ibunda Surati dan Ayahanda Widi Widayanto, atas segala dukungan dan untaian doa yang terus terpanjat pada setiap sujudnya;
2. adik saya Andy Ramadhan dan Bagus Tri Mahendra yang selalu mendukung setiap langkah saya;
3. guru-guru saya sejak sekolah dasar hingga perguruan tinggi, atas bimbingan dan dukungannya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Bacalah atas nama Tuhanmu yang menciptakan. Yang telah menciptakan manusia dari segumpal darah. Bacalah, dan Tuhanmu sangat Pemurah. Yang mengajarkan penggunaan pena. Mengajarkan manusia apa-apa yang belum diketahuinya.
(terjemahan Surat Al-Alaq, ayat 1-5)^{*)}

“...dan jika umurmu tidak sepanjang umur dunia, sambunglah dengan tulisan.”
(Pramoedya Ananta Toer)^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1978. *Terjemah dan Tafsir Al Qur'an*. Bandung: Firma Sumatra.

^{**)} Pramoedya Ananta Toer. 1953. *Menulis untuk Keabadian*. Jakarta: Majalah Kisah.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Dewi Eka Prawita Rani

NIM : 081810401050

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandalit Kabupaten Jember” 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 Dr. rer. nat. Kartika Senjarini. 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, 19 Februari 2013

Yang menyatakan,

Dewi Eka Prawita Rani

NIM 081810401050

SKRIPSI

**SKRINING AGEN FIBRINOLITIK ISOLAT BAKTERI PANTAI
BANDEALIT KABUPATEN JEMBER**

Oleh

Dewi Eka Prawita Rani

NIM 081810401050

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandalit 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. Rudju Winarsa M.Kes
NIP 196008161989021001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si
NIP 196805031994011001

Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt
NIP 19780728200512001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit Kabupaten Jember;

Dewi Eka Prawita Rani; 081810401050; 2013; 48 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang paling dominan di lingkungan, salah satunya di lingkungan perairan Pantai Bandialit Kabupaten Jember. Isolat tersebut berpotensi dimanfaatkan dalam bidang kesehatan, salah satunya dalam kemampuan menghasilkan enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik berperan dalam proses degradasi fibrin pada kasus trombosis. Trombosis adalah keadaan dimana terjadi pembentukan massa bekuan darah intravaskuler, yang berasal dari konstituen darah dan bersifat patologis. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining terhadap isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik dari perairan Pantai Bandialit Kabupaten Jember.

Metode yang digunakan meliputi uji kaseinolitik dan *fibrin plate assay* terhadap 15 isolat bakteri Pantai Bandialit, pembuatan kurva pertumbuhan isolat terpilih dengan menghitung jumlah sel bakteri menggunakan metode perhitungan langsung (*direct count*), produksi ekstrak kasar protein, pemekatan protein dengan membran ultrafiltrasi *cut off* 10 kDa yang menghasilkan dua fase yaitu fase atas (*retentate*) yang merupakan protein dengan ukuran molekul > 10 kDa dan fase bawah (*permeate*) yang merupakan protein dengan ukuran molekul < 10 kDa, pengukuran konsentrasi protein dengan metode Bradford, dan pengukuran berat molekul protein melalui SDS-PAGE.

Hasil penelitian didapatkan 10 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik dan hanya 1 isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik yaitu isolat bakteri BA 9920 dengan nilai indeks aktivitas enzim proteolitik dan fibrinolitik berturut-turut, 5,3 dan 2,5. Berdasarkan hasil kurva pertumbuhan, diperoleh fase log dari isolat BA 9920 pada jam ke-12 sampai jam ke-24 dengan jumlah sel tertinggi sebesar $21,9 \times 10^7$ sel/ml. Pengukuran konsentrasi protein *retentate* dan *permeate* berturut-turut yaitu

0,00431 mg/ml dan 0,00133 mg/ml yang menunjukkan bahwa konsentrasi protein pada *retentate* lebih tinggi dan hasil uji *fibrin plate assay* menunjukkan bahwa *retentate* memiliki aktivitas tinggi dalam mendegradasi substrat pada media fibrin, sedangkan *permeate* tidak terdapat aktivitas. Pengukuran berat molekul protein dengan SDS-PAGE pada fase atas (*retentate*) didapatkan 3 pita protein dengan berat molekul \pm 57,5 kD, 60,2 kD dan 81,2 kD.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah Swt., yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandealet Kabupaten Jember”. 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. Sattya Arimurti, S.P., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik dan dosen pembimbing utama, yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi selama berada pada masa perkuliahan sampai dengan terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing anggota dan ketua grup penelitian TBV dan Bakteri yang telah membimbing dan membiayai penelitian ini;
3. Drs. Rudju Winarsa M.Kes. selaku dosen pembimbing anggota pengganti yang telah banyak memberikan bimbingan dan motivasi dalam penulisan skripsi ini;
4. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. dan Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
5. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu selama masa perkuliahan;
6. ibunda Surati, ayahanda Widi Widayanto dan adik serta keluarga besar, yang telah memberikan semangat dan doa serta dukungan hingga terselesaikannya skripsi ini;

7. rekan berbagi pendapat, Adifa T. Mustika Aji, terima kasih atas segala dukungan dan motivasinya disaat lelah selama pengerjaan skripsi ini;
8. rekan kerja seperjuangan yang tergabung dalam *TBV-Bacterial Group*, Ika Agus Rini, Madaniyah, Arif Setiawan, Imam H., Syubbanul W., Dina Fitriyah, Dewi Riskha, Dwi Esti, Emy Dwi F., Khilwiyah Eka P., Pak Ali, Pak Adrial, Rofi'atul, Moh. Mirza, Zahira, Dini, Dani dan Harmas, terimakasih atas kerjasama dan dukungan serta bantuannya selama ini;
9. rekan-rekan *Sugar Group*, Edia Fitri, Hidayah M. N., Rinda Media, Dina Dwi J., terima kasih atas kerjasama dan dukungannya selama ini;
10. teman-teman D'Morphousa, Lia Risqi, Dian Aliviyanti, Nissa Nur R., dan Nur Indah D. F., yang senantiasa memberi motivasi dan semangat selama pengerjaan skripsi ini;
11. rekan-rekan Mikrobiologi, Siti Nur Azizah, Widya Yuniar dan Lutfiya C., terima kasih atas kerjasama dan dukungan serta bantuannya selama ini;
12. teman-teman Biologi angkatan 2008 yang tergabung dalam "Omfalomesenterika", Riana Maya, Risca Adiyani, Abdur Rasit, Condro Wisnu, Ika Dewi, Luluk Faiqotul dan yang lainnya, terimakasih atas keceriaan, motivasi dan dukungannya selama pengerjaan skripsi ini;
13. 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, Januari 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Mekanisme Pembekuan Darah dan Fibrinolisis	4
2.1.1 Trombosis	7
2.1.2 Obat Trombolitik	8
2.2 Enzim Fibrinolitik	10
2.2.1 Enzim Fibrinolitik dan Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik	10
2.2.2 Skrining Enzim Fibrinolitik	13

BAB 3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.3 Prosedur Penelitian	17
3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri	17
3.3.2 Skrining Aktivitas Proteolitik	17
3.3.3 Skrining Aktivitas Fibrinolitik.....	18
3.3.4 Produksi Ekstrak Kasar Protein	18
3.3.5 Pemekatan Protein	19
3.3.6 Analisis konsentrasi Protein.....	19
3.3.7 Analisis Aktivitas Fibrinolitik	20
3.3.8 Pengukuran Berat Molekul Protein	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Skrining Proteolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit	
Kabupaten Jember	22
4.2 Skrining Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit	24
Kabupaten Jember	
4.2.1 Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit	24
4.2.2 Produksi dan Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Kasar	
Protein	26
4.3 Pengukuran Berat Molekul Protein <i>Retentate</i>	29
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil Skrining Proteolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit	23
4.2.1 Hasil Skrining Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandialit Kabupaten Jember	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1.1 Pembentukan Bekuan Darah	4
2.1.2 Proses Fibrinolisis	10
4.1 Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri BA pada Media SMA.....	22
4.2.1 Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri BA pada Media <i>Fibrin Plate Assay</i>	24
4.2.2a Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri BA 9920 selama 60 Jam	27
4.2.2b Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Kasar Protein Isolat Bakteri BA pada Media <i>Fibrin Plate Assay</i>	29
4.3 Berat Molekul Protein <i>Retentate</i> berdasarkan SDS-PAGE	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Alur Penelitian	38
B. Daftar Faktor Pembekuan Darah	39
C. Komposisi Bahan	40
C.1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan Media	40
C.2 Komposisi Bahan Kimia untuk Pembuatan Buffer	41
C.3 Komposisi Bahan untuk Gel Elektroforesis	42
D. Data Morfologi Isolat Bakteri Pantai Bandialit Kabupaten Jember ...	43
D.1 Data Morfologi Isolat Bakteri Perairan Pantai Bandialit	
Kabupaten Jember Umur 3 Hari	43
D.2 Gambar Morfologi Koloni Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai	
Bandialit Kabupaten Jember Umur 3 Hari	44
E. Perhitungan Jumlah Sel Isolat Bakteri BA 9920	45
F. Analisis Konsentrasi Protein	46
G. Penentuan Berat Molekul Protein berdasarkan Elektroforesis SDS-	
PAGE	47

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme yang paling dominan di lingkungan, salah satunya di lingkungan perairan. Salah satu lingkungan perairan yang memiliki diversitas isolat bakteri cukup tinggi yaitu perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember. Hasil penelitian Herawati (2010), berhasil diisolasi 60 isolat bakteri dari Pantai Bandalit Kabupaten Jember, yang memiliki karakteristik morfologi dan metabolik yang beragam. Hal ini menunjukkan keragaman aktivitas enzim pada bakteri perairan Pantai Bandalit yang dapat dimanfaatkan untuk kesejahteraan manusia, salah satunya di bidang kesehatan.

Salah satu masalah kesehatan di Indonesia adalah kasus *infark miokard* yang disebabkan oleh trombosis. Berdasarkan data dari Departemen Kesehatan RI tahun 1997, *infark miokard* akut menduduki peringkat kedua penyebab kematian di Indonesia setelah kanker (WHO, 2005). Trombosis adalah keadaan dimana terjadi pembentukan massa bekuan darah intravaskuler, yang disebabkan oleh pembentukan fibrin yang berlebihan. Kelainan yang disebabkan oleh trombosis ini dapat ditangani dengan terapi trombolitik.

Terapi trombolitik dilakukan melalui injeksi dan secara oral yang memicu agen trombolitik untuk melisiskan bekuan darah dalam pembuluh darah dan merupakan agen yang secara luas digunakan untuk pengobatan pada gangguan trombosis, yang mengandung urokinase, *tissue plasminogen activator* (tPA), dan streptokinase. Walaupun digunakan secara luas, agen-agen tersebut memiliki efek imunogenik (Banerjee *et al.*, 2003), reaksi di dalam tubuh relatif lama, waktu paruh pendek dan harganya relatif sangat mahal (Fengxia *et al.* dalam Mahmoud, 2011). Beberapa penelitian dilakukan untuk menggali potensi organisme dalam menghasilkan enzim fibrinolitik yang berperan dalam terapi trombolitik.

Enzim fibrinolitik merupakan protein yang dapat diperoleh dari tanaman, hewan, ataupun mikroorganisme. Berbagai enzim fibrinolitik telah ditemukan dari berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, actinomycetes dan fungi (Peng *et al.*, 2002). Mikroorganisme sangat potensial sebagai penghasil enzim dengan nilai ekonomis. Penggunaan mikroorganisme sebagai sumber enzim fibrinolitik mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan 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 (Meyrach dan Volavseck, 1975). Oleh karena itu, isolasi enzim fibrinolitik dari mikroorganisme sangat penting, khususnya dari bakteri. Berbagai penelitian tentang bakteri menunjukkan bahwa bakteri memiliki potensi menghasilkan enzim protease fibrinolitik.

