



**SKRINING BAKTERI FIBRINOLITIK ASAL TANAH
PADA PEMBUANGAN LIMBAH TAHU**

SKRIPSI

Oleh
Madaniyah
NIM 081810401045

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



**SKRINING BAKTERI FIBRINOLITIK ASAL TANAH
PADA PEMBUANGAN LIMBAH TAHU**

SKRIPSI

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

Oleh

**Madaniyah
NIM 081810401045**

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

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah Swt. yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang dan yang telah memberikan rahmat dan kasih sayangnya kepada seluruh umat manusia serta kepada Nabi Muhammad Saw. yang menjadi junjungan seluruh umat manusia. Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Abd.Samad dan ibunda Mahkamah yang telah membesarkan, merawat, mendidik, mendoakan, memotivasi, dan selalu memberi kasih sayang tanpa batas waktu. Terima kasih atas dukungan moral maupun materiil serta segenap pengorbanannya yang tiada henti-hentinya diberikan sampai saat ini;
2. saudaraku tercinta Miftahul Jannah, Husnul Hasanah dan Zahrul Anam yang telah selalu memotivasi dan mendukung serta atas persaudaraan yang begitu indah;
3. guru-guru sejak SD sampai perguruan Tinggi yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh ikhlas dan kesabaran;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

"Sebaik-baik manusia diantaramu adalah yang paling banyak manfaatnya bagi orang lain, berakhlak mulia, mempelajari Al Quran dan mengajarkannya, serta orang yang umurnya panjang dan banyak amal kebajikannya."

(HR. Ahmad, Thabrani, dan Daruqutni)*

*) HR. Ahmad, Thabrani, Daruqutni. Dishahihkan Al Albani dalam *As-Silsilah As-Shahihah*. <http://www.bersamadakwah.com>

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Madaniyah

NIM : 081810401045

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skринing Bakteri Fibrinolitik Asal Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh grup penelitian dengan 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 sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 14 Februari 2013

Yang Menyatakan,

Madaniyah

NIM 081810401045

SKRIPSI

**SKRINING BAKTERI FIBRINOLITIK ASAL TANAH
PADA PEMBUANGAN LIMBAH TAHU**

Oleh

Madaniyah
NIM 081810401045

Pembimbing:

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Skrining Bakteri Fibrinolitik Asal Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal :

Tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji :

Ketua,

Sekretaris,

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

Drs. Sutoyo, M.Si.
NIP 196610141992031002

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd.
NIP 195805281988021002

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Mengesahkan
Dekan Fakultas MIPA Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Skrining Bakteri Fibrinolitik Asal Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu; Madaniyah; 081810401045; 2013; 36 Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Fibrin merupakan suatu protein yang membentuk gumpalan darah untuk menghentikan kehilangan darah. Akumulasi dari fibrin yang berlebihan dalam pembuluh darah biasanya menghasilkan trombosis. Salah satu terapi penyakit trombosis dengan menggunakan agen fibrinolitik. Mikroorganisme khususnya bakteri adalah sumber penting bagi zat fibrinolitik. Isolasi dan seleksi bakteri fibrinolitik dapat berasal dari tanah tempat pembuangan limbah yang mengandung protein seperti tanah tempat pembuangan limbah tahu. Kandungan protein yang tinggi pada limbah tahu sebesar 40%– 60% menyebabkan tanah yang dialiri limbah tahu diasumsikan mempunyai kandungan protein yang tinggi pula, sehingga dapat digunakan sebagai sumber isolat bakteri fibrinolitik. Dari permasalahan diatas, maka penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri fibrinolitik asal tanah pembuangan limbah tahu. Hasil penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai data awal mengenai bakteri tanah yang memiliki aktivitas fibrinolitik dan dapat dikarakterisasi lebih lanjut sebagai agen fibrinolitik untuk alternatif pengobatan trombosis.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif. Metode yang digunakan antara lain: 1) Pengambilan sampel tanah; 2) Isolasi bakteri tanah; 3) Identifikasi isolat yang diperoleh; 4) Uji aktivitas proteolitik; 5) Uji aktivitas fibrinolitik; 6) Produksi ekstrak kasar protein; 7) Pemekatan enzim menggunakan teknik ultrafiltrasi; 8) Penentuan kadar protein; dan 10) Uji *Fibrin Plate Assay*.

Hasil penelitian diperoleh 12 isolat bakteri tanah yang kemudian diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Dua belas isolat bakteri tanah hasil isolasi, berdasarkan morfologi makroskopisnya memiliki bentuk koloni, tepi koloni, dan elevasi koloni yang bervariasi, sedangkan morfologi mikroskopisnya menunjukkan

bentuk yang seragam yaitu berbentuk batang Gram positif. Sebanyak 10 isolat dari 12 isolat bakteri tanah memiliki aktivitas proteolitik. Isolat GLT 150342 mempunyai indeks aktivitas proteolitik tertinggi sebesar 2.26 dibandingkan dengan isolat lain yang mempunyai indeks antara 1.00 sampai 1.80. Hasil uji aktivitas fibrinolitik diperoleh 9 isolat bakteri tanah mempunyai aktivitas fibrinolitik dengan indeks aktivitas fibrinolitik tertinggi pada isolat GLT 150305 sebesar 5.2. Hasil kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat bakteri GLT 150305 tumbuh mencapai fase eksponensial pada jam ke-6 sampai jam ke-15 dengan jumlah sel mencapai 3.04×10^8 sel/ml pada jam ke-15. Hasil pengujian dari *retentate* (>10 kDa), *permeate* (<10 kDa), dan Supernatan Bebas Sel (SBS) dengan *fibrin plate assay* menunjukkan bahwa *retentate* dan SBS mampu memecah substrat fibrin dengan hasil perhitungan diameter zona bening sebesar 1.74 cm dan 1.10 cm. Sedangkan *permeate* tidak menunjukkan adanya zona bening pada pengujian tersebut. Hasil pengukuran konsentrasi protein pada *retentate* didapatkan konsentrasi protein sebesar 0.0039 mg/ml, sedangkan *permeate* memiliki konsentrasi protein sebesar 0.0018 mg/ml.

Kesimpulan pada penelitian ini bahwa skrining terhadap bakteri asal tanah pembuangan limbah tahu diperoleh 1 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik saja dan 9 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik. Isolat bakteri yang potensial sebagai penghasil agen fibrinolitik adalah isolat GLT 150305.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi, yang berjudul: "Skrining Bakteri Fibrinolitik Asal Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu".

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

1. Sattya Arimurti S.P., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah sabar dan senang hati meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan pengarahan, bimbingan, petunjuk, dan motivasi selama masa perkuliahan sampai dengan penyelesaian penyusunan skripsi ini;
2. Dr.rer.nat. Kartika Senjarini S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota dan ketua grup penelitian *Tranmission Blocking Vaccine* (TBV) dan Bakteri yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan bantuan dana sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik;
3. Drs. Sutoyo, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak memberikan bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan skripsi ini;
4. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd., selaku Dosen Penguji I dan Dr. Kahar Muzakhar, S.Si., selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan saran dan kritik yang berguna untuk kesempurnaan penulisan skripsi ini;
5. Ayahanda Abd. Samad dan ibunda Mahkamah yang telah memotivasi dan mendoakan demi terselesainya skripsi ini dan Saudara-saudaraku Miftahul Jannah, Husnul Hasanah, dan Zahrul Anam yang telah memberikan semangat dan motivasi;
6. Ir. Endang, S. selaku teknisi Laboratorium Mikrobiologi, dan Purnama Ocviandari, S.P., M.P., selaku teknisi Laboratorium Biologi Dasar yang telah membantu dan memberikan nasehat kepada penulis selama penelitian;

7. teman-teman satu tim penelitian Arif Setiawan, Dewi Eka P., Emy Dwi F., Khilwiyah Eka P. atas segala kerjasama dan bantuan selama penelitian;
8. teman-teman Laboratorium Biologi Dasar Syubanut Wathon, Ika Agus Rini, Imam Hanafy, Mbak Dina, Mbak Riska "yist", dan Mbak Esti; dan teman-teman Lab. Mikro., Niar dan Mbak jajah; serta teman-teman FK: Dini, Harmas dan Dani atas segala dukungan, semangat, bantuan dan segala keceriaan selama berada di Laboratorium;
9. keluarga besar Biologi 2008 "*Omfalomesenterika*" atas kenangan, kebersamaan, keceriaan, suka dan duka selama masa perkuliahan;
10. Muhammad Ridho yang telah hadir memberi semangat, dukungan, motivasi dan sayangnya selalu;
11. Sahabat-sahabatku: Faisol, Uly, Dewi Marda, Ima "Unyitz", Indri "Pengong", Echi, dan Ade "Koplo", terimakasih atas semangat, kebersamaan, suka dan duka dan pelajaran hidup yang telah kita lewati bersama-sama;
12. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan semangat, dorongan, dan bantuannya dalam proses menyelesaikan skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan kemajuan ilmu pengetahuan.

Jember, Februari 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan dan Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Peranan Enzim Fibrinolitik dalam Pengobatan Trombosis.	4
2.1.1 Trombosis	4
2.1.2 Enzim Fibrinolitik sebagai Obat Trombolitik	7
2.2 Bakteri sebagai Sumber Enzim Fibrinolitik	8
2.3 Limbah Tahu	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Rancangan Penelitian	11

3.3 Alat dan Bahan	12
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 Pengambilan Sampel	13
3.4.2 Isolasi Bakteri Tanah	13
3.4.3 Identifikasi Morfologi Bakteri secara Makroskopis dan Mikroskopis	13
3.4.4 Uji Aktivitas Proteolitik	14
3.4.5 Uji Aktivitas Fibrinolitik	14
3.4.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan	15
3.4.7 Produksi Ekstrak Kasar Protein	16
3.4.8 Pemisahan Ekstrak Kasar Protein Menggunakan Membran Ultrafiltrasi	16
3.4.9 Analisis Konsentrasi Protein	16
3.4.10 Analisis Aktivitas Enzim Kasar dengan Uji <i>Fibrin</i> <i>Plate Assay</i>	17
3.5 Analisis Data.....	18
8BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Isolasi Bakteri dari Tanah Pembuangan Limbah Tahu	19
4.2 Kemampuan Aktivitas Proteolitik Isolat.....	21
4.3 Kemampuan Aktivitas Fibrinolitik	23
4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat GLT 150305	26
4.5 Produksi Ekstrak Kasar Protein dan Uji Aktivitas Fibrinolitik.....	28
BAB 5. PENUTUP	30
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Data morfologi makroskopis dan mikroskopis isolat bakteri dari tanah pembuangan limbah tahu	20
4.2 Indeks aktivitas proteolitik isolat bakteri dari tanah pembuangan limbah tahu umur 48 jam suhu 30° C pada Media SMA	23
4.3 Indeks aktivitas fibrinolitik isolat bakteri dari tanah pembuangan limbah tahu umur 48 jam suhu 30° C pada Media Fibrin	25

