

## **Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri *Bacillus cereus* yang Diisolasi dari Air Hutan Mangrove Maroon EduPark Semarang secara *In Vitro***

### **Crude Extract Activity of Fibrinolytic Enzyme *Bacillus cereus* Isolated from Mangrove Forest Water Maroon EduPark Semarang *In Vitro***

Rizky Bimantara HA, Desi Purwaningsih, Ana Indrayati\*  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta  
Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah 57127  
\*Email: anaindrayati2020@gmail.com

(tanggal diterima: 06-08-2021, tanggal disetujui: 07-04-2022)

#### **INTISARI**

Enzim fibrinolitik merupakan enzim yang bekerja dengan cara mendegradasi fibrin dalam bekuan darah. Enzim fibrinolitik dihasilkan oleh banyak organisme, salah satunya adalah bakteri *Bacillus cereus* yang berasal dari air hutan mangrove Maroon EduPark Semarang. Isolasi enzim fibrinolitik dari bakteri sangat penting dilakukan karena bakteri mudah ditumbuhkan, memiliki waktu generasi yang cepat, tidak memerlukan lahan yang luas untuk kultivasi, serta mudah dimodifikasi secara genetik sehingga akan lebih menguntungkan secara ekonomi. Selain itu enzim fibrinolitik dari bahan alam memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat fibrinolitik sintetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* dari air hutan mangrove Maroon EduPark Semarang dalam melisisikan bekuan darah secara *in vitro*.

Penelitian diawali dengan konfirmasi keberadaan gen penyandi enzim fibrinolitik dari bakteri *B. cereus* menggunakan *popular resources* 'nucleotide' NCBI, identifikasi morfologi bakteri pada media agar darah, pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, pengujian katalase dan koagulase. Isolasi ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* dilakukan dengan ekstraksi enzim. Kadar protein ekstrak kasar enzim ditetapkan menggunakan metode Bradford dan uji aktivitas fibrinolitik secara *in vitro* menggunakan media plat fibrin dengan kontrol positif nattokinase. Zona bening yang dihasilkan menunjukkan kemampuan ekstrak enzim dalam mendegradasi fibrin.

Hasil identifikasi gen bakteri *B. cereus* menggunakan data base NCBI terdaftar sebagai gen *AprE*. Hasil identifikasi pewarnaan Gram dan endospora, *B. cereus* merupakan bakteri Gram positif dan mempunyai endospora. Identifikasi bakteri pada media agar darah menunjukkan bahwa *B. cereus* merupakan kelompok  $\beta$ -hemolisis. Hasil uji katalase dan koagulase menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan enzim katalase dan koagulase. Kadar protein ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* yang didapat sebesar 19,63 mg/mL. Aktivitas fibrinolitik pada konsentrasi 20, 40, 80% berturut-turut sebesar 2,54; 6,11; dan 7,94 mm. Berdasarkan hasil diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* berpotensi untuk dikembangkan sebagai agen fibrinolitik alami.

Kata kunci: *Bacillus cereus*; nattokinase; fibrinolitik; plat fibrin; Bradford

#### **ABSTRACT**

Fibrinolytic enzymes are enzymes that work by degrading fibrin in blood clots. Fibrinolytic enzymes are produced by many organisms, one of which is the bacterium *Bacillus cereus* from the water of the Maroon EduPark mangrove forest, Semarang. Isolation of fibrinolytic enzymes from bacteria is very important because bacteria are easy to grow, have a fast generation time, do not



require a large area for cultivation, and are easily genetically modified so that it will be more economically profitable. In addition, fibrinolytic enzymes from natural ingredients have fewer side effects than synthetic fibrinolytic drugs. This study aims to determine the activity of the crude extract of the fibrinolytic enzyme *B. cereus* in lysis blood clots in vitro.