Bakteri asal perairan merupakan sumber potensial untuk menghasilkan enzim yang bermanfaat bagi industri. Aktivitas optimum enzim bakteri perairan biasanya terjadi pada kadar garam yang tinggi dan bersifat termostabil, membuat enzim ini berguna dalam banyak proses industri. Aplikasi enzim termostabil memberikan keuntungan pada industri, antara lain pada suhu tinggi reaksi berlangsung lebih cepat, resiko kontaminasi dapat ditekan, viskositas larutan berkurang sehingga mengurangi energi untuk agitasi dan biaya pendinginan dapat ditekan, sehingga potensial untuk produksi skala besar (Rahayu, 2007). Hasil penelitian Mahdiyah *et al.* (2012), menunjukkan bahwa bakteri perairan dari Kepulauan Waigeo Kabupaten Raja Ampat Papua Barat, yang berasosiasi dengan spons *Japsis* sp. mampu menghasilkan enzim protease dengan indeks aktivitas enzim sebesar 3,0. Aktivitas proteolitik yang dimiliki oleh bakteri perairan menjadi dasar pendugaan adanya aktivitas enzim fibrinolitik, yang merupakan salah satu dari enzim protease.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas fibrinolitik isolat bakteri asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember?

1.3 Batasan Masalah

1. Skrining aktivitas fibrinolitik dilakukan secara semikuantitatif pada 15 isolat bakteri asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember.
2. Skrining aktivitas fibrinolitik dilakukan pada ekstrak kasar protein dari isolat bakteri asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik isolat bakteri asal perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember.

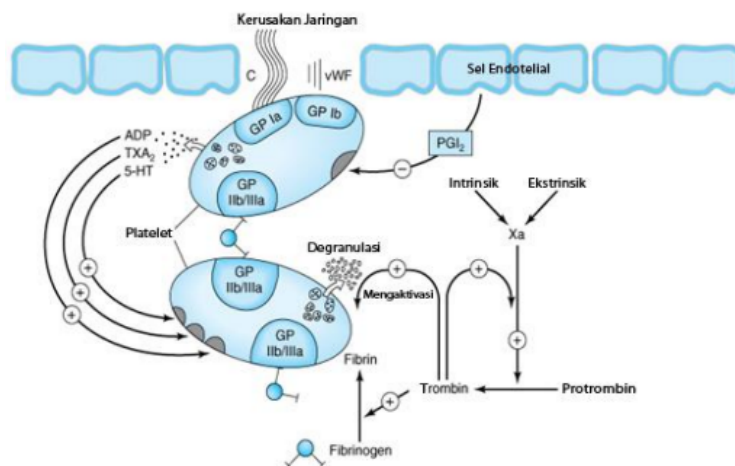
1.5 Manfaat Penelitian

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

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mekanisme Pembekuan Darah dan Fibrinolisis

Darah merupakan cairan tubuh yang mengalir di dalam pembuluh darah. Darah terbagi atas fase cair dan fase padat. Fase cair darah disebut plasma yang mengandung air, protein, dan zat-zat terlarut lainnya. Sedangkan fase padat darah terdiri atas sel darah merah, sel darah putih, dan keping darah (Bell, 2002). Pembentukan sel-sel darah manusia, yang dikenal dengan hematopoiesis, terjadi di sumsum tulang belakang (Hoffbrand *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004).



Gambar 2.1. Pembentukan bekuan darah (Sumber: Katzung, 2006)

Pembekuan darah atau prokoagulasi terjadi ketika sel darah bertemu dengan sel-sel endotelial atau jika terjadi kerusakan pada jaringan kulit. Mekanisme pembekuan ini dapat dilihat pada Gambar 2.1. Sel-sel endotelial sebenarnya bersifat antikoagulan dan inert terhadap faktor-faktor pembekuan darah (Escobar, 2002). Namun adanya luka dapat mengubah sifat sel endotelial menjadi sangat prokoagulan. Perubahan sifat sel dipengaruhi, antara lain oleh adanya kolagen, faktor von

Willebrand, dan glikoprotein Ib (GPIb) yang ada pada membran keping darah (Katzung, 2006; Olson, 2004; Escobar, 2002).

Sifat prokoagulan sel endotelial menyebabkan penempelan trombosit atau keping darah pada dinding pembuluh darah (Katzung, 2006). Penempelan trombosit diikuti oleh perubahan bentuk trombosit dan pelepasan adenosin difosfat (ADP). Pelepasan ADP menyebabkan pecahnya trombosit-trombosit lain dan mulai menyumbat lubang pada pembuluh. Trombosit yang telah aktif akan menyediakan permukaan fosfolipida yang bertindak sebagai perantara kedua yang akan mengaktifkan faktor-faktor pembekuan darah, baik pada sistem intrinsik maupun ekstrinsik. Seiring dengan terjadinya kerusakan pembuluh darah, sistem hemostasis juga akan mengalirkan darah melalui pembuluh darah lain di sekitar pembuluh yang rusak untuk mempercepat proses pembekuan darah (Escobar, 2002).

Bekuan darah merupakan trombosit-trombosit yang saling terangkai melalui sejumlah reaksi biokimia dan membentuk agregat trombosit (Escobar, 2002). Asam arakidonat dalam trombosit akan diubah menjadi tromboksan A₂ (TXA₂) yang berfungsi sebagai pengaktif trombosit dan vasokonstriktor bersama ADP dan serotonin (5-HT) (Olson, 2004; Escobar, 2002). Pengaktifan trombosit mengubah konformasi pada reseptor IIb/III integrin (glikoprotein IIb/IIIa) sehingga mudah mengikat fibrinogen dan membentuk ikatan silang antarmolekul trombosit sehingga terbentuk agregat trombosit. Agregat trombosit terdiri dari fibrin, trombosit, dan sisa-sisa eritrosit yang tidak larut. Agregat yang pembentukannya tidak terkendali dapat menyumbat pembuluh darah, serta menyebabkan iskemia jaringan (Olson, 2004; Katzung, 2006).

Akhir pembekuan darah adalah pembentukan fibrin melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik yang keduanya akan mengaktifkan jalur normal (Escobar, 2002). Inisiasi reaksi berantai pembentukan agregat trombosit dipengaruhi oleh pengaktifan faktor-faktor pembekuan darah yang prosesnya berbentuk reaksi berantai atau efek domino (Katzung, 2006; Escobar, 2002). Setiap reaksi merupakan

akibat dari reaksi sebelumnya. Jika satu di antara faktor-faktor tersebut tidak dapat diaktifkan, maka akan mengakibatkan koagulasi terhambat, inisiasi tahap selanjutnya terhambat, waktu pembentukan bekuan darah semakin lama, atau terjadi perdarahan secara terus-menerus (cenderung disalahartikan dengan kekurangan faktor XII) (Escobar, 2002). Jalur pembentukan bekuan yang paling singkat dimulai dengan pengaktifan jalur ekstrinsik.

Jalur ekstrinsik adalah aktivasi faktor pembekuan darah yang dipicu oleh kerusakan dinding endotelial pembuluh darah. Jalur ini disebut ekstrinsik karena masuknya faktor jaringan, senyawa yang tidak ditemukan di dalam darah, ke dalam pembuluh. Faktor jaringan ini, atau dikenal juga sebagai tromboplastin atau faktor III, dilepaskan oleh jaringan pembuluh yang terluka. Bersama-sama dengan ion kalsium, faktor III ini 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. Tujuannya, mempercepat pembentukan fibrin melalui pelepasan keping darah dari eritrosit. Selain itu, faktor VIIa juga akan mengaktifkan faktor IX pada jalur intrinsik (Escobar, 2002).

Jalur intrinsik diinisiasi adanya paparan senyawa asing bermuatan negatif seperti kolagen, dinding subendotelial, atau fosfolipida sehingga 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. Peran HMWK adalah mempercepat aktivasi faktor XI. Selanjutnya, faktor XIa dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor IX menjadi IXa. Ion kalsium juga akan berperan dalam tahap selanjutnya pada jalur intrinsik ini, yaitu ketika bersama faktor IXa, VIIa, dan fosfolipida faktor keping darah 3 (*platelet factor 3* (PF3)) mengaktifkan jalur normal (faktor X menjadi faktor Xa) (Escobar, 2002).

Pertemuan jalur intrinsik dan ekstrinsik adalah pembentukan faktor Xa. Faktor koagulasi ini mengkatalis perubahan protrombin menjadi trombin (faktor IIa) pada

jalur akhir dengan bantuan faktor Va, PF3, dan ion kalsium (Escobar, 2002). Trombin memotong fibrinopeptida dari fibrinogen yang larut air menjadi monomer fibrin lalu akhirnya menjadi polimer fibrin yang tidak larut. Perubahan bentuk peptida tersebut meningkatkan densitas darah (Jackson, 1988). Trombin memiliki beberapa peranan. Peranan pertama adalah kembali ke siklus sebelumnya untuk mempercepat aktivasi faktor V dan VIII. Peranan kedua adalah mengubah fibrinogen menjadi monomer fibrin yang masih larut air. Peranan ketiga adalah membuat ikatan silang polimer fibrin dengan mengaktifkan faktor XIII menjadi XIIIa. Peranan trombin yang terakhir adalah sebagai bioregulator hemostasis darah dalam keadaan normal dan patologis (Escobar, 2002; Birhasani, 2010; Chandramin, 1997).

Pada sistem homeostasis normal, setelah terbentuk sumbat trombosit, terdapat regulasi untuk mencegah pembentukan bekuan darah yang berlebihan. Mekanisme kontrol tersebut meliputi aliran darah yang berperan untuk menghilangkan faktor-faktor pembekuan darah yang telah teraktivasi, pembentukan prostasiklin oleh endotelium yang berperan untuk menghambat aktivitas trombosit, aktivasi fibrinolisis untuk menghancurkan bekuan darah dan adanya faktor penghambat bekuan darah. Abnormalitas sistem homeostasis dapat mengakibatkan pendarahan yang berlebihan atau sebaliknya trombosis (Phillips, *et al.*, 2001).

2.1.1 Trombosis

Trombosis adalah keadaan patologis berupa pembentukan bekuan darah (trombus) berlebihan dan abnormal yang menyebabkan terganggunya aliran darah. Trombosis berlebihan dapat disebabkan oleh kelainan genetik dan aterosklerosis. Kelainan genetik yang menyebabkan seseorang menjadi lebih mudah mengalami trombosis antara lain defisiensi zat-zat inhibitor koagulasi intravaskular seperti antitrombin III, protein S dan protein C (Phillips *et al.*, 2001). Aterosklerosis adalah kondisi pembuluh darah arteri yang mengalami penyempitan akibat timbunan kolesterol, debris sel dan matriks jaringan ikat. Timbunan tersebut berkumpul

membentuk plak aterosklerosis. Plak aterosklerosis dapat mengalami ruptur yang menyebabkan luka pada dinding pembuluh darah dan akhirnya memicu terbentuknya trombus. Trombus yang terbentuk dapat menempel pada endotelium pembuluh darah atau terlepas dan ikut aliran darah, embolus. Akumulasi trombus dan embolus pada pembuluh darah mengakibatkan suplai nutrisi dan oksigen ke jaringan terhambat (*iskemi*) dan bahkan kematian jaringan (*infark*). Hambatan aliran darah dan kematian jaringan akan memicu berbagai penyakit yang mematikan seperti, infark miokard akut, stroke iskemik, emboli paru dan trombosis vena dalam yang tergantung lokasi trombus dan embolus yang terakumulasi (Banerjee *et al.*, 2003; Martini, 2006).

Infark miokard akut disebabkan penyumbatan pembuluh darah pada arteri koroner sedangkan stroke iskemik terjadi akibat penyempitan pembuluh darah otak yang menyebabkan kerusakan permanen sel-sel otak. Arteri serebrum tengah merupakan daerah yang paling umum terserang stroke. Penyumbatan embolus pada pembuluh darah pulmonari menyebabkan emboli paru sedangkan trombus yang menyumbat daerah pembuluh darah vena di kaki menyebabkan trombosis vena dalam (Martini, 2006).