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Mekanisme pembekuan darah (Sumber: Price dan Wilson, 2005).....	6
3.1 Diagram alir skrining bakteri fibrinolitik asal tanah pembuangan limbah tahu.....	11
4.2 Zona bening isolat bakteri dari tanah aliran pembuangan limbah tahu (a) GLT 150303; (b) GLT 150304; (c) GLT 150305; (d) GLT 150317; (e) GLT 150321; (f) GLT 150318; (g) GLT 150333; (h) GLT 150311; (i) GLT 150302; (j) GLT 150346; (k) GLT 150336; (l) GLT 150342 umur 48 jam suhu 30° C pada media SMA.....	22
4.3 Zona bening Isolat Bakteri dari Tanah Aliran Pembuangan Limbah Tahu (a) GLT 150302; (b) GLT 150303; (c) GLT 150304; (d) GLT 150305; (e) GLT 150311; (f) GLT 150317; (g) GLT 150318; (h) GLT 150333; (i) GLT 150321; (j) GLT 150336; (k) GLT 150342; (l) GLT 150346 Umur 48 Jam Suhu 30° C pada Media Fibrin.....	24
4.4 Kurva pertumbuhan isolat bakteri GLT 150305 dari tanah pembuangan limbah tahu	27
4.5 Aktivitas fibrinolitik ekstrak protein kasar bakteri GLT 150305 dari sampel, (a) <i>retentate</i> ; (b) <i>permeate</i> ; dan (c) supernatan bebas sel pada Media Fibrin Agar (<i>Fibrin Plate Assay</i>).....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. MORFOLOGI KOLONI ISOLAT BAKTERI ASAL TANAH PEMBUANGAN LIMBAH TAHU UMUR 24 JAM INKUBASI 30° C PADA MEDIA NA	37
B. KOMPOSISI BAHAN KIMIA	39
B.1 Komposisi Bahan Kimia Untuk Pembuatan Media.....	39
B.2 Komposisi Larutan.....	39
C. PERHITUNGAN JUMLAH SEL ISOLAT BAKTERI GLT 150305	40
D. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN	41
D.1 Penentuan Kurva Standar Protein Menggunakan Metode Bradford.....	41
D.2 Kurva Standar Protein.....	41
D.3 Penentuan Konsentrasi Protein Sampel.....	41

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fibrin merupakan suatu protein yang membentuk gumpalan darah setelah terjadi luka atau trauma untuk menghentikan kehilangan darah (Sumi *et al.*, 1990). Akumulasi dari fibrin yang berlebihan dalam pembuluh darah biasanya menghasilkan trombosis, yang mengarah ke kelainan miokardal dan penyakit kardiovaskular lainnya (Kim dan Choi, 2000).

Obat trombolitik yang telah disetujui oleh FDA untuk terapi penyakit yang disebabkan oleh trombosis adalah *tissue plasminogen aktivator* (tPA) dan streptokinase (SK) (Baruah *et al.*, 2006). Penggunaan klinis tPA dan SK memiliki keterbatasan berupa waktu paruh yang singkat, membutuhkan dosis terapi yang besar, spesifitas terhadap fibrin rendah bersifat reoklusi, dan bersifat imunogenik untuk SK (Reddy, 1998). Selain obat-obat trombolitik diatas, terdapat satu enzim yang dapat memecah gumpalan darah yaitu enzim fibrinolitik (Sumi *et al.*, 1990). Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin menjadi fragmen-fragmen terlarut (Suhartono, 1992). Enzim fibrinolitik dapat diperoleh dari tanaman, hewan, ataupun mikroba termasuk bakteri (Peng *et al.*, 2005).

Berbagai enzim fibrinolitik telah dimurnikan dari berbagai bakteri (Peng *et al.*, 2005). Salah satu bakteri penghasil enzim fibrinolitik yang telah diketahui adalah *Bacillus*. Berbagai jenis *Bacillus* yang memiliki aktivitas fibrinolitik diantaranya adalah diperoleh dari *B. subtilis* BK-17 (Jeong *et al.*, 2001), *B. subtilis* DC33 (Wang *et al.*, 2006), *B. amyloliquefaciens* DC-4 (Peng *et al.*, 2003), *B. subtilis* IMR-NKI (Chang *et al.*, 2000), dan *Bacillus* sp. K-1 (Yang *et al.*, 2006).

Eksplorasi bakteri penghasil enzim fibrinolitik dari golongan *Bacillus* telah berhasil diperoleh dari berbagai produk pangan. Produk pangan yang telah berhasil diisolasi bakteri penghasil enzim fibrinolitiknya yaitu *chungkook-jang*, pangan

fermentasi tradisional korea, dengan bahan pokok kacang kedelai (Kim *et al.*, 1996), tempe (Kim *et al.*, 2006), pangan fermentasi kedelai dari Thailand (Chantawannakul *et al.*, 2001), dan *Natto*, pangan tradisional jepang (Sumi *et al.*, 1987). Selain itu, bakteri fibrinolitik telah banyak dieksplorasi asal dari tanah tempat pembuangan limbah. Contoh tanah tersebut adalah tanah pembuangan susu rusak di Boyolali, Jawa Tengah (Akhdiya, 2003) serta tanah pembuangan limbah industri tempe (Retnosari, 2008). Limbah lainnya yang melimpah adalah limbah tahu. Limbah tahu merupakan limbah dengan kandungan bahan organik yang tinggi yaitu terdiri dari protein, lemak, dan karbohidrat yang masing-masing mencapai 40% - 60%, 10%, dan 25% - 50% (Sugiharto, 1994). Tingginya kandungan protein dalam limbah tahu diduga menarik berbagai jenis bakteri yang mempunyai aktifitas proteolitik dan fibrinolitik yang tinggi tumbuh dan berkembang didalamnya. Oleh karena itu, limbah tahu merupakan sumber potensial untuk penggalan bakteri *endogenous* penghasil enzim protease fibrinolitik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka permasalahan pada penelitian ini adalah:

- a. Apakah pada tanah pembuangan limbah tahu terdapat bakteri penghasil enzim proteolitik dan fibrinolitik?
- a. Bagaimana aktivitas proteolitik dan fibrinolitik isolat bakteri asal tanah pembuangan limbah tahu?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu :

- a. Skrining aktivitas fibrinolitik secara semikuantitatif dengan Metode *Fibrin Plate Assay*.
- b. Pemisahan ekstrak kasar protein dengan teknik ultrafiltrasi.

1.4 Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini adalah skrining bakteri fibrinolitik asal tanah pembuangan limbah tahu. Data yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai data awal mengenai bakteri tanah yang diisolasi dari tanah pembuangan limbah tahu yang memiliki aktivitas fibrinolitik. Selain itu, dari penelitian ini isolat bakteri terpilih dapat dikarakterisasi lebih lanjut sebagai agen fibrinolitik untuk alternatif pengobatan trombosis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Peranan Enzim Fibrinolitik dalam Pengobatan Trombosis

2.1.1 Trombosis

Trombosis adalah keadaan patologis berupa pembentukan bekuan darah (trombus) berlebihan dan abnormal yang menyebabkan terganggunya aliran darah (Philip *et al.*, 2001). Trombosis berlebihan dapat disebabkan oleh kelainan genetik dan aterosklerosis. Aterosklerosis adalah kondisi pembuluh darah arteri yang mengalami penyempitan akibat timbunan kolesterol, debris sel, dan matriks jaringan ikat dalam arteri koronaria. 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. Akumulasi trombus pada pembuluh darah arteri koroner ini menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara penyediaan dan kebutuhan oksigen (Price dan Wilson, 2005), sehingga menyebabkan 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 (Banerjee dan Chisti, 2003; Martini, 2006). Berdasarkan laporan WHO, pada tahun 2004, penyakit infark miokard akut merupakan penyebab kematian utama di dunia. Sebanyak 12.2% kematian di seluruh dunia terjadi akibat penyakit infark miokard akut (WHO, 2008).

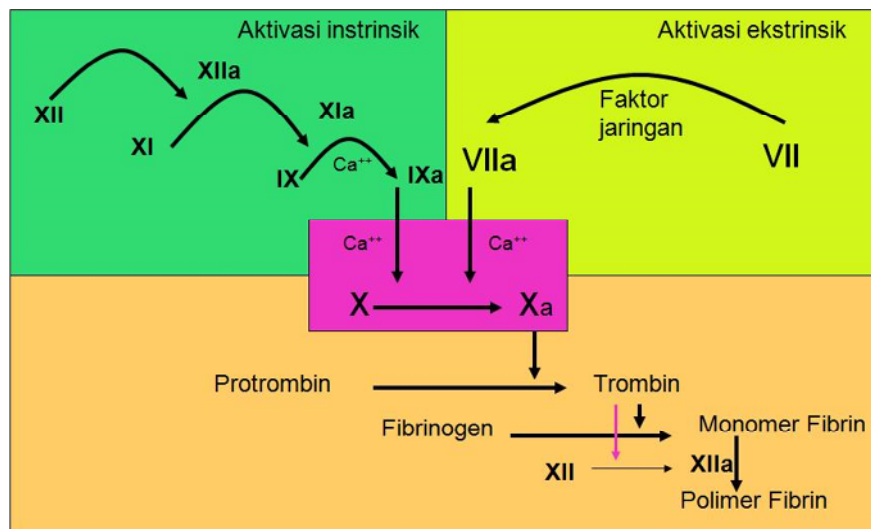
Trombosis disebabkan oleh abnormalitas sistem hemostasis. Hemostasis adalah serangkaian mekanisme yang memastikan darah tidak terlalu encer dan tidak terlalu pekat (Escobar *et al.*, 2002). Hemostasis merupakan proses yang berlangsung secara terus menerus dalam mencegah kehilangan darah secara spontan, serta menghentikan pendarahan akibat kerusakan pembuluh darah (Khalilullah, 2011).

Hemostasis terdiri atas dua proses yang saling setimbang, yaitu prokoagulasi dan fibrinolisis. Prokoagulasi atau penggumpalan darah terjadi apabila ada kerusakan pada jaringan kulit atau ketika sel darah bertemu dengan sel-sel endotelial yang robek. Sel endotelial sebenarnya bersifat antikoagulan (Escobar *et al.*, 2002). Namun adanya luka dapat mengubah sifat sel endotelial menjadi sangat prokoagulan, sehingga menyebabkan penempelan trombosit atau keping darah pada dinding pembuluh darah (Katzung, 2006) yang pada akhirnya akan menyumbat lubang pada pembuluh darah yang koyak (Escobar *et al.*, 2002).

Akhir pembekuan darah adalah pembentukan fibrin melalui dua jalur, yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik yang keduanya akan mengaktifkan jalur normal. Secara singkat mekanisme pembekuan darah dapat dilihat pada Gambar 2.1. Jalur pembentukan bekuan darah dimulai dengan pengaktifan jalur ekstrinsik yaitu aktivasi faktor pembekuan darah yang dipicu oleh kerusakan dinding endotelial pembuluh darah. Jalur ini disebut ekstrinsik karena masuknya faktor jaringan yang juga dikenal sebagai tromboplastin jaringan atau faktor III, senyawa yang tidak ditemukan di dalam darah, dilepaskan oleh jaringan pembuluh yang terluka. Faktor III bersama dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor VII menjadi faktor VIIa. Faktor VIIa, bersama dengan faktor III dan ion kalsium dapat memproduksi trombin dalam jumlah kecil dengan sangat cepat (Guyton dan Hall, 1997). Sedangkan 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. Selanjutnya, faktor XIa dengan ion kalsium akan mengaktifkan faktor IX menjadi IXa. (Escobar *et al.*, 2002).

Pertemuan jalur intrinsik dan ekstrinsik adalah pembentukan faktor Xa. Fungsi faktor Xa yaitu mengkatalis perubahan protrombin menjadi trombin (faktor IIa) dengan bantuan faktor Va, fosfolipida faktor keping darah 3 (platelet factor 3 (PF3)), dan ion kalsium (Escobar *et al.*, 2002). Trombin memotong fibrinopeptida dari

fibrinogen yang larut air menjadi monomer fibrin yang akhirnya menjadi polimer fibrin yang tidak larut (Jackson, 1988). Selain itu, trombin memiliki beberapa peranan yaitu 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 *et al.*, 2002).



Gambar 2.1 Mekanisme pembekuan darah (Sumber: Price dan Wilson, 2005)

Proses hemostasis yang kedua yaitu fibrinolisis. 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 *et al.*, 2002).

2.2.2 Enzim Fibrinolitik sebagai Obat Trombolitik

Terapi untuk penderita trombosis diantaranya dengan operasi yang bertujuan untuk menghilangkan sumbatan atau dengan obat-obat fibrinolitik (trombolitik) yang bekerja dengan cara mendegradasi gumpalan darah (Kunamneni *et al.*, 2007). 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 (Olson, 2004).