The study began with confirmation of the presence of genes encoding fibrinolytic enzymes from bacteria *B. cereus* uses NCBI's popular resources 'nucleotide', identification of bacterial morphology in blood agar media, Gram staining, endospore staining, catalase and coagulase testing. Isolation of crude extract of fibrinolytic enzyme *B. cereus* is carried out by enzyme extraction. Protein concentration were determined using Bradford method and fibrinolytic activity test in vitro using fibrin plate media with nattokinase as positive control. The resulting clear zone shows the ability of the enzyme extract in degrading fibrin

The results of the identification of the *B. cereus* bacterial gene uses the NCBI data base registered as the AprE gene. The results of the identification of gram and endospore staining, *B. cereus* is a Gram-positive bacterium and has endospores. Identification of bacteria on blood agar media indicates that *B. cereus* represents the group of the  $\beta$ -hemolysis. Catalase and coagulase test results show that the bacteria produce catalase and coagulase enzymes. Total protein concentration from crude extract of *B. cereus* obtained at 19.63 mg/mL. Fibrinolytic activity at concentrations of 20, 40, 80% was 2.54; 6.11; and 7.94 mm respectively. Based on the above results it can be concluded that the crude extract of fibrinolytic enzyme *B. cereus* has the potential to be developed as a natural fibrinolytic agent.

Keywords: *Bacillus cereus*; nattokinase; fibrinolytic; fibrin plate; Bradford

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit atherotrombosis seperti infark miokard dan infark serebral merupakan penyakit yang terjadi akibat sumbatan bekuan darah (trombus) pada pembuluh darah (arteri). Pada tahun 2004, penyakit tersebut merupakan penyebab kematian utama di dunia. Terhitung sebanyak 7.200.000 (12,2%) kematian terjadi akibat penyakit ini di seluruh dunia[1]. Salah satu penyebab dari infark miokard dan infark serebral adalah trombosis yang diakibatkan oleh ruptur dari plak aterosklerosis pada dinding pembuluh darah sehingga menghasilkan bekuan darah.

Trombus yang menyumbat pembuluh darah tersebut dapat dihancurkan dengan mekanisme trombolisis (fibrinolisis). Fibrinolisis bekerja dengan mengaktifkan plasminogen menjadi enzim proteolitik plasmin. Plasmin akan mengubah bentuk trombus dan membatasi perkembangan trombosis dengan memecah proteolitik fibrin. Agen fibrinolitik dapat diperoleh dari tanaman, hewan, atau mikroba. Penggunaan mikroba khususnya bakteri telah banyak diteliti sebagai penghasil agen fibrinolitik<sup>[19]</sup>.

Bakteri adalah salah satu mikroba dari sumber alam yang perlu dimanfaatkan dan dikembangkan. Saat ini, salah satu potensi di bidang kesehatan adalah agen fibrinolitik yang bekerja dengan cara mendegradasi fibrin dalam bekuan darah. Agen fibrinolitik telah digunakan sebagai agen terapeutik. Tes *in vitro* menunjukkan bahwa enzim fibrinolitik dapat mengaktifkan plasminogen dan secara signifikan mendegradasi jaringan fibrin dari bekuan darah, yang menunjukkan potensinya sebagai agen trombolitik yang efektif.

Luasnya daerah perairan di Indonesia (sekitar 6% sumber air dunia atau 21% dari total sumber air di area Asia Pasifik) dan biodiversitas bakteri yang tinggi



itu merupakan potensi sumber daya alam yang sangat vital untuk dimanfaatkan bagi kesejahteraan manusia. Mangrove berada di daerah muara sungai yang merupakan tujuan akhir dari partikel-partikel organik dan endapan lumpur yang terbawa dari hulu oleh erosi. Dengan demikian, daerah mangrove merupakan daerah subur, baik daratan maupun perairannya, oleh karena selalu terjadi transportasi nutrisi akibat pasang surut. Sehingga mangrove tumbuh baik sepanjang pantai tropis terlindung seperti delta pada sungai besar[2]. Mikroba yang berasal dari lingkungan mangrove memiliki keunikan karena telah beradaptasi dengan kondisi ekstrim seperti kadar garam tinggi, kadar oksigen rendah, serta nutrisi terbatas[3]. Salah satu bakteri yang berhasil diisolasi dari air hutan mangrove adalah *Bacillus cereus*. Bakteri ini tersebar luas di alam dan pada berbagai sumber makanan baik hewani, nabati, telur, susu, dan air, dan ditemukan di tanah sebagai organisme saprofit[4]. *B. cereus* menghasilkan enzim fibrinolitik yang lebih tinggi dari hasil yang dilaporkan pada produksi enzim fibrinolitik oleh *Bacillus sp* dan *B. Vallismortis* Ace02[5].

## 2. METODE PENELITIAN

### 2.1. ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, gelas beker (Pyrex), cawan petri (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), inkubator, kertas perkamen, kuvet, *Laminar Air Flow*, lampu spiritus, lemari pendingin, mikropipet, mikroskop binokuler, gelas obyek, jarum Ose, jangka sorong, pipet tetes, pipet volume (Pyrex), pH meter, tabung reaksi (Pyrex), sentrifugator, sonikator, timbangan analitik, vortex.

Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri *B. cereus* yang diperoleh dari air hutan mangrove Maroon Edupark Semarang, Jawa Tengah, pewarna Gram A (*chrysal violet*), Gram B (*lugol iodine*), Gram C (alkohol), Gram D (safranin), larutan buffer fosfat, akuades, hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), amonium sulfat, etanol, plasma kelinci, larutan Tween 20, *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10%, *malachite green*, *metilen blue*, *blood agar plate* (Oxoid), *nutrient agar* (Oxoid), dan *brain heart infusion* (Oxoid), *Water For Injection* (WFI), *Phospat Buffered Saline Solution* (PBS), *Bovine Serum Albumin* (BSA)

### 2.2. CARA KERJA

#### 1. Identifikasi Gen

Identifikasi gen dilakukan pada bakteri *Bacillus cereus* dengan menggunakan data base nukleotida dari *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan cara memasukkan kata kunci "*AprE*" pada kolom search nukleotida.

#### 2. Pembuatan media uji

Media yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, media *nutrient agar* (NA) yang dibuat dengan cara sebanyak 4 g serbuk NA ditimbang dan dicampur dengan 200 mL akuades didalam tabung erlenmeyer [6]. Media *blood agar plate* (BAP) dibuat dengan cara serbuk BAP ditimbang sebanyak 8 g, dimasukan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 200 ml akuades[7], dan media *brain heart*



*infusion* (BHI) yang dibuat dengan cara melarutkan 18,7 gram bubuk BHI kedalam 500 mL akudes steril[8]. Media NA, BAP dan BHI selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atmosfer selama 20 menit.

### 3. Peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri *B. cereus* dilakukan dengan cara satu ose biakan bakteri *B. cereus* murni diinokulasikan pada media NA miring yang selanjutnya diinkubasi didalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C[9].

### 4. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri bertujuan untuk memperkirakan jumlah bakteri yang digunakan sebagai *starter* untuk ekstraksi enzim. Sebanyak 1 ose *B. cereus* ditumbuhkan dalam tabung reaksi steril yang berisi media BHI 10 mL yang kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam[10]. *Starter* berisi suspensi bakteri *B. cereus* pada media BHI yang telah diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

### 5. Identifikasi bakteri *Bacillus cereus*

**5.1. Identifikasi *B. cereus* pada media BAP.** Bakteri diidentifikasi secara makroskopis menggunakan media BAP dengan cara 1 ose bakteri diinokulasi pada cawan petri yang berisi media BAP dengan metode gores. Bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C[11].

**5.2. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan Gram.** Identifikasi *B. cereus* dilakukan dengan pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora. Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara mengambil 1 ose biakan bakteri dan 1 ose akuades diletakkan diatas kaca objek, diratakan dan dilakukan fiksasi. Sampel bakteri selanjutnya secara berturut-turut diwarnai dengan Gram A (*kristal violet*), Gram B (*lugol iodine*), Gram C (alkohol), dan Gram D (safranin). Pada masing-masing tahapan pewarnaan diinkubasi selama satu menit pada suhu ruang dan dicuci dengan akuades. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran lensa okuler 10x dan obyektif 100x[12].

**5.3. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan endospora.** Pewarnaan endospora dilakukan dengan cara 1 ose biakan bakteri dan 1 ose akuades diletakkan pada kaca objek, diratakan dan kemudian dilakukan fiksasi. Preparat kemudian dibungkus dengan kertas saring kemudian ditetesi dengan *malachite green*, setelah itu kertas saring dilepas dan dibilas dengan air mengalir. Preparat kemudian dikeringkan diatas api bunsen dan ditetesi safranin. Hasil pewarnaan diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran lensa okuler 10x dan obyektif 100x [13].

**5.4. Identifikasi *B. cereus* dengan uji katalase dan koagulase.** Identifikasi yang digunakan yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil 1 – 2 ose biakan bakteri kemudian diletakkan diatas kaca objek dan ditetesi dengan 1 – 2 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%[14].



Uji koagulase dilakukan dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan bakteri kedalam 5 mL plasma darah kelinci kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam[15].