Penimbunan bekuan darah yang berlebihan pada pembuluh darah akan menimbulkan gangguan aliran darah seperti berkurangnya suplai oksigen dan nutrisi ke jaringan (*iskemi*) atau bahkan kematian jaringan (*infark*). Keadaan tersebut memicu timbulnya penyakit mematikan seperti infark miokard akut, stroke iskemik, emboli paru dan trombosis vena dalam (Banerjee *et al.*, 2003; Martini, 2006). Berdasarkan data WHO, 17.000 orang meninggal tiap tahunnya akibat penyakit kardiovaskular. Penurunan terapeutik dari kekuatan pembekuan darah (terapi antikoagulan) sangat diperlukan jika terdapat bahaya trombosis, yaitu jika bekuan darah mengancam terjadinya penyumbatan pembuluh darah yang penting (Despopoulos dan Silbernagl, 1998). Terapi untuk penderita trombosis diantaranya dengan operasi yang bertujuan untuk menghilangkan sumbatan atau dengan obat-obat

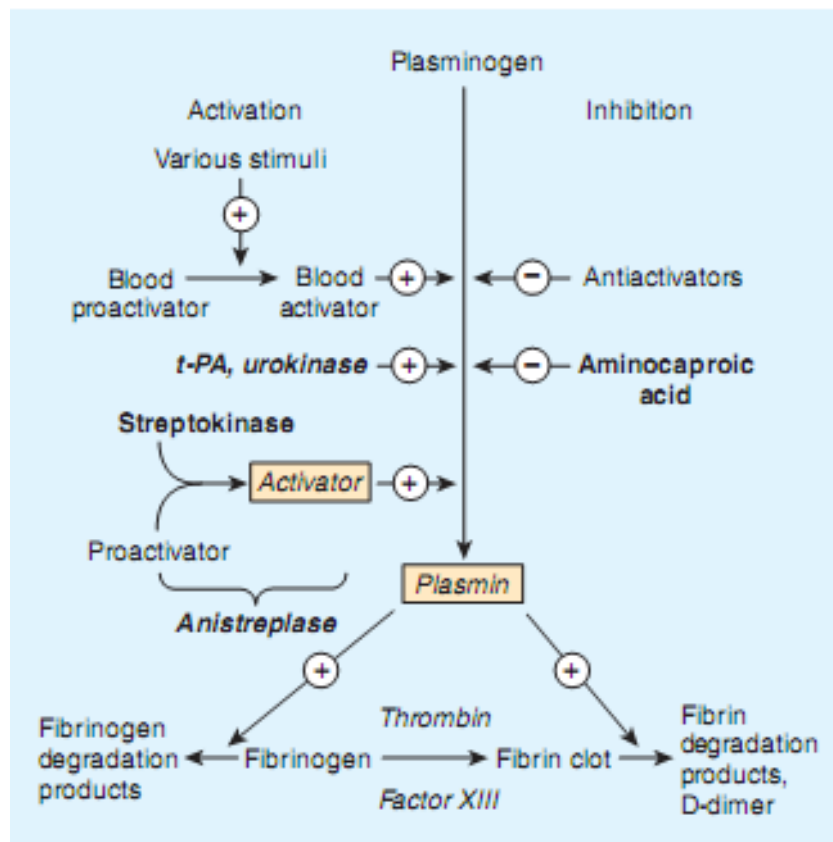
trombolitik yang bekerja dengan cara mendegradasi gumpalan darah (Kunamneni *et al.*, 2006).

2.1.2 Obat Trombolitik

Obat trombolitik adalah obat yang bekerja menghancurkan bekuan darah yang telah terbentuk dengan mengaktifkan plasminogen. Agregat fibrin yang terbentuk dan menyumbat pembuluh darah akan dihancurkan oleh plasmin dan menghasilkan produk degradasi berupa cuplikan-cuplikan protein yang larut air. Obat trombolitik digunakan pada pencegahan penyakit trombosis seperti infark jantung, serebrovaskular, dan emboli paru (Olson, 2004). Obat trombolitik efektif melisiskan trombin jika diberikan secara intravena (Katzung, 2006).

Contoh golongan obat trombolitik yang umum digunakan, antara lain streptokinase, urokinase, anistreplase, dan aktivator plasminogen jaringan. Streptokinase adalah protein ekstraseluler yang disintesis oleh *Streptococcus hemolyticus* yang bergabung dengan plasminogen proaktivator. Urokinase adalah enzim yang disintesis di ginjal manusia dan memiliki kemampuan melisiskan plasmin. Kedua jenis obat ini mengaktifkan plasminogen, terutama plasminogen yang terperangkap di dalam bekuan darah sehingga bekuan darah dapat dihancurkan dari dalam (Katzung, 2006). Anistreplase (streptokinase yang diberi gugus anisol) merupakan obat trombolitik yang terdiri atas plasminogen yang dimurnikan dan streptokinase yang telah diasilasi untuk melindungi sisi aktif enzim. Gugus asil streptokinase segera terhidrolisis, ketika obat disuntikkan secara intravena, dan mengaktifkan streptokinase. Keuntungan obat ini adalah kemampuannya berikatan dengan plasminogen terikat trombin daripada plasminogen bebas dan aktivitas trombolitiknya lebih tinggi (Katzung, 2006). Aktivator plasminogen jaringan (*tissue plasminogen activators/ tPA*) adalah obat yang menyebabkan fibrinolisis hanya pada plasminogen yang terikat pada bekuan darah. Beberapa contoh aktivator plasminogen

jaringan, antara lain alteplase, reteplase, dan tenecteplase. Ketiganya merupakan DNA rekombinan dari t-PA manusia (Katzung, 2006).



Gambar 2.1.2. Proses fibrinolisis (Sumber: Katzung, 2006; Zhao *et al.*, 2007)

Titik kerja obat-obatan secara umum terbagi dalam empat titik utama, yaitu mengaktivasi plasmin, mendegradasi fibrin, mendegradasi fibrinogen, dan mencegah aktivasi fibrinogen menjadi fibrin (Gambar 2.1.2). Sebagai contoh, anistreplase dan streptokinase bekerja mengaktifkan plasmin. Beberapa enzim proteolitik merupakan *like plasmin enzyme* yang bekerja seperti plasmin dalam mendegradasi bekuan fibrin menjadi produk degradasi fibrin yang larut dalam darah (*soluble*). Enzim ini dapat

diuji aktivitasnya menggunakan metode *fibrin plate assay* (Moroz and Gilmore, 2011).

2.2 Enzim Fibrinolitik

2.2.1 Enzim Fibrinolitik dan Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik

Fibrinolisis adalah proses degradasi fibrin secara enzimatis. Proses ini 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, 2002).

Enzim yang mampu mendegradasi fibrin secara spesifik adalah plasmin. Plasmin termasuk dalam kelompok protease serin dan bersirkulasi dalam bentuk inaktifnya, yaitu plasminogen. Plasminogen akan diaktifkan oleh aktivator (*tissue plasminogen activator/ t-PA*) jika terjadi luka pada dinding endotelial. Plasmin dapat mempengaruhi bentuk koagulasi darah dan mengurangi kecepatan pembentukan bekuan trombosit karena kemampuan spesifiknya mendegradasi fibrin (Katzung, 2006).

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin atau fibrinogen. Enzim protease adalah jenis enzim yang dapat menghidrolisis protein menjadi peptida atau asam amino yang lebih sederhana (Jain *et al*, 2005). 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 trombotosis

yang akhirnya mengarah pada berbagai penyakit degeneratif, seperti stroke, aterosklerosis, hipertensi, dan diabetes (Suhartono, 1992).

Protease fibrinolitik yang diperoleh dari mikroorganisme mempunyai kelebihan, yaitu dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktifitasnya mudah ditingkatkan dan mutunya lebih seragam dan harganya lebih murah (Stanbury and Whitaker, 1984; Rao *et al.*, 1998). Hal ini menyebabkan meluasnya penggunaan mikroorganisme sebagai penghasil enzim. Ward (1983) membagi enzim protease mikroorganisme ke dalam 6 kelompok, yaitu aminopeptidase, karboksipeptidase, proteinase serin, proteinase tiol, proteinase asam, dan proteinase metal (metalloproteinase). Aminopeptidase mengkatalisis pemecahan protein pada ujung amina bebasnya, sedangkan karboksipeptidase mengkatalisis pemecahan molekul protein pada ujung karboksil bebasnya.

Protease serin ialah protease yang memiliki residu serin pada sisi aktifnya. Protease seperti tripsin, kimotripsin, elastase, dan subtilisin termasuk ke dalam golongan ini. Protease golongan ini dihambat diisopropil fosfofluoridat (DPF) karena adanya reaksi DPF dengan gugus hidroksil dari residu serin pada sisi aktif.

Protease sulfhidril atau disebut juga protease tiol, pada sisi aktifnya terdapat satu atau lebih residu sulfhidril. Protease sulfhidril dihambat oleh adanya oksidator/alkilator yang memutuskan ikatan S-S, juga karena adanya logam-logam berat yang berikatan grup tiolnya. Enzim protease jenis fisin dan bromelin digolongkan ke dalam golongan ini.

Aktivitas protease logam sangat ditentukan oleh adanya logam sebagai kofaktor enzim, sehingga sering disebut metalloprotease. Metalloprotease merupakan protease yang lazim dihasilkan oleh bakteri. Kehilangan logam pada metalloprotease karena adanya EDTA (senyawa pengkelat logam) akan menyebabkan berkurangnya aktivitas protease tersebut. Pada endopeptidase logam, aktivitas dan kestabilannya ditentukan oleh keberadaan ion Zn^{2+} dan ion Ca^{2+} .

Protease asam merupakan protease yang mempunyai gugus karboksil pada sisi aktifnya. Aktivitas protease asam ini dihambat oleh p-bromofenasil bromida atau pelarut diazo. Enzim-enzim yang termasuk dalam golongan ini antara lain pepsin, renin dan beberapa protease dari kapang yang aktif pada pH 2 sampai pH 4.

Mikroorganisme khususnya bakteri merupakan salah satu sumber agen trombolitik. Streptokinase dari *Streptococcus hemolyticus* dan staphylokinase dari *Staphylococcus aureus* merupakan dua agen trombolitik yang lebih dahulu diketahui efektif untuk terapi trombolitik. *Streptomyces megasporus* SD5, diisolasi dari air panas. Bakteri ini menghasilkan enzim fibrinolitik tahan panas. Dalam perkembangannya telah ditemukan berbagai mikroba yang mampu menghasilkan enzim fibrinolitik seperti nattokinase (NK) yang diperoleh dari *Bacillus natto*, subtilin yang diperoleh dari *Bacillus amyloliquefaciens* (Kim and Choi, 2000; Peng and Zhang, 2002; Sumi *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 2000).

2.2.2 Skrining Enzim Fibrinolitik

a. Pemurnian Enzim

Enzim bekerja sebagai katalis yang mengaktifkan atau mempercepat berbagai reaksi di dalam tubuh dengan menurunkan energi aktivasi. Reaksi-reaksi enzimatik dalam sistem biologis sangat rumit dan sulit untuk mempelajari reaksi suatu jenis enzim secara *in vivo*, maka perlu dilakukan pemurnian enzim dari protein dan metabolit lainnya sehingga dihasilkan produk murni yang hanya mengandung enzim yang akan dipelajari. Enzim yang telah dimurnikan tersebut dapat diamati aktivitasnya dengan jelas secara *in vitro* (Farrell & Ranallo, 2000).

Pemekatan enzim dilakukan untuk memisahkan protein enzim dari molekul lain seperti lipida dan karbohidrat. Molekul kompleks perlu dipecahkan, jika gugus non protein tempat enzim melekat tidak dibutuhkan untuk aktivitas enzim. Metode pemekatan yang sering digunakan adalah presipitasi dengan garam, pelarut organik, dialisis, dan ultrafiltrasi. Pada penelitian ini digunakan membran ultrafiltrasi dengan

cut off 10 kD. Membran ultrafiltrasi lebih kecil pengaruhnya terhadap denaturasi protein dibandingkan presipitasi dengan polietilen glikol ataupun *salting out*. Selain itu pemisahan enzim skala besar lebih menguntungkan melalui membran ultrafiltrasi dibandingkan sentrifugasi karena membutuhkan waktu dan biaya lebih rendah (Lestari *et al.*, 2000). Enzim fibrinolitik diharapkan dapat terpisahkan dengan membran ultrafiltrasi yang berukuran 10 kDa tersebut. Pemekatan menggunakan membran ultrafiltrasi dilakukan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C selama 30 detik hingga 3 menit.

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, 1992).

Ekstrak kasar enzim diperoleh dari pemekatan dengan membran ultrafiltrasi diresuspensi menggunakan buffer. Resuspensi harus dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah kerusakan enzim. Campuran kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm (Campbell dan Farrell, 2006). Untuk mengetahui aktivitas enzim dilakukan pengujian dengan menggunakan *fibrin plate assay* dan dilakukan metode PAGE untuk mengetahui berat molekul proteinnya.

b. Penentuan Berat Molekul Protein Menggunakan Elektroforesis SDS-PAGE

Salah satu metode PAGE yang umumnya digunakan untuk analisa campuran protein secara kualitatif adalah SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Prinsip penggunaan metode ini adalah migrasi komponen akrilamida dengan N.N'bisakrilamida. Kisi-kisi tersebut berfungsi sebagai saringan molekul sehingga konsentrasi atau rasio akrilamid dengan bisakrilamid dapat diatur

untuk mengoptimalkan kondisi migrasi komponen protein. Metode ini sering digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein disamping untuk memonitor pemurnian protein (Wilson dan Walker, 2000). SDS-PAGE dilakukan terhadap protein tak larut dengan kekuatan ion rendah dan dapat menentukan apakah suatu protein termasuk monomerik atau oligomerik, menetapkan berat molekul dan jumlah rantai polipeptida sebagai subunit atau monomer (Durrani *et al.*, 2008).