Secara umum obat trombolitik dibagi menjadi dua golongan yaitu aktivator plasminogen dan fibrinolisin (enzim mirip plasmin/*plasmin like protein*) (Tjay dan Rahardja, 2002). Aktivator plasminogen adalah enzim yang mengaktifasi plasminogen untuk menghasilkan plasmin yang selanjutnya akan mendegradasi bekuan darah menjadi produk terlarut yang dapat dihilangkan oleh fagosit (Kunamneni *et al.*, 2006). Obat trombolitik yang digunakan sebagai aktivator plasminogen diantaranya adalah tPA, rekombinan reteplase (retavase), SK dan urokinase (UK). Mekanisme dari obat-obat tersebut adalah mengaktifkan sistem fibrinolitik dengan cara memicu konversi plasminogen menjadi plasmin yang mampu melisiskan bekuan fibrin sehingga aliran darah kembali mengalir ke arteria koronaria (Rosmiati dan Gan, 1995). Berdasarkan sumbernya aktivator plasminogen dibagi menjadi dua yaitu berasal dari manusia (tPA dan UK) dan berasal dari organisme selain manusia (SK dan stafilokinase).

Enzim mirip plasmin adalah enzim yang secara langsung mampu mendegradasi bekuan darah tanpa melalui aktivasi plasminogen. Salah satu enzim mirip plasmin yaitu enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin atau fibrinogen menjadi fragmen-fragmen terlarut (Suhartono, 1992). Enzim yang mampu mendegradasi fibrin secara spesifik adalah

plasmin. Plasmin termasuk dalam kelompok protease serin dan bersirkulasi dalam bentuk inaktifnya, yaitu plasminogen. Plasmin dapat mempengaruhi bentuk koagulasi darah dan mengurangi kecepatan pembentukan bekuan trombosit karena kemampuan spesifiknya mendegradasi fibrin (Katzung, 2006). Contoh enzim fibrinolitik (enzim mirip plasmin) yaitu lumbrokinase. Lumbrokinase memiliki kemampuan untuk mengaktivasi plasminogen dan juga mendegradasi langsung fibrin (Mihara *et al.*, 1991). Selain lumbrokinase, enzim fibrinolitik yang sudah diteliti adalah yang berasal dari bisa ular dan saliva kelelawar. Enzim fibrinolitik yang bekerja secara langsung tanpa melalui aktivasi plasminogen yaitu dari bisa ular yang memiliki nama tergantung pada sumbernya, seperti fibrolase (Chen *et al.*, 1991) yang dihasilkan oleh bisa ular tembaga dan atroxase dihasilkan dari bisa ular derik.

2.2 Bakteri sebagai Sumber Enzim Fibrinolitik

Bakteri merupakan sumber penghasil enzim yang mudah diisolasi, dikembangkan, dan diproduksi. Sebagai sumber enzim, bakteri lebih menguntungkan karena kemudahan sel bakteri untuk ditumbuhkan, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan, proses produksinya yang tidak tergantung pada musim, waktu yang dibutuhkan relatif tidak lama (Meyrath dan Volavseck, 1975), dapat tumbuh pada substrat yang murah, mudah di kontrol, mampu menghasilkan enzim yang ekstrim (Akhdia, 2003), dan biaya produksi enzim yang relatif murah (Yuningsih, 2006).

Bakteri merupakan salah satu sumber enzim fibrinolitik. Contoh bakteri yang telah menghasilkan enzim fibrinolitik antara lain adalah *Streptococcus -hemolyticus* menghasilkan enzim SK dan *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan enzim stafilokinase. Kedua enzim yang dihasilkan oleh bakteri tersebut merupakan dua agen fibrinolitik yang diketahui efektif untuk terapi trombolitik (Collen dan Lijnen, 1994).

Dalam perkembangannya telah ditemukan berbagai bakteri yang mampu menghasilkan enzim fibrinolitik. Salah satu bakteri penghasil enzim fibrinolitik yang telah diketahui adalah *Bacillus*. Berbagai jenis *Bacillus* yang memiliki aktivitas fibrinolitik diantaranya adalah *B. subtilis* BK-17 (Jeong *et al.*, 2001), *B. subtilis* A1

(Jeong *et al.*, 2004), *B.subtilis* 168 (Kho *et al.*, 2005), *B.subtilis* DC33 (Wang *et al.*, 2006), *B.amyloliquefaciens* DC-4 (Peng *et al.*, 2003), *B.subtilis* IMR-NKI (Chang *et al.*, 2000), *Bacillus sp.* DJ-2 (Choi *et al.*, 2005), dan *Bacillus sp.* K-1 (Yang *et al.*, 2006).

2.3. Limbah Tahu

Dalam proses pembuatan tahu, air banyak digunakan sebagai bahan pencuci dan merebus kedelai dalam proses produksinya. Akibat dari besarnya pemakaian air pada proses pembuatan tahu maka limbah yang dihasilkan juga cukup besar. Limbah industri tahu terdiri dari 2 jenis yaitu limbah cair dan padat. Dari kedua jenis limbah tersebut, limbah cair merupakan bagian yang terbesar. Sebagian besar jumlah limbah cair yang dihasilkan bersumber dari cairan kental yang berpisah dari gumpalan tahu pada proses penggumpalan dan penyaringan yang disebut air dadih atau *whey*. Limbah cair tahu lainnya berasal dari proses sortasi dan pembersihan, pengupasan kulit, pencucian, penyaringan, dan proses pembersihan peralatan (Pohan, 2008).

Limbah dari proses pembuatan tahu ini termasuk dalam limbah yang *biodegradable* yaitu merupakan limbah atau bahan buangan yang dapat dihancurkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme khususnya bakteri mempunyai peranan dalam penguraian limbah tahu. Limbah cair dari industri tahu mengandung bahan organik yang tinggi terutama protein dan asam-asam amino (EMDI-Bapedal, 1994), baik dalam bentuk padatan tersuspensi maupun terlarut (BPPT, 1997). Kandungan Protein dalam limbah cair tahu mencapai 40%-60% (Sugiharto, 1994). Selain mengandung protein, limbah cair tahu juga mengandung senyawa organik lainnya yang berupa karbohidrat dan lemak (Nurhasan dan Pramudyanto, 1991) dengan total kandungan 25%-50% karbohidrat dan 10% lemak (Sugiharto, 1994). Tingginya kandungan protein dalam limbah cair tahu memungkinkan terdapat bakteri yang memanfaatkannya sebagai sumber nutrisi. Selain itu, kompleksnya kandungan limbah cair tahu berperan dalam variasi jenis bakteri yang ada di limbah tahu sehingga keanekaragaman bakteri di limbah tahu tinggi. Bakteri terlibat dalam transformasi

senyawa kompleks organik menjadi molekul yang sederhana. Lebih jauh lagi, terdapat reaksi sinergis antara bermacam-macam kelompok bakteri yang berperan dalam penguraian limbah. Menurut Archer dan Kirsop (Dalam Said dan Wahjono, 1999) ada 4 kelompok bakteri yang terlibat dalam transformasi material kompleks menjadi molekul yang sederhana dan bekerja secara sinergis yaitu bakteri hidrolitik, bakteri asidogenik fermentatif, bakteri asetogenik dan bakteri metanogen. Dari keempat kelompok bakteri tersebut yang sangat berperan dalam pemecahan senyawa kompleks organik menjadi molekul yang sederhana adalah bakteri hidrolitik. Bakteri hidrolitik merupakan kelompok bakteri anaerobik yang mampu memecah molekul organik kompleks seperti protein menjadi molekul monomer yang terlarut seperti asam amino. Hidrolisis molekul kompleks dikatalisasi oleh enzim ekstraselluler seperti protease, sellulase, dan lipase (Polprasert Dalam Said dan Wahjono, 1999).

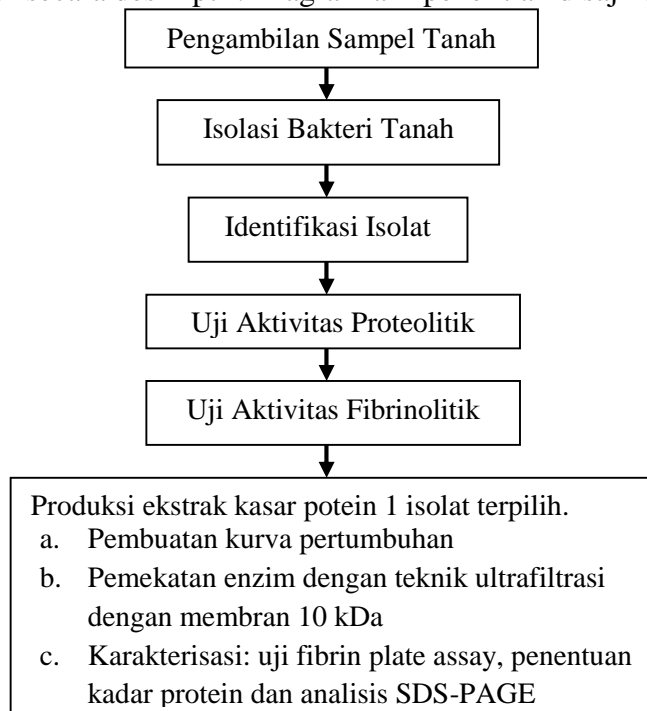
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Sampel tanah yang digunakan pada penelitian ini diambil dari pabrik tahu di Kecamatan Gebang Kabupaten Jember. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Desember 2012.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian deskriptif. Sampel yang didapat diteliti di laboratorium dan hasil data yang diperoleh adalah data kuantitatif yang dijelaskan secara deskriptif. Diagram alir penelitian disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alir skrining bakteri fibrinolitik asal tanah pembuangan limbah tahu.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel terdiri atas sekop kecil, botol selai dan aluminium foil. Peralatan yang digunakan di laboratorium meliputi peralatan isolasi, peralatan gelas, dan peralatan uji dan analisis. Peralatan isolasi terdiri atas jarum ose, tusuk gigi, spatula, penggaris, pinset, pipet tetes, lampu bunsen, kertas dorslag, kapas, bak plastik, kertas label, spidol marker, tisu gulung, rak tabung reaksi, *laminar air flow cabinet* (LAF), oven, *autoclave*, timbangan digital, *hotplate stirrer*, dan inkubator 30° C. Adapun peralatan gelas terdiri atas gelas objek, gelas penutup, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, *erlenmeyer Glass* (IWAKI), dan *beaker Glass* (PYREX). Peralatan uji dan analisis meliputi: eppendorf, kertas saring Whatman, mikrotip (Sorensen), mikropipet (socorex), botol schott (DURAN), tabung mikrosentrifuga membran Corning® Spin-X® 10 k-MWCO (*Molecular Weight Cut Off*), *freezer* -20°C dan -80°C (Denpoo), pH meter, lemari es 4°C, sentrifuga (Hettich Zentrifugen), inkubator *shaker* dan buku Mikrobiologi: A Laboratory Manual (Cappucino dan Sherman, 1996).

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut. Tanah diperoleh dari aliran pembuangan limbah tahu pabrik tahu Daerah Gebang, Kabupaten Jember. Bahan-bahan yang digunakan di laboratorium meliputi media pertumbuhan dan media skrining, larutan, dan bahan Elektroforesis. Media pertumbuhan dan media skrining yang digunakan meliputi media *Nutrien Agar* (NA) (Lampiran B), media *Nutrien Broth* (NB) (Lampiran B), media *Skim Milk Agar* (SMA) (Lampiran B), media *Luria Borth* (LB) cair (Lampiran B), dan Media Fibrin (Lampiran B). Adapun larutan yang digunakan meliputi garam fisiologis (0,85% NaCl), larutan *formaldehyde* 10% (v/v), gliserol steril, spirtus, alkohol 70%, akuades, *Bovine Serum Albumin* (BSA), pewarna Bradford, dan asam asetat glasial 10% (v/v)).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari aliran pembuangan limbah tahu di pabrik tahu Kecamatan Gebang Kabupaten Jember. Pengambilan tanah diambil pada 4 titik lokasi pengambilan pada tanah aliran pembuangan limbah tahu, kemudian sampel tanah yang diperoleh dikompositkan dan disimpan dalam botol steril. Sampel tanah yang didapatkan selanjutnya disterilisasi pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit yang bertujuan untuk skrining bakteri yang menghasilkan endospora saja.

3.4.2 Isolasi Bakteri Tanah

Sebanyak 10 gr sampel tanah yang telah disterilisasi dimasukkan kedalam 90 ml garam fisiologis (0,85% NaCl) lalu divortek sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya dibuat pengenceran 10^{-2} dengan cara mengambil 1 mL dari pengenceran 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam 9 ml garam fisiologis. Pengenceran dilakukan secara berseri sampai pengenceran 10^{-5} .

Sebanyak 100 μ L dari larutan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} diinokulasikan ke dalam media NA dengan metode sebaran, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30° C selama 24 - 48 jam. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh kemudian dipilih beberapa isolat yang mempunyai koloni dan morfologi yang berbeda dan dilakukan pemurnian dengan cara menginokulasikan isolat terpilih pada media NA padat dengan cara metode goresan 4 kuadran. Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C selama 24-48 jam. Pemurnian dilakukan sebanyak 3 kali sehingga didapatkan isolat murni. Setelah diperoleh koloni tunggal, kemudian isolat disimpan dalam lemari es (4° C).

3.4.3 Identifikasi Morfologi Bakteri Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Isolat bakteri yang telah diisolasi diamati secara makroskopis dengan cara koloni bakteri umur 24 jam diamati penampakan luarnya meliputi warna koloni yang diidentifikasi menurut Tabel Panduan Warna Castell-Polychromos 9216, bentuk

koloni, elevasi, tepi, dan struktur dalam koloni berdasarkan buku Mikrobiologi: A Laboratory Manual (Cappucino dan Sherman, 1996).

Pengamatan morfologi sel secara mikroskopis dilakukan dengan pengecatan Gram, dengan cara bagian koloni isolat bakteri diambil 1 ose dari media NA kemudian diulaskan di atas gelas objek lalu difiksasi di atas lampu Bunsen. Kemudian tuang cat crystal violet (Gram A) 1-2 tetes pada preparat, biarkan selama 1 menit dan dicuci dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan cat iodine (Gram B) selama 1 menit, dibersihkan dengan air mengalir dan dikering anginkan, lalu ditetesi preparat dengan alkohol asam (Gram C) sebanyak 1-2 tetes sambil digoyang-goyang lalu dicuci dengan air mengalir. Kemudian cat safranin (Gram D) ditetaskan sebanyak 1-2 tetes selama 2 menit, lalu cuci cat dengan air mengalir sesudah itu dikering anginkan. Kemudian preparat diamati di bawah mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 400 kali. Bakteri Gram Positif (+) akan menunjukkan warna ungu dan bakteri Gram Negatif (-) akan menunjukkan warna merah.

3.4.4 Uji Aktivitas Proteolitik

Isolat bakteri yang telah diperoleh koloni tunggal diambil sebanyak 1 ose menggunakan tusuk gigi lalu diinokulasikan dengan metode titik pada media SMA. Inkubasi dilakukan pada suhu 30° C selama ± 48 jam. Bakteri yang menghasilkan enzim proteolitik secara ekstraselular adalah bakteri yang membentuk zona bening disekitar koloni bakteri. Aktivitas enzim proteolitik isolat ditentukan dengan menghitung Indeks Aktivitas Enzim (IAE) dengan cara menghitung rasio ukuran diameter zona bening dan diameter koloni.

$$\text{Rumus IAE} = \frac{\text{diameter zona bening (cm)}}{\text{diameter Koloni (cm)}}$$

3.4.5 Uji Aktivitas Fibrinolitik

Semua isolat bakteri yang memberikan hasil positif pada uji aktivitas proteolitik selanjutnya ditumbuhkan pada media Fibrin untuk uji aktivitas fibrinolitik. Sebanyak

1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada media Fibrin dan diinkubasi pada suhu 30° C selama \pm 48 jam. Isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik akan menghasilkan zona bening disekitar koloni. Pengukuran indeks aktivitas enzim fibrinolitik sama dengan pengukuran indeks aktivitas proteolitik. Sebanyak 1 isolat terpilih yang mempunyai aktivitas fibrinolitik tertinggi kemudian dikarakterisasi aktivitas enzimnya.

3.4.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Satu isolat bakteri terpilih yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi, terlebih dahulu ditumbuhkan pada media cair untuk diamati pola pertumbuhannya. Satu koloni tunggal ditumbuhkan pada media LB cair 10 ml (sebagai *starter*) pada suhu 30° C selama \pm 12 jam. Sebanyak 500 μ l *starter* ditumbuhkan pada 50 ml LB cair. Selanjutnya setiap 3 jam sekali isolat bakteri difiksasi dengan mengambil 900 μ l kultur dan dimasukkan ke dalam ependorf 1,5 ml yang sudah berisi 100 μ l *formaldehyde*. Kemudian jumlah bakteri dihitung dengan menggunakan *hemacytometer* sampai jam ke-30. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri

berdasarkan rumus menurut Schlegel (1995): $\mu = \frac{\lg N_t - N_0}{\lg e(t - t_0)} = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$

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

Keterangan :

t = waktu ke-t

N_0 = Jumlah sel pada waktu t_0

t_0 = waktu ke 0

μ = kecepatan pertumbuhan

N_t = Jumlah sel pada waktu ke t

Analisis untuk mendapatkan kurva dilakukan dengan menggunakan aplikasi SOLVER pada program *microsoft office excel* 2003 (Arifin dan Utami, 2012). Setelah pola pertumbuhan bakteri diketahui, kemudian bakteri siap dikultur untuk produksi enzim.

3.4.7 Produksi Ekstrak Kasar Protein

Satu isolat terpilih yang sudah diketahui waktu eksponensialnya diambil 1 ose dan ditanam pada 10 ml media LB cair dan diinkubasi dalam inkubator *shaker* dengan kecepatan 120 rpm sesuai waktu eksponensialnya untuk digunakan sebagai *starter*. Sebanyak 3-5% biakan bakteri dari *starter* ditumbuhkan ke media LB baru dan diinkubasi 30°C sesuai waktu eksponensialnya. Kultur bakteri selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 9305 x g selama 15 menit pada suhu 4°C. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan enzim dengan sel bakteri. Supernatan diambil dan pelet dibuang, supernatan yang dihasilkan sama dengan ekstrak kasar protein sedangkan pelet sama dengan debris sel.

3.4.8 Pemisahan Ekstrak Kasar Protein Menggunakan Membran Ultra filtrasi

Ekstrak Kasar Protein yang selanjutnya disebut dengan Supernatan Bebas Sel (SBS) diperoleh dengan penggunaan teknik ultrafiltrasi dengan membran Corning spin-X UF Concentrator 10 K-MWCO (*Molecul Weight Cut Off*) atau 10 kDa. Teknik ultrafiltrasi adalah proses pemisahan komponen berdasarkan perbedaan berat dan ukuran molekul melalui suatu membran semipermeabel, dimana akan diperoleh komponen dengan ukuran molekul besar yang akan tertahan (*retentate*) dan komponen yang melewati membran (*permeate*) (Muchtadi, Tanpa Tahun). Pemisahan SBS dilakukan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 9305 x g selama 2-3 menit pada suhu 4°C. Hasil pemisahan diperoleh 2 fase yaitu fase atas (*rentetate*) ± 75 µl. *Rentetate* adalah molekul protein yang memiliki berat molekul diatas 10 KDa dan tidak bisa lolos dari membran filtrasi sedangkan berat molekul dibawah 10 KDa akan lolos dari membran filtrasi dan disebut fase bawah (*permeate*).

3.4.9 Analisis Konsentrasi Protein

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 μ l. Komposisi larutan tersebut terdiri dari 5 μ l sampel yang dilarutkan dalam 95 μ l dan 900 μ l pewarna Bradford. Kemudian larutan diukur absorbannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm. Blanko yang digunakan adalah buffer fosfat 50 mM pH 6,5.

Pembuatan kurva standar protein diawali dengan pembuatan larutan standar BSA. Larutan standar dibuat dengan menimbang 0,01 gr BSA yang dilarutkan dengan 10 ml aquades sehingga diperoleh larutan stok BSA dengan konsentrasi 1 mg/ml. Dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 0, 0.15, 0.20, 0.30, dan 0.35 (mg/ml). Kemudian dilakukan pengukuran terhadap standar protein dengan menambahkan 100 μ l seri larutan standar dengan 900 μ 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 serapan protein pada panjang gelombang tersebut akan didapatkan persamaan matematika untuk larutan standar protein yang diperoleh dari nilai absorbansi standar yang digunakan untuk pengukuran konsentrasi protein sampel.

3.4.10 Analisis Aktivitas Enzim Kasar dengan *Fibrin Plate Assay*

Analisis aktivitas enzim fibrinolitik dilakukan menggunakan metode Astrup dan Mullertz (1952). Sebanyak 5 μ L *retentate*, *permeate*, dan SBS hasil ultra filtrasi masing-masing ditetaskan pada membran cakram yang diletakkan di atas media fibrin dan diinkubasi pada 30°C selama 24 jam. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling membran cakram. Diameter zona bening (cm) merupakan uji positif yang menunjukkan aktivitas fibrinolitik dari ekstrak kasar protein.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian merupakan data kuantitatif yang dijelaskan secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk grafik, tabel, dan foto. Analisis data dilakukan terhadap :

- a. Data isolasi dan identifikasi morfologi makroskopis dan mikroskopis yang hasilnya disajikan dalam bentuk tabel dan sebagai data awal penelitian.
- b. Analisis positif terhadap isolat bakteri yang menghasilkan agen fibrinolitik selama tahapan skrining ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni. Hasil pengukuran rasio antara zona bening dan diameter koloni diperoleh indeks aktivitas enzim, semakin besar nilai indeks aktivitas menunjukkan semakin berpotensi sebagai agen fibrinolitik.
- c. Untuk menduga tentang ukuran protein ekstrak kasar setelah dilakukan pemisahan terhadap SBS, dengan menggunakan teknik ultrafiltrasi. Didasarkan pada pengujian protein, yang masih menunjukkan aktifitas fibrinolitiknya yaitu fase *retentate* (diduga berukuran lebih dari 10 kDa) dan pada fase *permeate* (kurang dari 10 kDa).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Bakteri dari Tanah pada Pembuangan Limbah Tahu

Pada penelitian ini berhasil diperoleh 12 isolat bakteri asal tanah pembuangan limbah tahu. Isolat-isolat tersebut merupakan isolat bakteri yang mampu membentuk endospora. Hal ini dibuktikan dengan kemampuan isolat tersebut untuk tumbuh setelah sampel tanah disterilisasi pada suhu 121⁰ C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Secara umum bakteri yang tidak memiliki endospora akan mengalami kematian setelah disterilisasi. Endospora dibentuk oleh sel bakteri sebagai bentuk pertahanan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim seperti suhu yang tinggi, kekeringan, senyawa kimia beracun (desinfektan, antibiotik), dan radiasi UV (Heryanto, 2012). Endospora banyak dimiliki oleh bakteri dari genus *Bacillus* (Hatmanti, 2000).