Penggunaan SDS-PAGE bertujuan untuk memberikan muatan negatif pada protein yang dianalisa. Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut (Dunn, 1989). Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung -merkaptoetanol (berfungsi untuk mereduksi ikatan disulfide), gliserol dan SDS (Wilson dan Walker, 2000). Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat sehingga kompleks protein-SDS memiliki rasio muatan per berat molekul yang konstan (Hames, 1987).

Sampel-sampel enzim yang diinjeksikan kedalam sumur gel diberi warna dengan bromphenol biru yang dapat terionisasi. Fungsi pewarna adalah untuk memonitor jalannya elektroforesis. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan Rf protein dengan protein standar yang berat molekulnya telah diketahui (Wilson dan Walker, 2000).

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 Mei 2012 sampai Desember 2012.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat utama yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu cawan petri, jarum ose, pinset, tabung reaksi, *beaker glass*, *Erlenmeyer glass*, gelas ukur, gelas bunsen, lampu bunsen, membran cakram, tabung mikrosentrifuge 0,5 ml, *microtube* 1,5 ml, *microtube* 1000 μ l, *ependorf stander*, membran ultrafiltrasi Spin X 500 MWCO 10 kDa, *magnetic stirrer*, mikropipet (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), mikrotip (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l), pH meter, vorteks, neraca analitik, sentrifuge, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF), spektrofotometer, inkubator 37°C, inkubator suhu 45-65°C, inkubator *shaker*, autoklaf, lemari es 4°C, *freezer* -20°C dan -80°C, oven, *hotplate stirrer* dan elektroforesis protein.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi 15 isolat bakteri koleksi Kartika Senjarini yang berasal dari sampel perairan pantai Bandalit Kabupaten Jember (BA 011109, BA 041109*, BA 091109, BA 061109, BA 051109, BA 131109, BA 698, BA 698*, BA 9916, BA 694, BA 6912, BA 011109*, BA 071109, BA 9918, BA 9920), media *Nutrient Agar* (NA), media *Nutrient Broth* (NB), media *Skim Milk Agar* (SMA), media *Luria Bertani Broth* (LB), media fibrin, gliserol, akuadest, akuabidest, *Bovine Serum Albumine* (BSA), pereaksi Bradford, *formaldehyde* 10%, metanol, alkohol 70%, penanda protein (*protein markers*), buffer sampel, buffer PBS 50 mM pH 7,4, buffer Tris HCl 1,5 M (pH 8,8), buffer Tris HCl

0,5 M (pH 6,8), buffer elektroda, larutan pewarna (*staining*) dan larutan peluntur (*destaining*). Komposisi bahan kimia untuk pembuatan media ditunjukkan pada Lampiran C.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan dan pemurnian isolat dilakukan dengan cara mengambil 1 ose biakan bakteri asal perairan Pantai Bandalit yang telah disimpan pada 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. Setelah diperoleh *single colony*, disimpan dalam refrigerator (4°C). *Single colony* yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk skrining aktivitas proteolitik dan aktivitas fibrinolitik.

3.3.2 Skrining Aktivitas Proteolitik

Isolat bakteri yang telah diremajakan dan diperoleh *single colony*, ditanam pada media *Skim Milk Agar* (SMA) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Bakteri yang menghasilkan enzim proteolitik secara ekstraselular adalah bakteri yang menimbulkan zona bening di sekitar koloni. Aktivitas proteolitik isolat ditentukan dengan membandingkan diameter zona bening dengan diameter koloni. Aktivitas proteolitik ditentukan dengan cara menghitung indeks aktivitas enzim berdasarkan rumus:

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

Isolat yang memiliki aktivitas proteolitik dilanjutkan ke tahapan selanjutnya.

3.3.3 Skrining Aktivitas Fibrinolitik

Isolat bakteri yang memberikan hasil positif pada uji proteolitik, selanjutnya ditanam pada media untuk skrining aktivitas fibrinolitik. Kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik adalah bakteri yang memiliki zona bening di sekitar koloni, kemudian dihitung indeks aktivitas enzimnya dengan rumus yang sama pada pengukuran aktivitas proteolitik (3.3.2).

3.3.4 Produksi Ekstrak Kasar Protein

Produksi ekstrak kasar protein dilakukan pada 1 isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi. Sebelum dilakukan produksi ekstrak kasar protein, isolat bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik terlebih dahulu ditumbuhkan untuk melihat pertumbuhan bakteri dengan cara membuat kurva pertumbuhan. Satu ose koloni tunggal ditumbuhkan pada 10 ml media LB (sebagai starter) dan diinkubasi *shaker* pada suhu 30 °C selama 18 jam. Kemudian 500 µl starter ditumbuhkan pada 50 ml media LB. Selanjutnya setiap 12 jam, isolat bakteri difiksasi dengan mengambil 900 µl kultur dimasukkan kedalam *microtube* 1,5 ml kemudian ditambahkan 100 µl *formaldehyde*. Jumlah bakteri dihitung dengan menggunakan haemocytometer sampai jam ke-48. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri berdasarkan rumus:

$$\mu = \frac{\lg N_t - N_0}{\lg e(t - t_0)} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

$$N_t = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Keterangan :

T= waktu ke t

N_0 = Jumlah sel pada waktu t_0

μ = kecepatan pertumbuhan

t_0 = waktu ke 0

N_t = Jumlah sel pada waktu ke t

Analisis untuk mendapatkan kurva dilakukan dengan menggunakan aplikasi SOLVER pada program *microsoft office excel* 2003 (Heuser dalam Senjarini, 2007).

Produksi ekstrak kasar protein dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 ose biakan bakteri yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi, dipindahkan dari *working plate* (media NA) kedalam 5 mL media LB sebagai starter, dan diinkubasi dalam shaker pada suhu 30°C selama 18 jam. Pembuatan kultur starter sebelum produksi enzim bertujuan untuk memperbanyak sel yang seragam dengan umur fase pertumbuhan yang sama (Kurakake *et al.*, 2000). Kemudian 250 µl starter ditumbuhkan pada 10 ml LB dan diinkubasi dalam shaker pada suhu 30°C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh kemudian dilakukan pemanenan dengan cara sentrifugasi pada 10.000 rpm dan suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar protein. Ekstrak kasar protein dianalisis konsentrasi proteinnya.

3.3.5 Pemekatan Protein

Protein dari ekstrak kasar protein dipekatkan menggunakan membran ultrafiltrasi dengan *cut off* 10 kDa. Sebanyak 100 µl ekstrak kasar protein dimasukkan kedalam membran ultrafiltrasi dan disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4°C selama rentang waktu 30 detik hingga 3 menit. Pemekatan dilakukan secara berulang-ulang dengan menambahkan 100 µl ekstrak kasar protein hingga protein terpekatkan, yang ditandai dengan tidak adanya lagi cairan yang lolos dari membran. Membran ultrafiltrasi dapat digunakan secara berulang-ulang pada satu sampel yang sama. Hasil pemekatan didapatkan 2 fase yaitu fase atas (*retentate*) yang merupakan protein yang tertahan pada membran, dan fase bawah (*permeate*) yang merupakan sisa media dan protein yang berukuran < 10 kDa. Fase atas (*retentate*) hasil pemekatan diresuspensi dengan buffer PBS 50 mM pH 7,4. Selanjutnya dilakukan analisis konsentrasi protein dan uji *fibrin plate assay*.

3.3.6 Analisis Konsentrasi Protein

Konsentrasi protein ditentukan dengan metode Bradford yang menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar (Bollag, 1996). Sebanyak 5 µl sampel ekstrak kasar protein diencerkan dengan 95 µl akuadest steril, ditambahkan ke dalam 900 µl pewarna Bradford dan diukur absorbannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah akuadest steril yang ditambahkan dengan pewarna Bradford. Absorban larutan sampel diplotkan pada kurva standar yang diperoleh dari plot larutan standar sehingga didapatkan 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 akuadest sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 1000 µl/ml. Larutan stok tersebut kemudian diencerkan dengan cara melarutkannya kedalam akuadest steril dengan perbandingan 1:9. Larutan stok tersebut dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 0, 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 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. 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.

3.3.7 Analisis Aktivitas Fibrinolitik

Ekstrak kasar protein, *rentetate* dan *permeate* yang diperoleh dari hasil pemekatan dengan membran filter selanjutnya dianalisis aktivitas fibrinolitiknya menggunakan modifikasi metode *fibrin plate assay* (Astrup dan Mullertz, 1952; Choi *et al.*, 2005). Sebanyak 20 µl larutan trombin dipipet kedalam cawan petri yang berisi

4 ml larutan bacto agar dan 1 ml fibrinogen bebas plasminogen. Campuran didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga terbentuk lapisan benang-benang fibrin berwarna putih.

Sebanyak 5 µl ekstrak kasar protein, *retentate* dan *permeate*, masing-masing diteteskan pada membran cakram yang telah diletakkan diatas campuran media. Cawan petri diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 jam. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekeliling membran. Pengukuran diameter setiap zona bening dilakukan sebanyak tiga kali.

3.3.8 Pengukuran Berat Molekul Protein

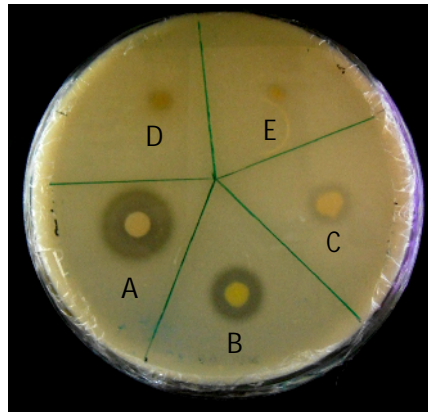
Berat molekul protein dianalisis dengan menggunakan metode SDS-PAGE (Bollag, 1991). Konsentrasi akrilamida yang digunakan pada gel pemisah (*separating*) adalah sebesar 12% dan dilarutkan dalam bufer 1,5 M Tris pH 8,8. Gel dicetak dan dibiarkan mengeras, kemudian ditambahkan gel penahan (*stacking*). Gel penahan mengandung 4% akrilamida yang dilarutkan dalam buffer 0,5 M Tris pH 6,8. Gel dibiarkan mengeras dan siap digunakan untuk elektroforesis. Sebanyak 16 µl sampel ditambahkan dengan 4 µl buffer sampel yang mengandung -merkaptotanol, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel sebanyak 20 µl. Sebanyak 8 µl penanda protein dimasukkan ke dalam sumuran gel. Gel kemudian dialiri listrik pada tegangan 100 V selama 150 menit.

Gel yang telah dielektroforesis kemudian diwarnai (*staining*) dengan larutan pewarna selama minimal 6 jam. Warna biru yang berlebihan akibat pewarnaan kemudian dicuci beberapa kali (*destaining*) hingga didapatkan pita protein berwarna biru dengan latar gel yang tidak berwarna. Kemudian pita-pita protein yang terbentuk dihitung berat molekulnya, dengan membandingkan jarak migrasi protein penanda dengan protein sampel melalui persamaan regresi (Durrani *et al.*, 2008).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Skrining Proteolitik Isolat Bakteri Pantai Bandalit Kabupaten Jember

Sebanyak 15 isolat bakteri asal perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember telah dimurnikan dan diuji aktivitas proteolitiknya pada media *Skim Milk Agar* (SMA). Penelitian Herawati (2010) menunjukkan bahwa isolat bakteri Pantai Bandalit memiliki morfologi makroskopis dan mikroskopis yang berbeda. Karakter morfologi isolat bakteri ditunjukkan pada Lampiran D. 15 isolat bakteri asal perairan Pantai Bandalit Kabupaten Jember ini seluruhnya memiliki morfologi sel berbentuk kokus dan merupakan Gram Negatif.



A. BA 9920; B. BA 9916; C. BA 071109*; D. BA 091109; E. BA 011109*

Gambar 4.1 Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri BA pada media *Skim Milk Agar* (SMA).

Isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni. Aktivitas proteolitik isolat bakteri Pantai Bandalit dapat dilihat pada Gambar 4.1. Susu skim yang ditambahkan dalam media SMA mengandung kasein yang berfungsi sebagai substrat enzim. Hidrolisis kasein

digunakan untuk memperlihatkan aktivitas hidrolitik protease. Protease mengkatalisis degradasi kasein yaitu dengan memutuskan ikatan peptida CO-NH dengan masuknya air ke dalam molekul. Reaksi tersebut akan melepaskan asam amino. Setelah inokulasi dan inkubasi kultur *plate* agar, bakteri mensekresikan protease. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri yang tumbuh (Naiola & Widyastuti, 2002).

Enzim proteolitik mikroorganisme dapat ditemukan dalam sel (intraseluler), pada dinding sel (periplasma), atau disekresikan ke medium (ekstraseluler) (Hoffman *et al.*, 2000). Enzim ekstraseluler adalah enzim yang disekresikan ke luar sel melalui membran sel. Enzim ini disintesis dalam bentuk prekursor kemudian dibebaskan dalam bentuk aktif melalui proses proteolisis. Bagian peptida yang dilepaskan biasanya bersifat hidrofobik (Suhartono, 1992). Enzim ekstraseluler berperan penting bagi transformasi materi kimia di danau dan lautan. Enzim ekstraseluler yang berasal dari bakteri, tumbuhan dan hewan laut berada bebas dalam air laut (Kreps dalam Senjarini, 2007).

Tabel 4.1 Hasil Skrining Proteolitik Isolat Bakteri Pantai Bandealet

Isolat Bakteri	Rata-rata Diameter Zona Bening (mm)	Rata-rata Diameter Koloni (mm)	Indeks Aktivitas Enzim (IAE)	Keterangan
BA 9920	32	6	5,3	+
BA 091109	16	6	2,6	+
BA 9916	13	5	2,6	+
BA 071109	9	6	1,5	+
BA 011109*	7	5	1,4	+
BA 011109	8	6	1,3	+
BA 131109	9	7	1,28	+
BA 698*	15	13	1,15	+
BA 698	11	10	1,1	+
BA 9918	10	9	1,1	+
BA 694	4	4	1	-
BA 6912	2	2	1	-
BA 061109	2	2	1	-
BA 051109	5	5	1	-
BA 041109*	10	10	1	-

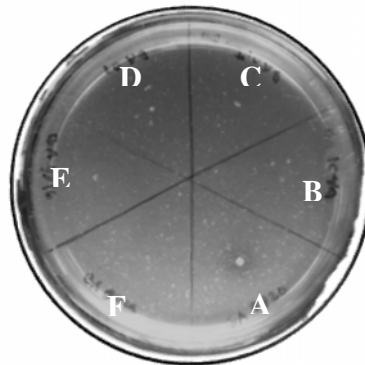
(+) = positif proteolitik

(-) = negatif proteolitik

Hasil skrining proteolitik ditunjukkan pada Tabel 4.1. Pada tabel tersebut, hasil skrining proteolitik diperoleh 10 isolat yang memiliki aktivitas proteolitik dengan indeks aktivitas enzim > 1 . Isolat bakteri yang memiliki indeks aktivitas proteolitik tertinggi adalah BA 9920 dengan indeks aktivitas enzim sebesar 5,3. Indeks aktivitas enzim pada skrining proteolitik dalam penelitian ini lebih besar jika dibandingkan dengan hasil penelitian Mahdiyah (2012) yang indeks aktivitas enzim proteolitiknya sebesar 3,0, sehingga dapat diduga bahwa isolat bakteri BA 9920 memiliki potensi besar untuk dapat dimanfaatkan sebagai penghasil enzim protease.

4.2 Skrining Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandalit Kabupaten Jember

4.2.1 Aktivitas Fibrinolitik Isolat Bakteri Pantai Bandalit



BA 9920; B. BA 011109*; C. BA 011109; D. BA 071109; E. BA 9916; F. BA 091109

Gambar 4.2.1 Aktivitas fibrinolitik isolat bakteri BA pada media *fibrin plate*

Sepuluh isolat yang positif memiliki aktivitas proteolitik, diuji aktivitas fibrinolitiknya menggunakan metode *fibrin plate assay*. Metode *fibrin plate assay* ini menggunakan campuran fibrinogen dan trombin yang dilarutkan dalam media agar. Metode ini sangat spesifik terhadap fibrinolisis (Pan, *et al.* 2010; Choi *et al.*, 2005). Hasil penelitian yang ditunjukkan oleh Gambar 4.2.1 memperlihatkan hanya isolat bakteri BA 9920 yang mampu mendegradasi substrat fibrin, yang ditunjukkan dengan

terbentuknya zona bening di sekitar koloni, sedangkan 14 isolat yang lain tidak membentuk zona bening di sekitar koloni. Menurut Milner dan Makise (2002), semakin besar dan jelas zona yang terbentuk, menunjukkan bahwa semakin banyak fibrin yang terdegradasi.

Tabel 4.2.1 Hasil skrining fibrinolitik isolat bakteri Pantai Bandalit Kabupaten Jember

Isolat Bakteri	Rata-rata Diameter Zona Bening (mm)	Rata-rata Diameter Koloni (mm)	Indeks Aktivitas Enzim (IAE)	Keterangan
BA 9920	2,5	1	2,5	+
BA 091109	0	0	0	-
BA 9916	0	0	0	-
BA 071109	1	1	1	-
BA 011109*	1	1	1	-
BA 011109	1	1	1	-
BA 131109	1	1	1	-
BA 698*	1	1	1	-
BA 698	1	1	1	-
BA 9918	1	1	1	-
BA 694	1	1	1	-
BA 6912	1	1	1	-
BA 061109	1	1	1	-
BA 051109	1	1	1	-
BA 041109*				

(+) = positif fibrinolitik

(-) = negatif fibrinolitik

Aktivitas fibrinolitik yang dimiliki oleh isolat BA 9920 ditunjukkan dengan indeks aktivitas proteolitik yang cukup tinggi sebesar 2,5. Isolat lainnya tidak memiliki aktivitas fibrinolitik namun memiliki aktivitas proteolitik (Tabel 4.1). Isolat BA 091109 dan BA 9916 memiliki indeks aktivitas enzim proteolitik yang cukup tinggi, namun tidak dapat tumbuh pada media fibrin. Dapat diduga bahwa isolat tersebut memiliki potensi proteolitik yang lain, selain pendegradasian fibrin.

Isolat bakteri BA 9920 memiliki indeks aktivitas enzim proteolitik sebesar 5,3 (Tabel 4.1) dan indeks aktivitas enzim fibrinolitik sebesar 2,5 (Tabel 4.2.1), hal ini menunjukkan adanya perbedaan aktivitas enzim. Perbedaan aktivitas proteolitik dan fibrinolitik dalam menghidrolisis substrat protein diduga disebabkan oleh perbedaan

jumlah ikatan peptida atau besarnya molekul protein substrat. Jumlah total ikatan peptida dari masing-masing substrat berbeda, sehingga akan berpengaruh terhadap derajat hidrolisis suatu enzim dalam memecah substrat (Nielsen, 2001). Perbedaan aktivitas hidrolisis diduga juga dipengaruhi oleh spesifitas protease dalam menghidrolisis substrat. Menurut Fox (1991), spesifitas enzim protease berbeda-beda dalam menghidrolisis ikatan peptida dalam molekul protein. Beberapa enzim protease memiliki karakteristik khusus untuk aktivitas proteolitiknya. Semakin spesifik suatu enzim, semakin sedikit jumlah ikatan peptida yang mampu dihidrolisis (Whitaker, 1994).

4.2.2 Produksi dan Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Kasar Protein

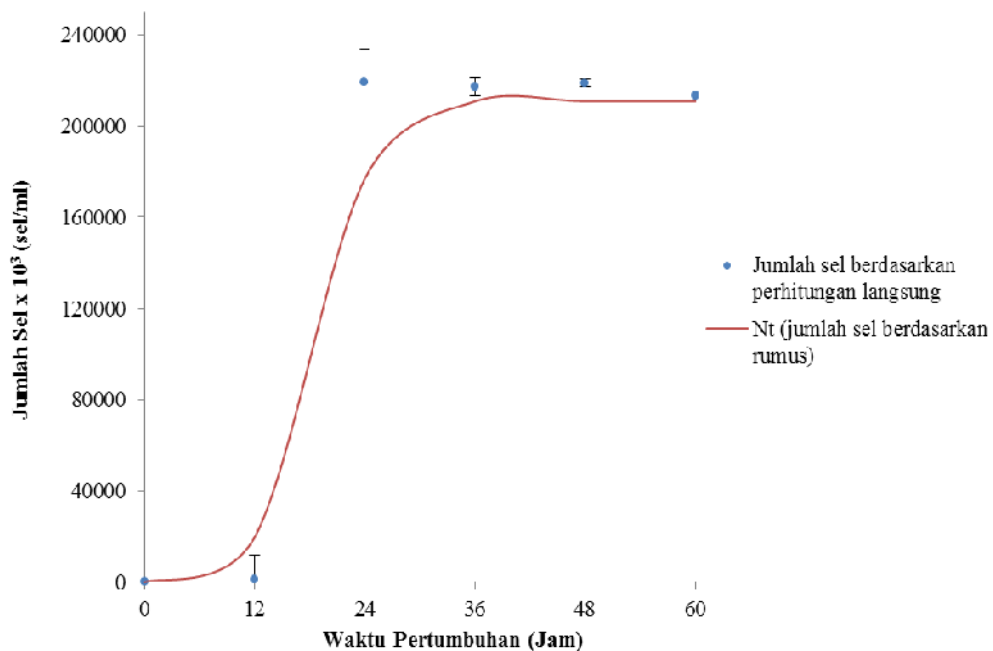
a. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri BA 9920

Produksi ekstrak kasar protease fibrinolitik dari isolat bakteri didahului dengan membuat kurva pertumbuhan. Pembuatan kurva pertumbuhan ini untuk menentukan fase pertumbuhan eksponensial (fase log) bakteri untuk memproduksi ekstrak kasar protein.

Gambar 4.2.2a dan Lampiran E menunjukkan bahwa isolat bakteri BA 9920 menunjukkan fase adaptasi sampai 12 jam dengan jumlah sel bakteri pada jam ke-0 sebanyak $76,7 \times 10^5$ sel/ml. Pada fase adaptasi, populasi bakteri belum mengalami pertumbuhan yang berarti karena baru saja menyesuaikan dalam medium yang baru (*fresh medium*). Hal tersebut menyebabkan sel belum dapat melakukan reproduksi atau pembelahan, tetapi masih beradaptasi dengan medium atau lingkungan barunya. Pada fase adaptasi ini memungkinkan terjadinya penambahan ukuran sel, tetapi bukan pada jumlah selnya (Astuti dan Rahmawati, 2010).

Isolat bakteri BA 9920 memasuki fase log pada jam ke-12 dengan jumlah sel mencapai $10,3 \times 10^7$ sel/ml sampai jam ke-24 dengan jumlah sel tertinggi mencapai $21,9 \times 10^7$ sel/ml. Pada fase log, populasi sudah mulai beradaptasi dengan medium dan dapat melakukan proses pembelahan sel (*binary fission*) (Astuti dan Rahmawati,

2010). Pertumbuhan bakteri yang sangat cepat pada fase log menunjukkan bahwa pada saat fase log bakteri memiliki aktivitas yang tinggi dan metabolisme yang terbaik (Senjarini, 2007). Fase log pada kurva pertumbuhan bakteri menjadi dasar untuk menguji aktivitas metabolisme bakteri dalam menghasilkan enzim untuk mendegradasi substrat.