Dua belas isolat bakteri tanah hasil isolasi, berdasarkan morfologi makroskopisnya memiliki bentuk koloni, tepi koloni dan elevasi koloni yang bervariasi (Tabel 4.1 dan Lampiran A). Bentuk koloni dari 12 isolat bakteri tanah menunjukkan bahwa 7 isolat berbentuk *circulair*, 4 isolat berbentuk *irregulair*, dan 1 isolat berbentuk *curled* yang diidentifikasi berdasarkan Cappucino dan Sherman (1996). Tepi koloni dari 12 isolat bakteri tanah menunjukkan 9 koloni memiliki tepi koloni *Entire*, 2 koloni *Undulate*, dan 1 koloni memiliki tepi *Erose*. Sedangkan elevasi koloni dari 12 isolat bakteri tanah menunjukkan 6 koloni memiliki elevasi *Effuse*, 5 koloni *Low Convex*, dan 1 koloni berelevasi *Convex*. Sebanyak 10 dari 12 isolat bakteri tanah menunjukkan struktur dalam koloni *opaque* atau tidak tembus cahaya. Sedangkan 2 isolat lainnya memiliki struktur dalam *Transparent* dan *Transculent*. Semua koloni bakteri berwarna putih berdasarkan tabel Panduan Warna Castell-Polychromos 9216. Menurut Hatmanti (2000) jenis *Bacillus* sp. menunjukkan bentuk koloni yang berbeda

Tabel 4.1. Data morfologi isolat bakteri dari tanah aliran pembuangan limbah tahu suhu 30° C

No.	Nama Isolat	Morfologi						
		Makroskopis (umur 24 jam pada media NA)					Mikroskopis	
		Bentuk koloni	Warna koloni	elevasi	Tepi koloni	Struktur Dalam koloni	Bentuk sel	Sifat Gram
1.	GLT 150302	<i>Irregulair</i>	Putih	<i>Low convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
2.	GLT 150303	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Low convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
3.	GLT 150304	<i>Irregulair</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Erose</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
4.	GLT 150305	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Low convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Transculent</i>	Basil	Positif
5.	GLT 150311	<i>Irregulair</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
6.	GLT 150317	<i>Curled</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Undulate</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
7.	GLT 150318	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
8.	GLT 150321	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
9.	GLT 150333	<i>Irregulair</i>	Putih	<i>Effuse</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
10.	GLT 150336	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Low convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
11.	GLT 150342	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Opaque</i>	Basil	Positif
12.	GLT 150346	<i>Circulair</i>	Putih	<i>Low convex</i>	<i>Entire</i>	<i>Transparent</i>	Basil	Positif

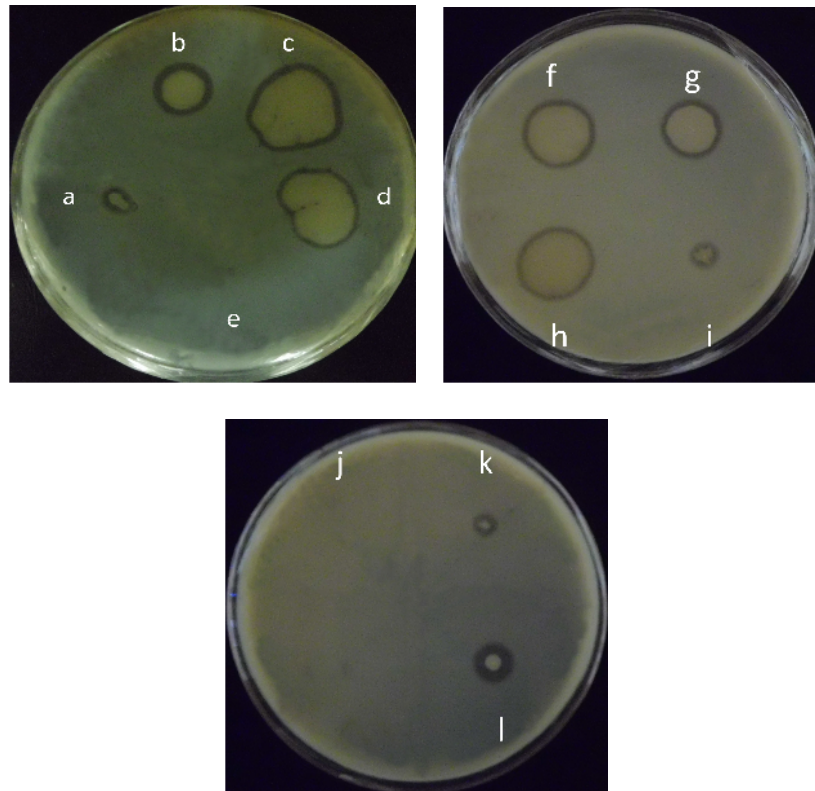
1. Warna koloni diamati dengan menggunakan tabel Panduan Warna Castell-Polychromos 9216.
2. Bentuk koloni, elevasi, tepi koloni dan struktur dalam koloni diidentifikasi berdasarkan Cappucino dan Sherman (1996)

pada media NA. Warna koloni pada umumnya putih sampai putih kekuningan. Tepi koloni bermacam-macam tetapi pada umumnya tidak rata. Permukaannya rata dan tidak berlendir dan cenderung berbutuk, koloni besar dan tidak mengkilat.

Meskipun karakter morfologi makroskopis 12 isolat bakteri menunjukkan bentuk yang bervariasi, ternyata memiliki karakter morfologi mikroskopis yang seragam yaitu selnya berbentuk batang dan Gram Positif. Menurut Madigan *et al.*, (1997) marga *Bacillus* merupakan bakteri yang berbentuk batang, merupakan Gram hmemiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Menurut Brooks *et al.*, (2005) bakteri Gram positif memiliki asam teichoic sebanyak 50% dari berat kering dinding sel. Asam teichoic ini memiliki fungsi untuk menjaga transportasi ion, integritas dinding sel, penggantian choline oleh ethanolamine sehingga resisten terhadap autolisis dan menjaga permeabilitas eksternal.

4.2 Kemampuan Aktivitas Proteolitik isolat

Hasil uji aktivitas proteolitik 12 isolat bakteri tanah aliran pembuangan limbah tahu didapatkan 10 isolat bakteri memiliki aktivitas proteolitik dan 2 isolat lainnya tidak memiliki aktivitas proteolitik. Aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni pada medium *Skim Milk Agar* (SMA) yang mengandung kasein (Gambar 4.2). Ward (1983) dan Fujiwara dan Yamamoto (1987) menyatakan bahwa medium yang mengandung kasein, merupakan substrat yang baik untuk mengisolasi bakteri penghasil enzim protease ekstraseluler. Menurut Pakpahan (2009) kasein merupakan protein susu yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsiun kalseinat. Molekul ini sangat besar dan tidak larut dalam air serta membentuk koloid. Dengan adanya enzim protease ekstraseluler bakteri, kasein ini akan dihidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam amino yang larut. Hilangnya partikel kasein dalam media SMA ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar koloni.



Gambar 4.2 Zona bening isolat bakteri dari tanah aliran pembuangan limbah tahu (a) GLT 150303; (b) GLT 150304; (c) GLT 150305; (d) GLT 150317; (e) GLT 150321; (f) GLT 150318; (g) GLT 150333; (h) GLT 150311; (i) GLT 150302; (j) GLT 150346; (k) GLT 150336; (l) GLT 150342 umur 48 jam suhu 30° c pada media SMA

Dua isolat bakteri yang tidak mempunyai aktivitas proteolitik yaitu isolat GLT 150321 (Gambar 4.2 e) dan GLT 150346 (Gambar 4.2 j). Kedua isolat tersebut mampu tumbuh pada media SMA tetapi tidak mampu membentuk zona bening. Hal ini diduga bahwa enzim protease yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut merupakan enzim protease intraseluler. Menurut Fardiaz (1987) mikroba yang memproduksi enzim ekstraseluler jika ditumbuhkan pada media yang mengandung substrat yang dapat dihidrolisis akan mengeluarkan enzim tersebut disekitar koloninya dan akan menghidrolisa subtrat disekeliling koloni. Semakin besar zona bening yang dihasilkan berarti semakin besar pula kemampuan isolat tersebut untuk menghasilkan enzim protease ekstraseluler (Yusmarini *et al.*, 2009).

Sebanyak 10 isolat bakteri tanah pembuangan limbah tahu memiliki aktivitas proteolitik. Secara umum indeks aktivitas proteolitik isolat bakteri berkisar dari 1.00 - 2.26 (Tabel 4.2). isolat bakteri tanah yang memiliki indeks aktivitas proteolitik tertinggi adalah isolat GLT 150342 dengan indeks aktivitas proteolitik sebesar 2.26. Isolat GLT 150342 memiliki indeks aktivitas proteolitik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan indeks aktivitas proteolitik isolat bakteri asal tanah rawa Indralaya yang berkisar antara 1.00 sampai 2.00 (Baehaki *et al.*, 2011).

Tabel 4.2 Indeks aktivitas proteolitik isolat bakteri dari tanah aliran pembuangan limbah tahu umur 48 jam suhu 30° C pada media SMA

No.	Nama Isolat	Indeks aktivitas Enzim Proteolitik	Keterangan
1.	GLT 150342	2.26	+
2.	GLT 150336	1.80	+
3.	GLT 150303	1.60	+
4.	GLT 150302	1.57	+
5.	GLT 150304	1.38	+
6.	GLT 150333	1.20	+
7.	GLT 150305	1.15	+
8.	GLT 150318	1.15	+
9.	GLT 150311	1.14	+
10.	GLT 150317	1.11	+
11.	GLT 150321	1.00	-
12.	GLT 150346	1.00	-

Tanda + menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu membentuk zona bening.

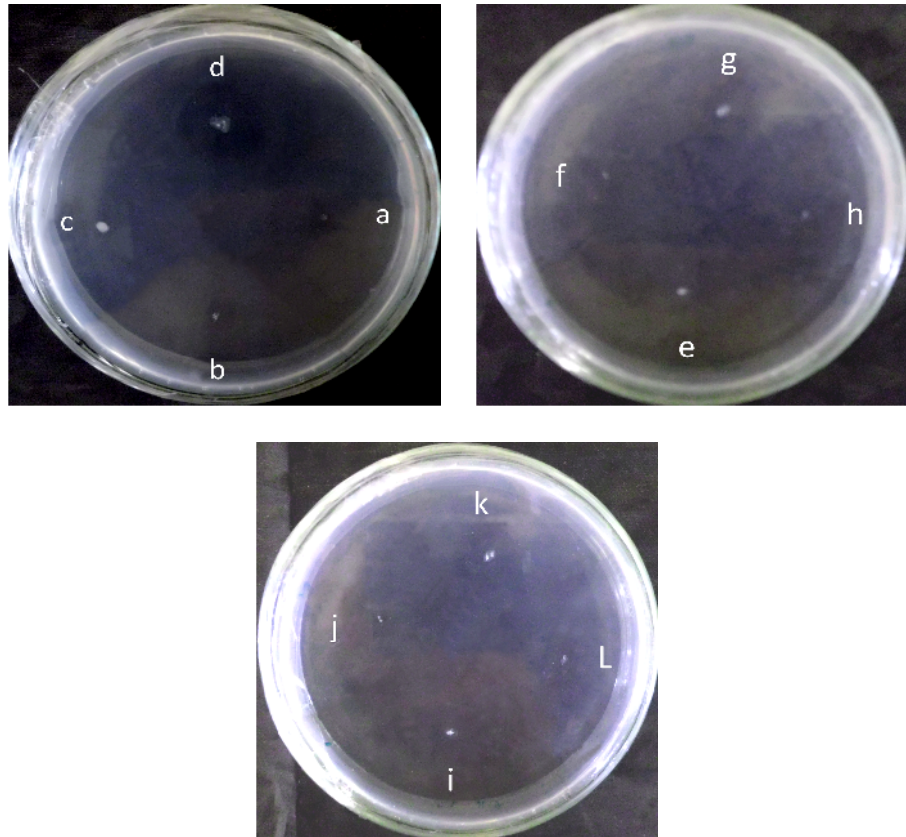
Tanda - menunjukkan bahwa isolat bakteri tidak mampu membentuk zona bening.