Gambar 4.2.2a Kurva pertumbuhan isolat bakteri BA 9920 selama 60 jam

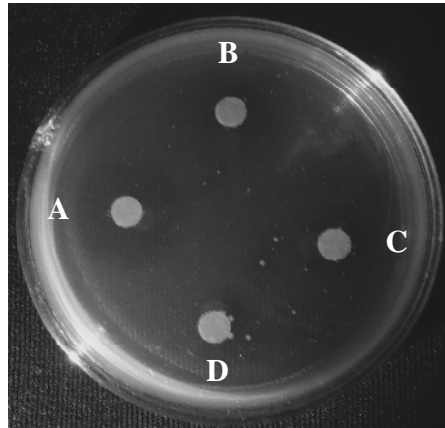
Pada penelitian ini produksi ekstrak kasar protein dari isolat bakteri BA 9920 dilakukan pada waktu mendekati puncak fase log yaitu jam ke-24. Produksi enzim yang dilakukan pada waktu tersebut, diharapkan bakteri mencapai aktivitas metabolisme tertinggi dan jumlah enzim yang didapatkan juga lebih tinggi, sehingga pendegradasian substrat fibrin yang terdapat pada media fibrin lebih maksimal. Waktu yang terlalu singkat akan menghasilkan enzim yang tidak optimal akibat mikroba belum beradaptasi dengan lingkungannya. Waktu yang terlalu lama akan

menyebabkan enzim mengalami inhibisi akibat menumpuknya produk reaksi enzim dengan substrat. Jumlah bakteri yang semakin meningkat dari hari ke hari akan membutuhkan nutrisi yang semakin banyak. Nutrisi yang berbentuk polimer tidak dapat memasuki sel bakteri karena ukuran fisiknya. Polimer ini biasanya dicerna terlebih dahulu oleh enzim-enzim ekstraseluler yang disekresikan oleh bakteri (Suhartono, 1992).

b. Produksi dan Uji Aktivitas Fibrinolitik

Ekstrak kasar protein hasil dari produksi selama waktu 24 jam, dipurifikasi dengan menggunakan membran ultrafiltrasi Spin X MWCO 10 kDa, sehingga didapatkan *retentate* dan *permeate*. Hasil pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode Bradford menunjukkan konsentrasi protein pada *retentate* sebesar 0,00431 mg/ml, *permeate* sebesar 0,00133 mg/ml dan ekstrak kasar protein sebesar 0,00064 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi protein pada *retentate* lebih tinggi dibandingkan pada *permeate* dan ekstrak kasar protein.

Hasil pengujian dengan *fibrin plate assay* (Gambar 4.2.2) menunjukkan aktivitas fibrinolitik 5 μ l *retentate* lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar protein dan *permeate*. Indeks aktivitas enzim pada *retentate* sebesar 2,3, pada ekstrak kasar protein hanya sebesar 1,7 sedangkan *permeate* tidak menunjukkan adanya aktivitas fibrinolitik. *Retentate* memiliki aktivitas fibrinolitik lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar protein disebabkan karena konsentrasi protein *retentate* 8x lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar protein. *Permeate* tidak menunjukkan aktivitas fibrinolitik dikarenakan ukuran molekul proteinnya < 10 kDa.



A. Dialisat; B. Fase Atas (*Retentate*) hasil Pemekatan dengan Membran Ultrafiltrasi; C. Ekstrak Kasar Protein; D. Fase Bawah (*Permeate*) hasil Pemekatan dengan Membran Ultrafiltrasi

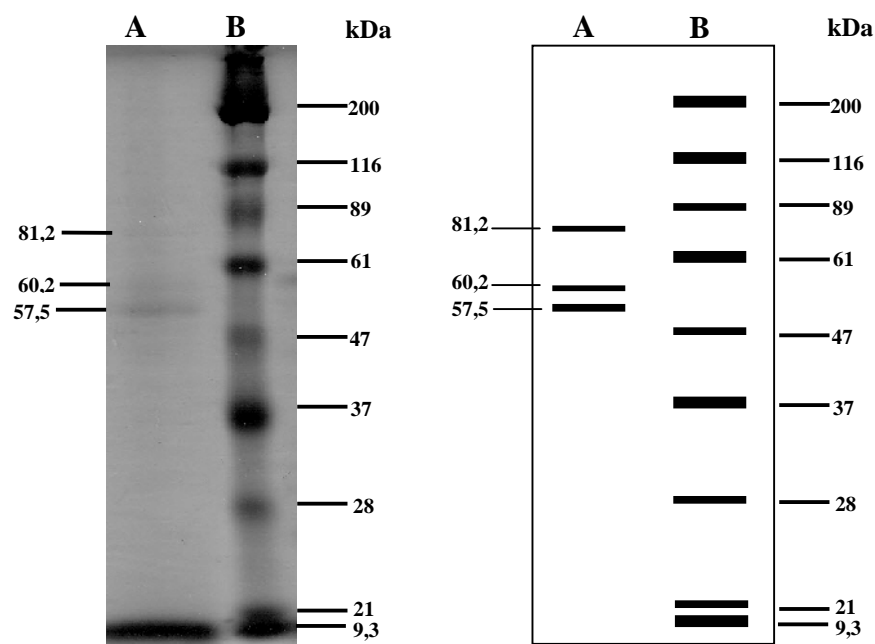
Gambar 4.2.2b Aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar protein isolat bakteri BA pada media *fibrin plate*

4.3 Pengukuran Berat Molekul Protein *Retentate*

Berdasarkan hasil elektroforesis SDS-PAGE (Gambar 4.3), diperoleh 3 pita protein. 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 pita 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 (Sajuthi *et al.*, 2010).

Pada mekanisme SDS-PAGE, protein bereaksi dengan SDS yang merupakan deterjen anionik membentuk kompleks yang bermuatan negatif. Protein akan terdenaturasi dan terlarut membentuk kompleks berikatan dengan SDS, berbentuk elips atau batang, dan berukuran sebanding dengan berat molekul protein. Protein

dalam bentuk kompleks yang bermuatan negatif ini terpisahkan berdasarkan muatan dan ukurannya secara elektroforesis di dalam matriks gel poliakrilamid. Berat molekul protein dapat diukur dengan menggunakan protein standar yang telah diketahui berat molekulnya (Angky, 2011). Penentuan berat molekul protein sampel dilakukan dengan mensubstitusi jarak migrasi sampel kedalam kurva regresi berdasarkan log berat molekul penanda protein (*protein markers*). Berdasarkan hasil elektroforesis dari fase atas (*retentate*), didapatkan 3 pita protein dengan berat molekul 57,5 kDa, 60,2 kDa, dan 81,2 kDa (Lampiran G).



A. *Retentate* hasil pemekatan dengan membran ultrafiltrasi; B. Penanda protein (*Protein Markers*)

Gambar 4.3 Berat molekul protein *Retentate* berdasarkan SDS-PAGE

Pita protein yang didapat dari hasil elektroforesis ini menunjukkan pita yang tipis, diduga karena konsentrasi protein pada *retentate* sangat rendah. Konsentrasi protein berpengaruh pada ketebalan pita protein pada hasil elektroforesis. Tebal

tipisnya pita protein yang terbentuk pada hasil elektroforesis menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sesuai dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Sudarmadji, 1996).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil skrining proteolitik dan fibrinolitik didapatkan 10 isolat yang memiliki aktivitas proteolitik dengan indeks aktivitas enzim tertinggi sebesar 5,3 dan hanya 1 isolat yang memiliki aktivitas fibrinolitik yaitu isolat bakteri BA 9920 dengan indeks aktivitas enzim sebesar 2,5.
2. Kurva pertumbuhan isolat bakteri BA 9920 mencapai fase log (24 jam) dengan jumlah sel $21,9 \times 10^7$ sel/ml.
3. Ekstrak kasar protein dipekatkan dengan membran ultrafiltrasi *cut off* 10 kDa, didapatkan konsentrasi protein *retentate* (0,00431 mg/ml) lebih tinggi dari *permeate* (0,00133 mg/ml) dan ekstrak kasar protein (0,00064 mg/ml).
4. *Retentate* sebanyak 5 μ l menunjukkan indeks aktivitas enzim fibrinolitik sebesar 1,7.
5. Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari *retentate* didapatkan 3 pita protein dengan berat molekul protein \pm 57,5 kDa, 60,2 kDa, dan 81,2 kDa.

5.2 Saran

Penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya dan dapat dilanjutkan dengan uji stabilitas enzim pada berbagai suhu dan pH. Penentuan berat molekul protein spesifik fibrinolitik dapat dilakukan dengan metode zimografi menggunakan Native-PAGE.

DAFTAR PUSTAKA

Buku

- Bell, A. 2002. Morphology of Human Blood and Marrow Cells: Hematopoiesis. Dalam Harmening D.M. (Ed). *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. (Edisi Keempat). Philadelphia: FA Davis.
- Bollag, D. M., Michael D. R., & Stuart J. E. 1996. *Protein Methods*. Second Edition. New York: Willey-Liss.
- Campbell, M. K. and Farrell, S. O. 2006. *Biochemistry*. Fifth Edition. California: Thomson Learning.
- Despopoulos, A. dan S. Silbernagl. *Atlas Berwarna dan Teks Fisiologi*. Terjemahan oleh Yunita Handojo. (Edisi Keempat). 1998. Jakarta: Hipokrates.
- Dunn, M. J. 1989. *Determination of Total Protein Concentration*. Oxford: IRL Press.
- Escobar, C. E. 2002. Introduction to Hemostasis. Dalam Harmening D. M. (Ed). *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. (Edisi Keempat). Philadelphia: FA Davis.
- Farrell, S. O. and Ranallo R. T. 2000. *Experiments in Biochemistry: A Hands-on Approach*. California: Thomson Learning.
- Fox, P. F. 1991. *Food Enzymology*. New York: Elsevier Applied Science.
- Hames, B. D. 1987. *Biochemistry: The Instant Notess*. Second Edition. Hongkong: Springer Verlag.
- Herawati. 2010. *Diversitas Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai Bandialit Jember berdasarkan BOX-PCR dan Biolog GN2 Microplate*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Hoffbrand, A.V., Moss P.A.H. & Pettit J.E. 2006. *Essential Haematology*. Fifth Edition. Oxford: Blackwell.

- Jackson, C. M. 1988. The Mamalian Blood Coagulation System. Dalam Bergmeyer H.U. (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. (Edisi Ketiga). Weinheim: VCH.
- Jain J.L., Jain S., & Jain N. 2005. *Fundamentals of Biochemistry*. (Edisi Keenam). New Delhi: S Chand.
- Katzung, B. G. 2006. *Basic and Clinical Pharmacology*. (Edisi Kesepuluh). San Fransisco: McGraw-Hill.
- Martini, F. H. 2006. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. San Fransisco: Benjamin Cummings.
- Meyrach and Volavsec U. 1975. *Production of Microbial Enzyme In Food Processing*. New York: Academic Press.
- Milner, M. dan K. Makise. 2002. *Natto and Its Active Ingredient Nattokinase: A Potent and Safe Thrombolytic Agent. Alternative and Complementary Therapies*. New York: Mary Ann Liebert Inc.
- Nielsen, P. M. 2001. *Food Proteins and Their Applications*. New York: Marcel Decker.
- Olson, J. *Belajar Mudah Farmakologi*. Terjemahan oleh Chandranata L. 2004. Jakarta: EGC.
- Phillip, J., Murray P. & Kirk P. 2001. *The Biology of Disease*. Second Edition. hlm 142-155.
- Scopes, R. K. 1987. *Protein Purification*. New York: Springer-Verlag.
- Smith, C. M., Marks A. D., Lieberman M. A. 2004. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. (Edisi Kedua). Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins.
- Stanbury, W. F, and Whitaker, A. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press, Ltd.
- Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. (Edisi Pertama). Yogyakarta: Liberty.

Suhartono, M. T. 1992. *Enzim & Bioteknologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB.

Whitaker, J. R. 1994. *Principle of Enzymology for The Food Science*. Second Edition. New York: Marcel Decker.

Tidak Diterbitkan

Angky, A. 2011. Karakterisasi Aktivitas Dialisat Enzim Protease Fibrinolitik dari Cacing Tanah (*Eisenia foetida*) galur lokal. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Astuti dan Ana R. Asimilasi Kolesterol dan Dekonjugasi Garam Empedu oleh Bakteri Asam Laktat (BAL) dari Limbah Kotoran Ayam Secara in Vitro. Tidak Diterbitkan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA*. Yogyakarta, 15 Mei 2010. Yogyakarta: Jurusan Pendidikan Biologi FMIPA UNY.

Birhasani. 2010. Kadar D-Dimer Plasma pada Penderita Sindrom Koroner Akut dengan Derajat Stenosis Berbeda. Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.

Senjarini, Kartika. 2007. *Diagnosis of Natural Bacterial Assemblages: Application of Fluorescence Markers for The Analysis of Hidrolytic Enzyme Activity in Aquatic Environments*. Tidak Diterbitkan. Disertasi. Rostock: der Universitat Rostock.

Terbitan Berkala

Astrup, T. dan S. Mullertz. 1952. The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* (40): 346-351.

Banerjee, A. and Chisti Y. 2003. Streptokinase-A Clinicslly Useful Trombolytic Agent. *J. Biotech.* 2: 287-307.