Perbedaan indeks aktivitas protease pada setiap isolat diduga masing-masing isolat berbeda spesiesnya yang ditunjukkan dengan perbedaan makroskopis setiap isolat, sehingga potensi masing-masing isolat untuk mrnguraikan substrat yang terdapat didalam media juga berbeda (Sudiyana *et al.*, dalam Haniyah, 2008).

4.3 Kemampuan Aktivitas Fibrinolitik Isolat

Hasil uji aktivitas fibrinolitik terhadap 10 isolat bakteri yang mempunyai aktivitas proteolitik menunjukkan bahwa 9 isolat yang di uji mempunyai aktivitas fibrinolitik dan 1 isolat yaitu isolat GLT 150318 tidak mempunyai aktivitas

fibrinolitik. Isolat GLT 150318 mampu tumbuh tetapi tidak mampu membentuk zona bening pada media fibrin (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Zona bening Isolat Bakteri dari Tanah Aliran Pembuangan Limbah Tahu (a) GLT 150302; (b) GLT 150303; (c) GLT 150304; (d) GLT 150305; (e) GLT 150311; (f) GLT 150317; (g) GLT 150318; (h) GLT 150333; (i) GLT 150321; (j) GLT 150336; (k) GLT 150342; (l) GLT 150346 Umur 48 Jam Suhu 30° C pada Media Fibrin

Hasil pengukuran aktivitas fibrinolitik terhadap 10 isolat bakteri tanah secara umum menunjukkan indeks aktivitas fibrinolitik berkisar dari 1.00 sampai 5.20 (Tabel 4.3). Tiga isolat bakteri menunjukkan aktivitas proteolitik lebih besar dari 2 yaitu isolat GLT 150311, GLT 150342 dan GLT 150305 dengan indeks aktivitas berturut turut sebesar 3.66, 5.00 dan 5.20. Isolat GLT 150305 mempunyai nilai indeks aktivitas enzim fibrinolitik tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa isolat GLT

150305 memiliki spesifitas terhadap substrat fibrin yang tinggi daripada isolat lainnya. Indeks aktivitas enzim yang dihasilkan oleh GLT 150305 yaitu sebesar 5.2 lebih besar jika dibandingkan dengan indeks aktivitas fibrinolitik isolat *Bacillus licheniformis* KJ-31 yaitu sebesar 2.15 yang diisolasi dari makanan fermentasi tradisional korea, *Jeot-gal* (Hwang *et al.*, 2007).

Tabel 4.3 Indeks aktivitas fibrinolitik isolat bakteri dari tanah aliran pembuangan limbah tahu umur 24 jam suhu 30° c pada Media Fibrin

No.	Nama Isolat	Indeks aktivitas Enzim Fibrinolitik	Keterangan
1.	GLT 150305	5.20	+
2.	GLT 150342	5.00	+
3.	GLT 150311	3.66	+
4.	GLT 150302	2.00	+
5.	GLT 150303	2.00	+
6.	GLT 150304	2.00	+
7.	GLT 150336	2.00	+
8.	GLT 150333	1.66	+
9.	GLT 150317	1.50	+
10.	GLT 150318	1.00	-

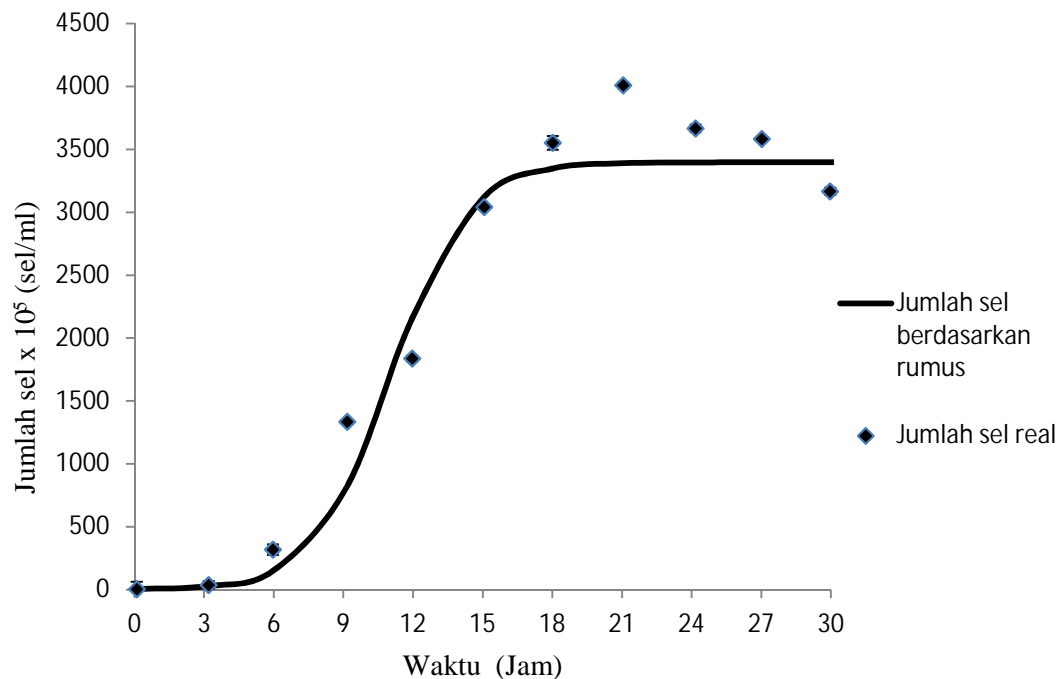
1. Isolat nomor 1 merupakan isolat dengan indeks aktivitas enzim tertinggi dan isolat yang di uji lebih lanjut untuk produksi ekstrak kasar protein fibrinolitik.
2. Tanda + menunjukkan bahwa isolat bakteri mampu membentuk zona bening.
3. Tanda – menunjukkan bahwa isolat bakteri tidak mampu membentuk zona bening.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan proteolitik tinggi tidak diikuti oleh kemampuan fibrinolitik yang tinggi pula. Isolat bakteri GLT 150318 yang memiliki aktivitas proteolitik sebesar 1.15 (Tabel 4.2) ternyata tidak memiliki aktivitas fibrinolitik (Tabel 4.3). Isolat GLT 150342 yang memiliki indeks proteolitik tertinggi yaitu sebesar 2.26 ternyata memiliki aktivitas fibrinolitik sebesar 5.00. Sedangkan isolat GLT 150305 yang memiliki aktivitas proteolitik yang rata-rata rendah yaitu memiliki indeks aktivitas proteolitik sebesar 1.15 ternyata memiliki aktivitas fibrinolitik yang paling tinggi yaitu sebesar 5.20. Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan enzim protease memiliki spesifitas aktivitas proteolitik yang berbeda terhadap berbagai substrat. Substrat kasein pada media SMA merupakan protein umum yang mampu dipecah oleh bakteri sehingga bakteri yang mampu memecah

kasein belum tentu spesifik mampu memecah protein fibrin. Penelitian yang dilakukan oleh Hwang *et al.*, (2007) terhadap ekstrak enzim dari isolat *Bacillus licheneformis* KJ-31 yang diperoleh dari makanan fermentasi tradisional korea, *Jeotgal*, menunjukkan bahwa mampu menghidrolisis substrat fibrin dan fibrinogen dengan sangat baik tetapi tidak mampu menghidrolisis substrat kasein dan skim milk. Kespesifikan suatu enzim terhadap substrat terlihat dari substrat yang mampu didegradasi oleh enzim tersebut. Semakin sedikit jenis substrat yang dapat didegradasi semakin spesifik pula enzim tersebut (Sajuthi *et al.*, 2010)

4.4 Kurva Pertumbuhan Isolat GLT 150305

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mengetahui fase-fase pertumbuhan bakteri yaitu fase adaptasi, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian. Kurva pertumbuhan isolat bakteri GLT 150305 disajikan pada Gambar 4.4. Kurva tersebut menunjukkan bahwa hanya ada 3 fase pertumbuhan yaitu fase adaptasi, fase eksponensial dan fase stasioner. Isolat GLT150305 berada dalam fase adaptasi selama ± 6 jam. Jumlah sel isolat GLT 150305 pada jam ke-0 sebesar 4.5×10^5 sel/ml dan pada jam ke-6 mencapai 3.18×10^7 sel/ml. Waktu adaptasi dari GLT150305 termasuk singkat. Menurut Volk dan Wheeler (1993) bahwa pada fase adaptasi (lag) ini berlangsung selama 1 jam hingga beberapa hari bergantung pada jenis bakteri, umur biakan dan nutrien yang terdapat dalam medium. Waktu inkubasi yang singkat disebabkan karena medium yang digunakan sebagai inokulum (*starter*) untuk pertumbuhan awal bakteri sama dengan medium produksi, oleh karena itu usia sel relatif homogen sehingga fase adaptasi relatif lebih singkat.

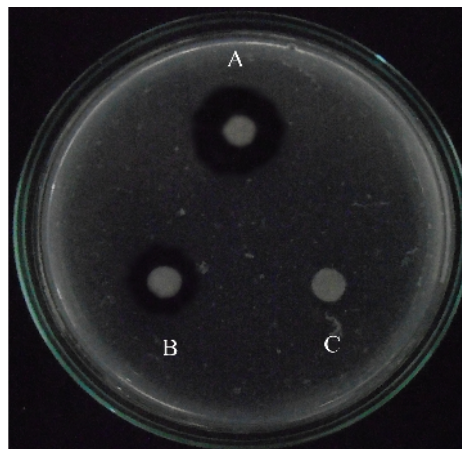


Gambar 4.4 Kurva pertumbuhan isolat bakteri GLUT 150305 dari tanah aliran pembuangan limbah tahu

Isolat bakteri GLUT 150305 memasuki fase eksponensial pada jam ke-6 sampai jam ke-15 dan memasuki fase stasioner pada jam ke-18 (Gambar 4.4 dan Lampiran C). Pada fase eksponensial sel mulai aktif membelah dengan kecepatan yang sangat cepat dan sel banyak menghasilkan zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhannya. Waktu panen produksi ekstrak kasar protein isolat GLUT 150305 dipilih pada jam ke-9 dengan jumlah sel mencapai $1,83 \times 10^8$ sel/ml. Pemilihan waktu panen produksi ekstrak kasar protein selama 9 jam dikarenakan pada jam ke-9 sel berada pada pertengahan fase eksponensial sehingga sel berada pada kecepatan maksimum untuk membelah dan menghasilkan metabolit sekunder yang tidak terlalu banyak. Produksi enzim hampir maksimal sebelum fase stasioner awal (Kuberan *et al.*, 2010)

4.5 Produksi Ekstrak Kasar Protein dan Uji Aktivitas Fibrinolitik

Hasil produksi ekstrak protein kasar fibrinolitik setelah ditumbuhkan selama 9 jam dengan suhu 30° C pada 10 ml media LB dan dipekatkan menggunakan membran ultrafiltrasi didapatkan dua fase cairan yaitu *retentate* (berat molekul >10 kDa) sebanyak 100 µL dengan konsentrasi protein sebesar 0.0039 mg/ml dan *permeate* (berat molekul <10 kDa) sebanyak ± 7 mL dengan konsentrasi protein sebesar 0.0018 mg/ml. Kurva standar protein disajikan pada Lampiran D.