Chandramin. 1997. Sistem Pembekuan dan Fibrinolitik. *J. Kardiologi Indonesia*. 22 (2): 116-117.

Chang, C. T., Fan M. H., Kuo F. C., & Sung H. Y. 2000. Potent Fibrinolytic Enzyme from A Mutant of *Bacillus Subtilis* IMR-NKI. *Agri. Food. Chem.* (48): 3210-3216.

- Choi, N. S., J. H. Hahm, P. J. Maeng and S. H. Kim. 2005. Comparative Study of Enzyme Activity and Stability of Bovine and Human Plasmins in Electrophoretic Reagents, β -mercaptoethanol, DDT, SDS, Triton X-100, and Urea. *J. Biochem. & Mol. Bio.* 38 (2): 177-181.
- Durrani, R., M. Abubakar, M. J. Arshed, Shamim S., Irfan U. and Qurban A. 2008. Biological Characterization and Protein Profiles of Two Model Bacteria by SDS-PAGE and FT-IR. *J. Agri. & Bio. Sci.* 3 (5&6): 7.
- Hoffman, M. dan Decho W. A. 2000. Proteolytic Enzyme in the Marine Bacterium *Pseudoaeromonas atlantica*: Post-secretional Activation and Effects of Environmental Conditions. *Aquatic. Mic. Ecol.* (23):29-39.
- Kim, S. H. dan Choi N. S. 2000. Purification and Characterization of Subtilisin DJ-4 Secreted by *Bacillus* sp. Strain DJ-4 Screened from Doen-Jang. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (64): 1722-1725.
- Kunamneni, A., Abdelghani T. T. A. & Ellaiah. P. 2007. Streptokinase-The Drug of Choice for Thrombolytic Therapy. *J. Thromb.* (23): 9-23.
- Kurakake, M., Shou Y., Nakagawa K., Sugihara M., Komaki T. 2000. Properties of Chitinase from *Bacillus cereus* S1. *Curr. Microbiol.* (40): 6-9.
- Lestari, P., Nur R., dan Untung M. 2000. Pemurnian α -Amilase *Bacillus stearothermophilus* dengan Membran Ultrafiltrasi. *J. Mikro. Indonesia.* 5 (1).
- Mahdiyah, D., Aris T. W. & Bayu H. M. 2012. Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Japsis* sp. Penghasil Enzim Protease. *Bioscientiae.* 9 (1).
- Mahmoud, Manal G., Imam A. Ghazy, Ghada S. Ibrahim, Afaf S. Fahmy, Mohamed O. El-Badry, & Azza M. Abdel-Aty. 2011. Purification and Characterization of A New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus polymyxa* Nrc-a. *Int. J. Academic Res.*
- Moroz, L. A. and N. J. Gilmore. 2011. A Rapid and Sensitive ¹²⁵I-Fibrin Solid-Phase Fibrinolytic Assay for Plasmin. *Blood Journal.* 46: 543-553.
- Naiola, E. dan N. Widyastuti. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Hayati.* 6: 467-473.
- Pan, R., Zhang Z.J. & He R. Q. 2010. Review Article: Earthworm Protease. *App. Environ. Soil. Sci.*

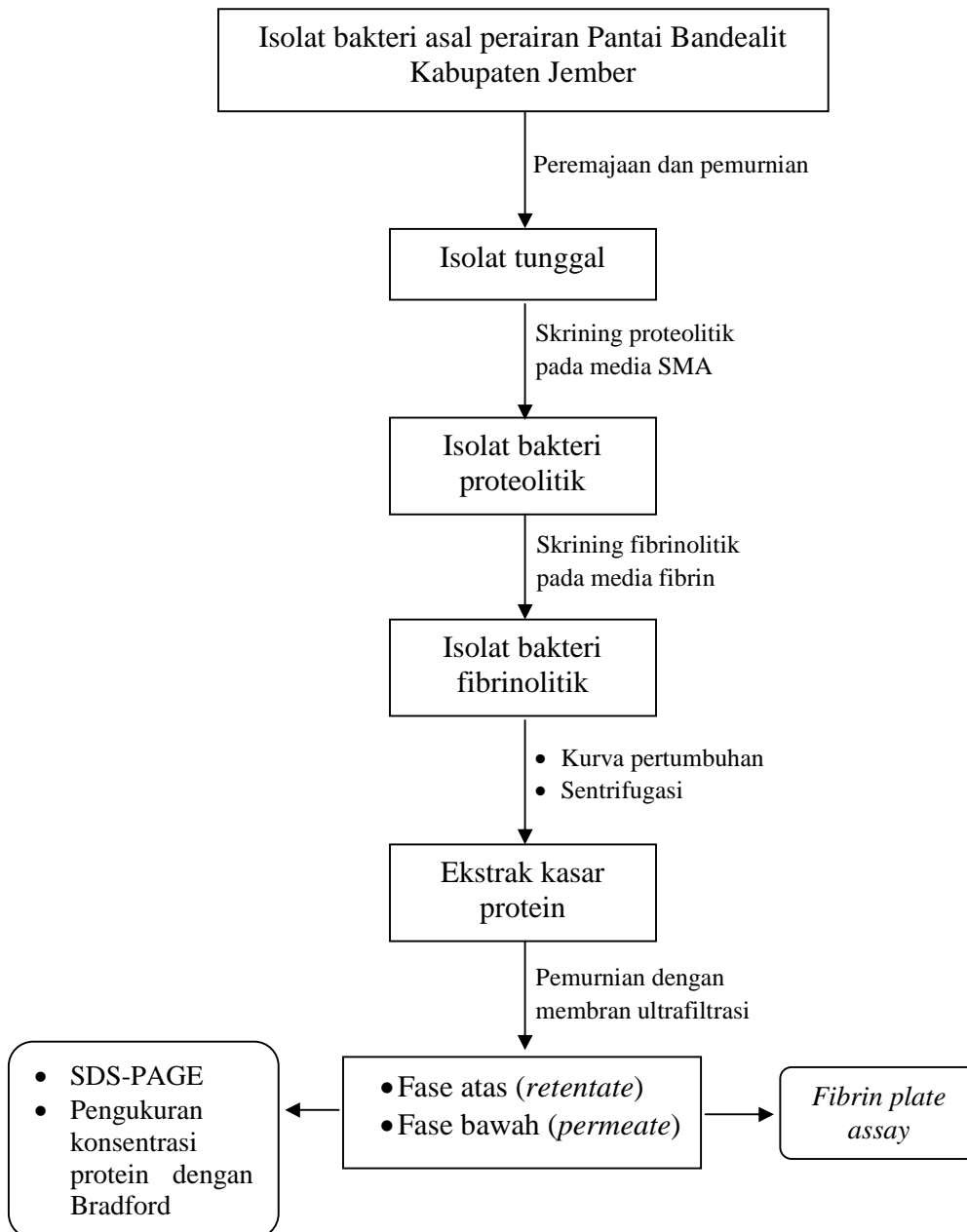
- Peng, Y. and Zhang Y.Z. 2002. Optimization of Fermentation Conditions of Douche Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. *Chin. Food. Ferment. Indus.* (28): 19-23.
- Rahayu, Umi. 2007. Skrining Bakteri Termofilik Penghasil Protease. *Bul. Tek. Lit. Akuakultur.* 6 (2): 146.
- Rao, M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. & Deshpande V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Micro. & Mol. Bio. Rev. Sci Am.* 62: 597-635.
- Sajuthi, D., Irma S., Yanti, dan Willy P. 2010. Purifikasi dan Pencirian Enzim Protease Fibrinolitik dari Ekstrak Jamur Merang. *Makara Sains.* 14 (2): 145-150.
- Sumi, H.; Hamada, H.; Tsushima, H.; Mihara, H. & Muroki, H. 1987. A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in The Vegetable Cheesenatto; A Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet. *Experientia.* (43): 1110-1111.
- Ward, O. P. 1983. Proteinases. Di dalam: Fogarty W, editor. *Microbial Enzymes and Biotechnology. App. Sci.* 251-317.
- Zhao, J. 2007. *Eisenia foetida* Protease-III-1 Functions in Both Fibrinolysis and Fibrogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 9765.

Media Elektronik (internet)

- WHO. 2005. WHO Study on Prevention of Recurrences of Myocardial Infarction and Stroke (WHO-PREMISE). *Bulletin of The World Health Organization* [serial on line]. [http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_searo_idn_indonesia/vol83/\(11\):820-828.pdf](http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_searo_idn_indonesia/vol83/(11):820-828.pdf). [19 Februari 2012].

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. ALUR PENELITIAN



LAMPIRAN B. DAFTAR FAKTOR PEMBEKUAN DARAH

Faktor Pembekuan	Keterangan
Faktor I	Fibrinogen
Faktor II	Protrombin
Faktor III	Tromoboplastin jaringan (faktor jaringan)
Faktor IV	Ion kalsium (Ca ²⁺)
Faktor V	Faktor labil (<i>proaccelerin</i>)
Faktor VI	Belum didefinisikan*
Faktor VII	Faktor stabil (<i>serum prothrombin conversion accelerator</i> (SPCA) <i>proconvertin</i>)
Faktor VIII	Faktor antipembekuan darah, faktor VIII:C (protein pembekuan darah)
Faktor IX	Faktor Christmas (<i>plasma thromboplastin component</i> (PTC), faktor B antihemofilia)
Faktor X	Faktor Stuart-Prower
Faktor XI	<i>Plasma thromboplastin antecedent</i> (PTA)
Faktor XII	Faktor Hageman (faktor kontak)
Faktor XIII	<i>Fibrin-stabilizing factor</i> (FSF)
Faktor Fitzgerald	<i>High-molecular-weight kininogen</i> (HMWK)
Faktor Fletcher	Prekallikrein

Catatan:

*Penamaan faktor VI dibatalkan karena senyawa yang dahulu dianggap sebagai faktor pembekuan darah sebenarnya adalah prekursor dari faktor V, dan untuk menghindari kekeliruan, faktor VI belum didefinisikan hingga saat ini.

Sumber: Angky (2011).

LAMPIRAN C. KOMPOSISI BAHAN

C.1 Komposisi Bahan untuk Pembuatan Media

1. Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 0,3 gr *Meat Extract* dan 0,5 gr *Bacto Peptone* ditambahkan dengan 2 gr *bacto agar*, dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian dipanaskan dan disterilisasi autoklaf.

2. Media *Nutrient Broth* (NB)

Sebanyak 0,3 gr *Meat Extract* dan 0,5 gr *Bacto Peptone* dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian dipanaskan dan disterilisasi autoklaf.

3. Media *Skim Milk Agar* (SMA)

Sebanyak 10 gr *Skim Milk* dan 2 gr *Bacto Agar*, masing-masing dilarutkan dalam 50 ml akuades, dan disterilisasi autoklaf. Kedua larutan tersebut kemudian dicampurkan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan dituang kedalam cawan petri.

4. Media *Luria Bertani Broth* (LB)

Sebanyak 0,5 gr *Yeast Extract*, 1 gr *Bacto Triptone* ditambahkan dengan 1 gr NaCl, dilarutkan dalam 100 ml akuades. Kemudian dipanaskan dan disterilisasi autoklaf.

5. Media Fibrin

Sebanyak 0,1 gr *Bacto Agar* dilarutkan dalam 4 ml buffer PBS 50 mM (pH 7,4) dan disterilisasi autoklaf. Setelah steril, larutan agar ditambahkan dengan 1 ml fibrinogen (0,005 gr *Bovine Fibrinogen* dilarutkan dalam 1 ml buffer PBS 50 mM pH 7,4). Kemudian ditambahkan 20 µl trombin (20 µg *Bovine Thrombine* dilarutkan dalam 20 µl CaCl₂ 0,5 mM steril, dengan sterilisasi *Miliphore*), dan dituang kedalam petri. Kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga terbentuk lapisan benang-benang fibrin berwarna putih. Pencampuran bahan pembuatan media fibrin ini dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

C.2 Komposisi Bahan Kimia untuk Pembuatan Buffer

1. Buffer Sampel

Sebanyak 1 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,8 ml gliserol; 1,6 ml SDS 10%; 0,4 ml *β-mercaptoethanol*; *bromophenol blue* 1% dilarutkan dalam 8 ml akuabides, kemudian dihomogenkan. Buffer sampel disimpan pada suhu 4°C.

2. PBS 50 mM pH 7,4

Sebanyak 8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 1,44 gr Na₂HPO₄; 0,24 gr KH₂PO₄, dilarutkan dalam 1000 ml akuabides dan dititrasi hingga pH mencapai 7,4. Kemudian disterilisasi autoklaf.

3. Buffer Tris HCl 1,5 M (pH 8,8)

Sebanyak 18,2 gr Tris dilarutkan dalam 40 ml akuades, kemudian dititrasi menggunakan HCl hingga pH mencapai 8,8. Buffer ditera menggunakan akuades hingga volum 100 ml. Buffer disimpan pada suhu 4°C.

4. Buffer Tris HCl 0,5 M (pH 6,8)

Sebanyak 6 gr Tris dilarutkan dalam 40 ml akuades lalu dititrasi menggunakan HCl hingga pH mencapai 6,8. Buffer ditera menggunakan akuades hingga volum 100 ml. Buffer disimpan pada suhu 4°C.

5. Buffer Elektroda

Sebanyak 3 gr Tris Base; 14,4 gr *Glycine*; SDS 0,1 %, dilarutkan dalam 1000 ml akuades steril, dan dititrasi hingga pH mencapai 8,3.

6. Larutan Pewarna (*staining*)

Sebanyak 1 gr *Coomassie Blue R-250*; 450 ml Methanol; 100 ml Asam Asetat Glasial, dilarutkan dalam 450 ml akuades steril dan disimpan pada suhu ruang.

7. Larutan Peluntur (*destaining*)

Sebanyak 400 ml Methanol 40% (v/v) dan 100 ml Asam Asetat Glasial 10% (v/v), ditambahkan kedalam 500 ml akuades steril dan disimpan pada suhu ruang.

C.3 Komposisi Bahan untuk Gel Elektroforesis 12%

Bahan	Volume	
	<i>Separating Gel</i>	<i>Stacking Gel</i>
Akrilamid/ Bis Akrilamid 40%	3 ml	0,997 ml
1,5 M Tris HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M Tris HCl (pH 6,8)	-	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
Akuades steril	4,34 ml	6,423 ml
APS 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	10 µl

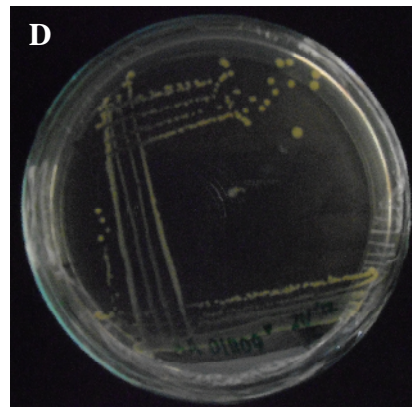
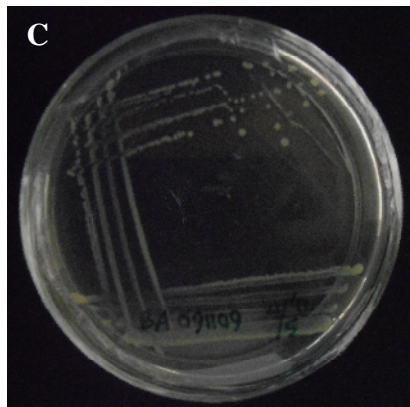
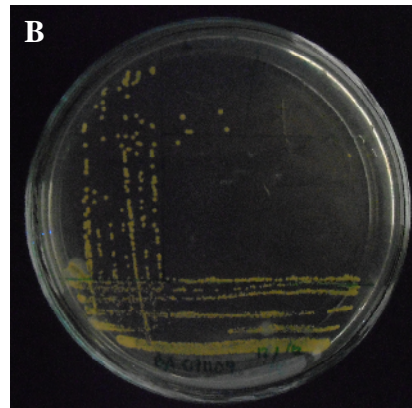
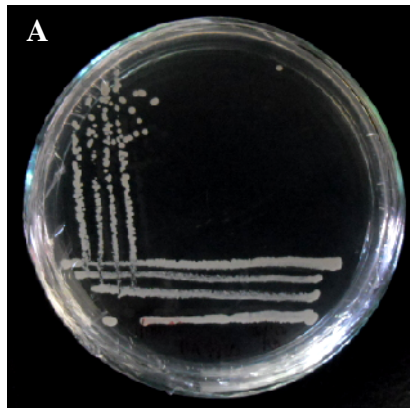
**LAMPIRAN D. DATA MORFOLOGI ISOLAT BAKTERI PANTAI
BANDEALIT KABUPATEN JEMBER**

**D.1 Data Morfologi Isolat Bakteri Perairan Pantai Bandealit Kabupaten Jember
Umur 3 Hari**

No.	Nama Isolat	Morfologi	
		Koloni	Sel
1.	BA 011109	Putih, bulat kecil, $\phi \pm 0,5\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
2.	BA 041109*	Putih keruh, bulat kecil, $\phi \pm 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
3.	BA 091109	Kuning muda, bulat kecil, $\phi \pm 1\text{ mm}$	Kokus, Gram Negatif
4.	BA 061109	Kuning sedikit bening, bulat kecil $\phi \pm 1\text{ mm}$	Kokus, Gram Negatif
5.	BA 051109	Kuning, bulat kecil, $\phi \pm 1\text{ mm}$	Kokus, Gram Negatif
6.	BA 131109	Putih kekuningan, bulat kecil, $\phi \pm 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
7.	BA 698	Putih keruh, bulat kecil, $\phi 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
8.	BA 698*	Orange muda, bulat kecil, $\phi \pm 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
9.	BA 9916	Kuning muda, bulat kecil, $\phi \pm 0,5\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
10.	BA 694	Kuning muda keputihan, bulat kecil, $\phi 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
11.	BA 6912	Putih susu, bulat kecil, $\phi 0,5\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
12.	BA 011109*	Putih susu keruh	Kokus, Gram Negatif
13.	BA 071109	Putih keoranyean	Kokus, Gram Negatif
14.	BA 9918	Putih kekuningan, bulat sedang, $\phi 2\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif
15.	BA 9920	Putih susu, bulat kecil, $\phi 1\text{mm}$	Kokus, Gram Negatif

Sumber: Herawati (2010).

**D.2 Gambar Morfologi Koloni Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai Bandalit
Kabupaten Jember Umur 3 Hari**



Catatan:

A: isolat BA 9920

B: isolat BA 071109

C: isolat BA 091109

D: isolat BA 011109*

LAMPIRAN E. PERHITUNGAN JUMLAH SEL ISOLAT BAKTERI BA 9920

Jam ke-	Rerata Jumlah Sel ($\times 10^3$)			Rerata Ulangan ($\times 10^3$)	SD	% kesalahan	Nt dihitung berdasarkan rumus
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3				
0	80	70	80	76,7	5,8	7,5	76,7
11,51	1000	1080	1020	1033,3	41,6	4	19789,4
23,51	226000	225000	206500	219166,7	10981	5	176956,9
36,03	232000	203000	217000	217333,3	14502,9	6,7	180855,9
48,01	223000	215500	218000	218833,3	3818,8	1,7	180864,3
60,07	215000	211500	213000	213166,7	1755,9	0,8	180864,3

Catatan:

- Sel bakteri diamati dengan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 100x
- Jumlah sel bakteri dihitung dengan menggunakan Haemocytometer
- Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan menggunakan rumus:

$$\mu = \frac{\lg N_t - N_0}{\lg e(t - t_0)} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

$$N_t = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

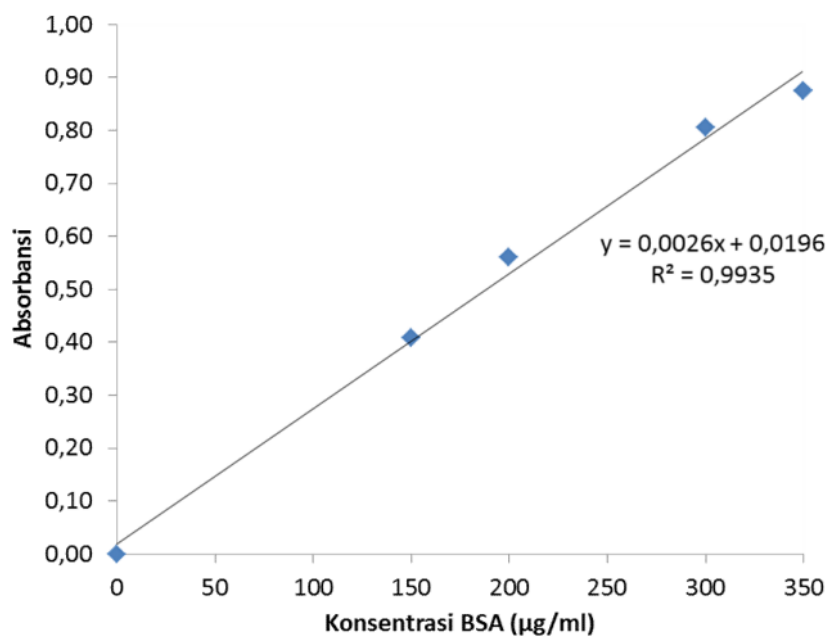
Keterangan:

T = waktu ke t N_0 = Jumlah sel pada waktu t_0
 μ = kecepatan pertumbuhan
 t_0 = waktu ke 0 N_t = Jumlah sel pada waktu ke t

F. ANALISIS KONSENTRASI PROTEIN

1. Penentuan Kurva Standar Protein Metode Bradford

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
0	0,000
150	0,409
200	0,560
300	0,806
350	0,875



2. Penentuan Konsentrasi Protein Sampel

No.	Sampel	Absorbansi	Konsentrasi Protein (mg/ml)
1.	Fase atas (<i>retentate</i>)	0,569	0,254
2.	Fase bawah (<i>permeate</i>)	0,193	0,066

G. PENENTUAN BERAT MOLEKUL PROTEIN BERDASARKAN ELEKTROFORESIS SDS-PAGE

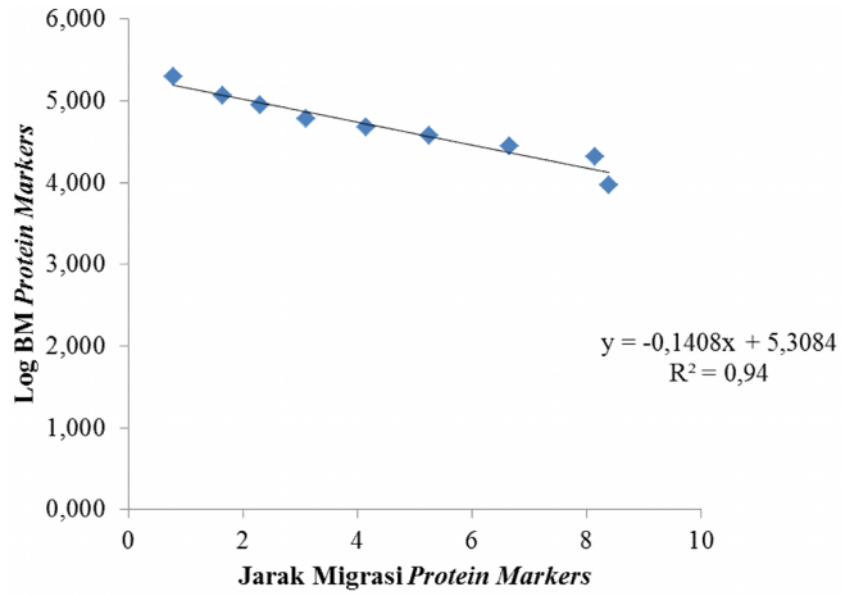
1. Berat Molekul Penanda Protein (*Protein Markers*)

Protein	Berat Molekul (kDa)
Myosin	200
β -Galactosidase	116
Bovine serum albumin	89
Glutamate dehydrogenase	61
Ovalbumin	47
Carbonic anhydrase	37
Myoglobin	28
Lysozyme	21
Aprotinin	9,3

2. Jarak Migrasi dan Log Berat Molekul Penanda Protein (*Protein Markers*)

Jarak Migrasi (cm)	Log Berat Molekul
0,8	5,3
1,6	5,0
2,3	4,9
3,1	4,7
4,1	4,6
5,2	4,5
6,6	4,4
8,1	4,3
8,4	3,9

3. Kurva Regresi Berat Molekul Penanda Protein (*Protein Markers*)



4. Penentuan Berat Molekul Protein Sampel

Jarak Migrasi Sampel (cm)	Nilai Regresi (y)	Antilog y	Berat Molekul Protein Sampel (kDa)
3,9	4,76	57543,99	57,5
3,8	4,78	60255,95	60,2
2,9	4,91	81283,05	81,2