Gambar 4.5 Aktivitas fibrinolitik ekstrak protein kasar bakteri GLT 150305 dari sampel, (a) *retentate*; (b) *permeate*; dan (c) supernatan bebas sel pada Media Fibrin Agar (*Fibrin Plate Assay*)

Gambar 4.5 menyajikan hasil analisis aktivitas fibrinolitik secara semikuantitatif pada *retentate*, *permeate* dan supernatan bebas sel (SBS). Gambar tersebut menunjukkan bahwa *retentate* yang diteteskan keatas membran cakram berdiameter 0.55 cm sebanyak 5 µL memiliki aktivitas enzim sebesar 1.74 cm dan pada SBS sebesar 1.1 cm, sedangkan *permeate* tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Enzim fibrinolitik terutama dari mikroba khususnya bakteri memiliki berat molekul lebih besar dari 10 kDa sesuai dengan hasil penelitian Wang *et al.*, (2006) *Bacillus substilis* DC33 memiliki berat molekul 30 kDa, *Bacillus substilis* YF38 (28kDa) (Liang *et al.*, 2007), *Bacillus substilis* BK17 (31 kDa) (Jeong *et al.*, 2001), dan *Bacillus substilis* IMR-NK1 (31.5 kDa) (Chang *et al.*, 2000). Pada SBS mampu

menghidrolisis fibrin dikarenakan masih mengandung *retentate* dan *permeate* yang mampu menghidrolisis fibrin, sedangkan pada *retentate* memiliki aktivitas tertinggi karena protein yang terdapat di *retentate* memiliki berat molekul diatas 10 kDa yang dimungkinkan terdapat enzim protease fibrinolitik yang mampu memecah fibrin. Pada *permeate* tidak memiliki aktivitas fibrinolitik dikarenakan berat molekul protein yang terkandung didalamnya lebih kecil dari 10 kDa.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Hasil skrining terhadap 12 isolat bakteri asal tanah aliran pembuangan limbah tahu diperoleh 1 isolat bakteri hanya memiliki aktivitas proteolitik saja dan 9 isolat memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik.
2. Isolat GLT 150342 memiliki aktivitas proteolitik tertinggi sebesar 2.26 dan aktivitas fibrinolitik sebesar 5.00. Sedangkan isolat GLT 150305 merupakan isolat yang mempunyai aktivitas proteolitik sebesar 1.15 tetapi mempunyai aktivitas fibrinolitik tertinggi sebesar 5.2.
3. Protein ekstrak kasar fibrinolitik isolat GLT 150305 hanya terdapat pada fase *retentate* dan SBS dengan aktivitas enzim fibrinolitik berdasarkan diameter zona bening berturut-turut sebesar 1.74 cm dan 1.1 cm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut isolat yang telah berhasil diisolasi dengan pemurnian enzim lebih lanjut untuk memperoleh enzim fibrinolitik murni dengan metode analisis zimografi dan kromatografi kolom.

DAFTAR PUSTAKA

Buku

- Arifin, J., & Utami, F. V. 2012. *Eksplorasi ms. Excel untuk Simulasi Bisnis*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Bollag, D. M., Michael D. R., & Stuart J. E. 1996. *Protein Methods*. Second Edition. New York: Willey-Liss.
- Brooks, G. F, Butel, J. S. & Morse, S. A. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Jilid 1*. Alih bahasa Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L. Jakarta: Salemba Medika.
- Cappucino, J. G., & Sherman, N. 1996. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Fourth Edition. California: The Benjamin Cumming Publishing, Inc.
- EMDI-Bapedal. 1994. *Limbah Cair Berbagai Industri di Indonesia*. Pengendalian dan Baku Mutu: EMDI Bapedal.
- Escobar, C. E., Harmaening, D. M., Joiner, M. D. M., Simmons, V. L. & Smithmoore, K. M. 2002. "Introduction to Hemostasis". Dalam Harmaening D.M. (Ed). *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. (Edisi keempat). Philadelphia: FA Davis.
- Fardiaz, S. 1987. *Mikrobiologi Pangan I*. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Jackson, C. M. 1988. "The Mammalian Blood Coagulation System". Dalam Bergmeyer, J., Bergmeyer, H.U., M. Graa, Fritz, H. (Ed). *Method of Enzymatic Analysis*. (Edisi ketiga). Florida: Verlag Chemie Weinheim.
- Katzung, B. G. 2006. *Basic and Clinical Pharmacology*. (Edisi Kesepuluh). San Fransisco: McGraw-Hill.
- Martini, F. 2006. *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. San Fransisco: Benjamin Cumming.
- Meyrath. J., & Volavseck, U. 1975. *Production of Microbial enzyme in Food Processing*. Dalam Reed, G (Ed). New York: Academic Press.
- Olson, J. 2004. *Clinical Pharmacology: Made Ridiculously Simple*. Alih bahasa Chandranata, L., dan Mandera, L. I. (Ed). *Belajar Mudah Farmakologi*. Jakarta: EGC.

- Madigan, M.T., Martinko, J. M., & Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganism*. Eighth Edition. Upper Saddle River: Prentice hall
- Philip, J., Murray, P., & Kirk, P. 2001. *The Biology of Diseases*. (Edisi Kedua). Oxford: Blackwell Science.
- Price, S., & Wilson, L. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. (Edisi keenam). Jakarta: EGC.
- Rosmiati, H. & Gan, V. H. S. 1995. Antikoagulan, Antitrombosit, Trombolitik dan Hemostatik. Dalam Ganiswata, S.G. (Ed). *Farmakologi dan Terapi*. (Edisi keempat) . Jakarta: Bagian Farmakologi FK-UI.
- Schlegel, G. H. 1995. *General Microbiology*. Seventh Edition. Inggris: Cambridge University.
- Sugiharto. 1994. *Dasar-Dasar Pengolahan Air Limbah*. Jakarta: UI Press.
- Suhartono, M. T. 1992. *Protease*. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Tjay, T. H., & Rahardja, K. 2002. *Obat-obat Penting*. (Edisi kelima). Jakarta: Elex Media Komputino.
- Ward, O. P. 1983. Proteinases. Dalam Fogarty, W. (Ed). *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: Applied Science.
- WHO [World Health Organization]. 2008. *The world health report 2008: primary health care now more than ever*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication.
- Volk, W. A., & Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi dasar* Jilid 1. (Edisi 5). Jakarta : Penerbit Erlangga.

Tidak Diterbitkan

- Heryanto, T.E. 2012. “Penentuan Aktivitas Amilase Kasar Termofil *Bacillus Subtilis* Isolat Gunung Darajat, Garut, Jawa Barat.” Skripsi. Jakarta: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Nurhasan., & Pramudyanto, B.B. 1991. “Penanganan Air Limbah Tahu”. Jakarta: Yayasan Bina Karya Lestari.

- Pakpahan, R. 2009. "Isolasi Bakteri dan Uji Aktifitas protease Termofilik Dari Sumber Air Panas Sipoholon Tapanuli Utara Sumatera Utara". Tesis: Universitas Sumatera Utara Medan.
- Pohan, N. 2008. "Pengolahan Industri Cair Limbah Tahu dengan Proses Biofilter Aerobik". Tesis. Medan: Sekolah Pasca Sarjana Universitas Sumatera Utara.
- Retnosari, K. D. 2008. "Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Proteolitik pada Limbah Industri Tempe Daerah Sanan Kotamadya Malang". Skripsi. Malang: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Sudiyana, I. M., Rahayu, R. D., Imanuddin, H., Rahmansyah. 2001. "Cellulolitic Bacteria of Soil Gunung Halimun Nasional Park". Dalam Haniyah, L. 2008. *Skrining Bakteri Proteolitik Asal limbah Cair Pengalengan Ikan serta Produksi Protease pada Media Tepung Ikan*. Skripsi. Jember : jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember.
- Yuningsih, S. 2006. "Isolasi dan Pencirian Protease dari Bakteri Isolat Nato". Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor (IPB).

Terbitan Berkala

- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Alkalin Termostabil. *Buletin Plasma Nutfah*, 9 (2):38-44.
- Astrup, T., & S. Mullertz. 1952. The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40: 346–351.
- Baehaki, A., Rinto., Budiman, A. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Tanah Rawa Indralaya, Sumatera Selatan. *J.Tekno dan Industri Pangan*, 22 (1): 37-42.
- Banerjee, A., & Chisti, Y. 2003. Streptokinase-A Clinically Useful Trombolytic Agent. *J. Biotech. Adv.*, 2: 287-307.
- Baruah,D., Dash, R.N., Chaudhari, M. R., & Kadam,S.S. 2006. Plasminogen Activators: A Comparison. *Vascular Pharmacol.*, 44: 1-9.
- 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.Agr. Food Chem.*, 48: 3210-3216.

- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., & Lumyong, S. 2001. Characterization of Proteases of *Bacillus* Strain 38 Isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand. *Sci. Asia.*, 28:241-248.
- Chen, H. M., Guan, A. L., & Markland, F. S. 1991. Immunological Properties of the Fibrinolytic Enzyme (Fibrolase) from Southern Copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*) Venom and Its Purification by Immunoaffinity Chromatograph. *Toxicon*, 29:683-694.
- Choi, N. S., Yoo, K. H., Hahm, J. H., Yoon, K. S., Chang, K. T., Hyun, B. H., Maeng, P. J., & Kim, S. H. 2005. Purification and Characterization of a New Peptidase, Bacillopeptidase DJ-2, Having Fibrinolytic Activity: Produced by *Bacillus* Sp. DJ-2 from doenjang. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 72-79.
- Collen, D., & Lijnen, H. R. 1994. Staphylokinase a Fibrin-Specific Plasminogen Activator with Therapeutic Potential. *Blood*. 84 (3): 680-686.
- Fujiwara, N. & Yamamoto, K. 1987. Production of Alkaline Protease in Low Cost Medium by Alkalophilic *Bacillus* sp. and Properties of the Enzyme. *J. Ferment. Technol.*, 65(3): 345-348.
- Hatmanti, A. 2000. Pengenalan *Bacillus* spp. *Oseana*. 25 (1): 31-41.
- Hwang, K., Choi, K., Kim, M., Park, C., & Cha, J. 2007. Purification and Characterization of a New Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, Isolated from Korean Traditional *Jeot-gal*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:1469-1476
- Jeong, Y. K., Park, J. U., Baek, H., Park, S. H., Kong, I. S., Kim, D. W., & Joo, W. H. 2001. Purification and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:89-92
- Jeong, Y. K., Kim, J. H., Gal, S. W., Kim, J. E., Park, S. S., Chung, K. T., Kim, Y. H., Kim, B. W., & Joo, W. H. 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, C. W., Park, S. G., Cho, S., Lee, D. H., Myung, P. K., & Park, B. C. 2005. Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.*, 39: 1-7.

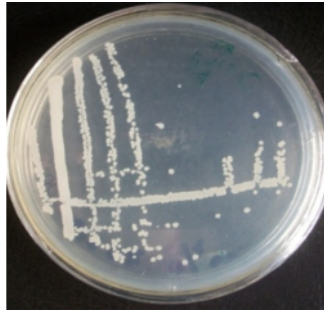
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., & Lee, S. 1996. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from *Chungkook-Jang*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 (7): 1488-2482.
- Kim, S. B., Lee, D. W., Cheigh, C. I., Choe, E. A., Lee, S. J., Hong, Y. H., Choi, H. J., Pyun, Y. R. 2006. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Subtilisin-like Protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian Fermented Soybean, *Tempeh*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 436-444.
- Kim, S. H., & 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.
- Kuberan, T., Sangaralingam, S., & Thirumalai A., V. 2010. Isolation and Optimization of Protease Producing Bacteria from Halophilic Soil. *J. Biosci. Res.*, 1(3): 163-174.
- Liang, X., Jia, S., Sun, Y., Chen, M., Chen, X., Zhong, J., & Huan, L. 2007. Secretory Expression of Nattokinase from *Bacillus subtilis* YF38 in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.*, 37: 187-194.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., & Maruyama, M. 1991. A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn. J. Physiol.*, 41: 461-472.
- Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R., & Zhang, Y. 2003. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus amynoliquefaciens* DC-4 screened from douche, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Phys. B* 134: 45-52.
- 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.
- Reddy, D.S. 1998. Newer thrombolytic drugs for acute myocardial infarction. *Indian J. Exp. boil.*, 36 : 1-15.
- Sajuthi, D., Suparto, Yanti, I., dan Praira, W. 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., & Muraki, H. 1987. A Novel Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto: A Typical and Popular Soybean Food in the Japanese Diet. *Experientia*, 43: 1110-1111.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., & Muraki, H. 1990. Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of Nattokinase. *Acta. Haematol.*, 84 (3): 139-43.
- Wang, C. T., Ji, B. P., Nout, R., Li, P. L., & Chen, L. F. 2006. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, Isolated from Chinese Traditional *Dou-chi*. *J. Ind. Microbiol. Biot*, 33: 750-758.
- Yang, J. L., Kim, H. S., Hong, J. H., & Song, H. S. 2006. Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Cheongguk-jang*. *J. Food Sci. Nutr.*, 11: 127-132.
- Yusmarini., Indrati R., Utami T., & Marsono Y. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik dari Susu Kedelai yang Terfermentasi Spontan. *Jurnal Natur Indonesia*, 12(1): 28-33.

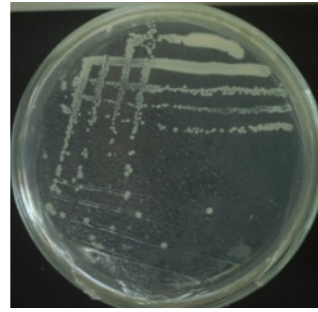
Media Elektronik

- Archer dan Kirsop. 1991. Dalam Said, N. I., & Wahjono, H. D. 1999. *Tekhnologi Pengolahan Limbah Tahu-Tempe dengan Proses Biofilter Anaerob dan Aerob*. Jakarta: BPPT. <http://environmentalpublic.blogspot.com>. [08 Januari 2013].
- BPPT. 1997. *Tekhnologi Pengolahan Limbah Tahu-Tempe dengan proses Biofilter Anaerob dan Aerob*. Jakarta: BPPT. <http://environ.bppt.go.id> [08 Januari 2013].
- Khalilullah, S. A. 2011. *Penggunaan Antiplatelet (Aspirin) pada Akut Stroke Iskemik*. Fakultas Farmasi Universitas Syiah Kuala. [serial on line]. Alfinzone.wordpress.com. [20 September 2012].
- Muchtadi, T. R. Tanpa Tahun. *Membrane Technology*. <http://xa.yimg.com>. [11 Desember 2012].
- Polprasert. 1983. Dalam Said, N. I., dan Wahjono, H. D. 1999. *Tekhnologi Pengolahan Limbah Tahu-Tempe dengan proses Biofilter Anaerob dan Aerob*. Jakarta: BPPT. <http://environmentalpublic.blogspot.com>. [08 Januari 2013].

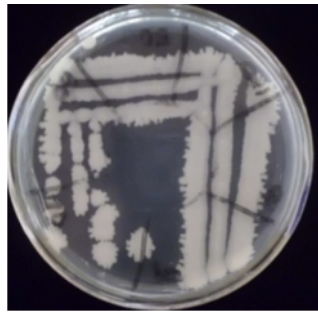
LAMPIRAN A. MORFOLOGI KOLONI ISOLAT BAKTERI ASAL TANAH PEMBUANGAN LIMBAH TAHU UMUR 24 JAM INKUBASI 30° C PADA MEDIA NA



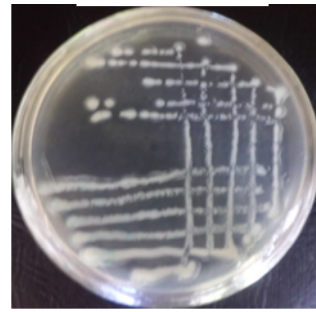
A



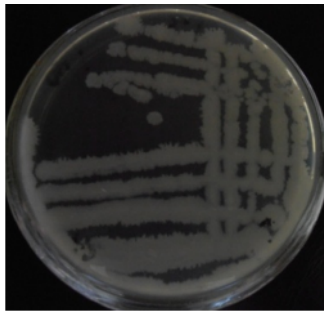
B



C



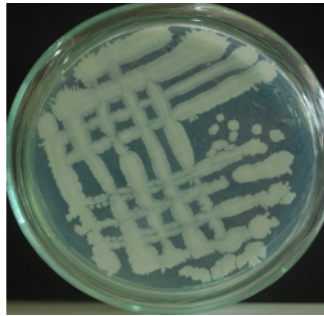
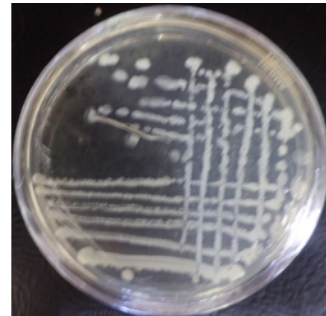
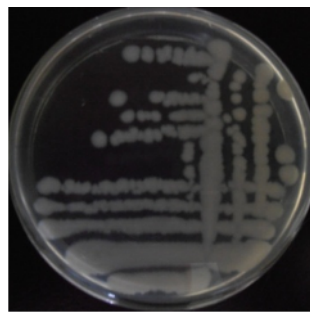
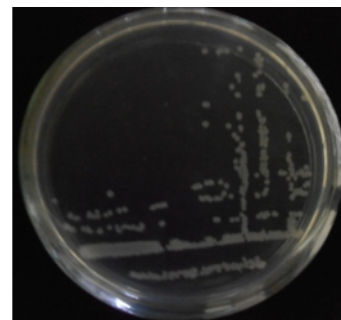
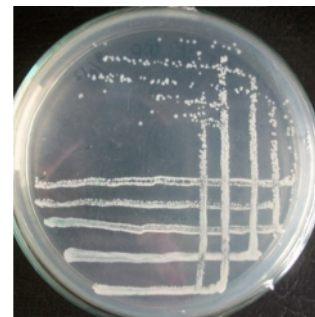
D



E



F

**G****H****I****J****K****L**

Keterangan :

A : GLT 150302;
 B : GLT 150303;
 C : GLT 150304;
 D : GLT 150305;
 E : GLT 150311;
 F : GLT 150317

G : GLT 150318;
 H : GLT 150321;
 I : GLT 150333;
 J : GLT 150336;
 K : GLT 150342;
 L : GLT 150346

LAMPIRAN B. KOMPOSISI BAHAN KIMIA

B.1 Komposisi Bahan Kimia untuk Pembuatan Media

Media	Bahan	Komposisi
<i>Nutrient Agar</i> padat	<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 Broth</i> cair	<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> padat	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
Media Fibrin Agar Padat	<i>Bovine fibrinogen</i> 0,1% dalam 0,05 M PBS pH 7,4 (b/v)	0,01 gr/10 ml
	<i>Bovine trrhombine</i> dalam 0,5 M CaCl ₂ (b/v)	0,2 mg/0,2 ml
	<i>Bacto agar</i> 2% (b/v)	0,2 gr

B.2 Komposisi Larutan

Larutan	Bahan	Komposisi
larutan 0,5 M CaCl ₂ (b/v)	CaCl ₂	5,549 gr
	Aquadest	100 ml
larutan 50 mM PBS pH 7,4 (b/v)	KCl	0,373 gr
	NaCl	0,267 gr
	KH ₂ PO ₄	0,68 gr
	NaHPO ₄	0,71 gr
	Aquadest	100 ml
larutan buffer phospat 50 mM pH 6,5 (v/v)	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (b/v)	0,959 gr dilarutkan dalam 140 ml akuades
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (b/v)	1,253 gr dilarutkan dalam 70 ml akuades.
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	137 ml
	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O.	63 ml : adjust pH 6.5
larutan garam fisiologis 0,85%	Aquades	1000 ml
	NaCl	8.5 gr

LAMPIRAN C. PERHITUNGAN JUMLAH SEL ISOLAT BAKTERI GLT 150305

Jam	Jumlah	Rerata	SD	%kesalahan	Kepadatan Sel *10 ⁵ ml	Nt dihitung berdasarkan rumus	Nt-Jumlah real dikuadratkan
0.10000	13.5	4.5	2.65	58.79	4.5	4.5000	0.0
3.20000	110.5	36.8	11.90	32.30	36.8	7.9657	833.34
5.96666	956.5	318.8	133.52	41.88	318.8	13.2607	93374.62
9.16666	4002.3	1334.1	124.60	9.34	1334.1	23.9100	1716597.87
11.96666	5510.0	1836.7	455.45	24.80	1836.7	40.0488	3227835.64
15.06666	9120.0	3040.0	446.85	14.70	3040.0	70.8927	8815598.16
18.01666	10655.0	3551.7	1951.48	54.95	3551.7	122.0710	35795439.13
21.05000	12025.0	4008.3	980.06	24.45	4008.3	213.4476	14401158.09
24.16666	11000.0	3666.7	1136.15	30.99	3666.7	378.9969	10808772.36
27.01666	10750.0	3583.3	321.46	8.97	3583.3	640.6877	8659163.35
29.96666	9500.0	3166.7	857.81	27.09	3166.7	1103.2081	4257861.06
32.96666	7580.0	2526.7	498.56	19.73	2526.7	1917.2058	371442.60
			μ		0.18		
			K		3397.3	Summe	89216811.384
			td (d)		3.76		
			td (h)		90.3		

Satu koloni tunggal bakteri ditumbuhkan pada media LB cair 10 ml (sebagai starter) dan di inkubasi 12 Jam 500 μL kultur yang dimasukkan ke dalam 50 mL media LB cair.

- Sel bakteri diamati dengan menggunakan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 1000X
- Jumlah sel bakteri di hitung dengan menggunakan heamacytometer
- Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan :

T= waktu ke t

N₀ = Jumlah sel pada waktu t₀

μ= kecepatan pertumbuhan

t₀ = waktu ke 0

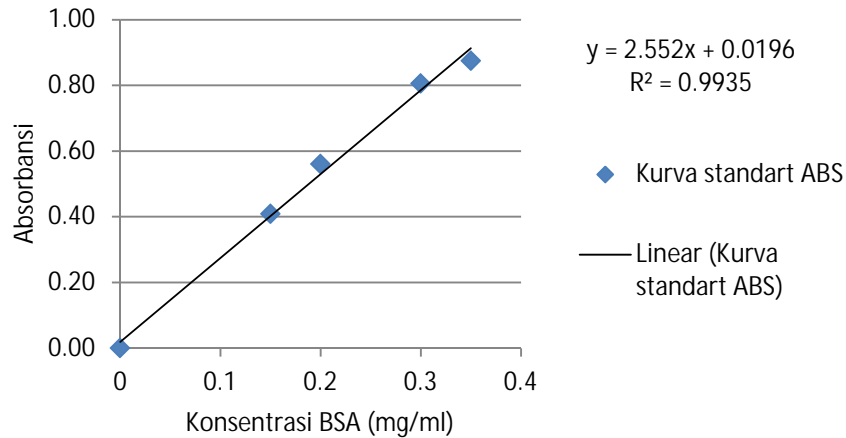
N_t = Jumlah sel pada waktu ke t

LAMPIRAN D. PENENTUAN KONSENTRASI PROTEIN

D.1 Penentuan Kurva Standar Protein Menggunakan Metode Bradford

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

D.2 Kurva Standar Protein



Keterangan:

Didapatkan Persamaan Linear $Y = 2,552x + 0,019$

Y = Absorbansi pada panjang gelombang 595 nm

X = konsentrasi protein (mg/ml)

D.3 Penentuan Konsentrasi Protein Sampel

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi protein (mg/ml)
fase permeate	0,249	0,0018
fase retentate	0,515	0,0039