#### **6. Isolasi ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus***

Sebanyak 2% *starter* dimasukkan ke dalam 500 mL media BHI, diinkubasi pada inkubator goyang (*shaker incubator*) dengan kecepatan 5000 rpm selama 24 jam pada suhu 37°C. Pemanenan sel bakteri dilakukan dengan sentrifugasi 5000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Pelet dicuci dengan *Water For Injection* (WFI) kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada suhu 4°C pada kecepatan 5000 rpm sebanyak 3 kali. Pelet yang diperoleh ditimbang dan diresuspensi dengan *Phospat Buffered Saline Solution* (PBS) dengan perbandingan 1 : 2,5 mL PBS. Pelet yang telah ditimbang dan diresuspensi kemudian dipecah menggunakan cara mekanik yaitu sonikasi. Pelet yang diperoleh disonikasi dengan sonikator pada amplitudo 50, *cycle* 0,5 selama 5 menit dengan jeda interval setiap 1 menit pada suhu 4°C. Pemisahan protein dilakukan dengan sentrifugasi pada suhu 4°C selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm dan diambil supernatannya (ekstrak kasar enzim)[16]

#### **7. Penetapan kadar ekstrak kasar enzim fibrinolitik**

Larutan standar protein BSA dibuat sebagai kurva dalam penentuan konsentrasi protein dengan cara membuat campuran PBS dan BSA dengan seri larutan 1, 2, 4, 8, 16, dan 32 µg/µL kemudian dicampur dengan 200 µL *biorad assay*, diinkubasi selama 10 menit lalu dipindahkan ke kuvet. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm[17].

Pengukuran konsentrasi sampel ekstrak kasar enzim dibuat dengan cara menyiapkan 1 mL reagen Bradford kemudian ditambahkan dengan 50 µL sampel ekstrak kasar enzim, kemudian diinkubasi selama 15 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm[18].

#### **8. Pembuatan sampel uji**

Ekstrak kasar enzim bakteri *B. cereus* dibuat menjadi tiga variasi konsentrasi yaitu 20, 40, dan 80%. Pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali, sehingga setiap sampel uji yang digunakan harus dikalikan 3 untuk setiap perhitungannya. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah nattokinase. Pembuatan suspensi nattokinase dilakukan dengan cara menimbang 100 mg serbuk nattokinase dan dihomogenkan dengan aquadest didalam labu ukur 10 mL hingga tanda batas (10 mL). Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah aquades[19].

#### **9. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim secara *in vitro***

Media uji yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran plasma darah kelinci dengan NA yang dibiarkan hingga memadat. Media yang telah padat dibuat 5 lubang sumuran dengan menggunakan *boor prop*. Masing-masing lubang sumuran diisi 3 sampel ekstrak kasar enzim sebanyak 50 µL dengan konsentrasi 20, 40, dan 80%; kontrol positif berupa larutan nattokinase; dan akuades sebagai kontrol negatif. Sampel selanjutnya diinkubasi selama 22 jam pada suhu 37°C. Zona bening



yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak kasar enzim yang memberikan aktivitas fibrinolitik paling baik[20].

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 1. Identifikasi gen

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, bakteri *Bacillus cereus* memiliki gen pengkode enzim fibrinolitik yaitu gen *AprE*. Hal ini dibuktikan dengan pencarian pada data base nukleotida dari NCBI dan didapatkan nomor akses "WP\_000754168" yang menjelaskan bahwa *B. cereus* memiliki gen *AprE* yaitu gen yang menyandi serin protease. Identifikasi gen *AprE* merupakan studi *in silico* untuk memastikan bahwa *B. cereus* menghasilkan enzim fibrinolitik.

#### 2. Identifikasi bakteri *Bacillus cereus*

**2.1. Identifikasi *B. cereus* pada BAP.** Bakteri *B. cereus* diidentifikasi secara makroskopis dengan pengujian hemolisis berdasarkan kemampuannya dalam melisis sel-sel darah merah, yang ditandai oleh adanya zona bening disekitar koloni pada media BAP. Berdasarkan hasil identifikasi bakteri *B. cereus* pada media BAP didapatkan hasil bahwa *B. cereus* menunjukkan hasil uji positif dengan bentuk tak beraturan dan menyebar, elevasi datar, warna putih bening disekitar isolat, dan tepi berlekuk pada media BAP (Gambar 1). Berdasarkan ciri-ciri yang didapat bakteri *Bacillus cereus* masuk dalam kategori bakteri yang mampu melisis sel darah merah tipe beta hemolisis ( $\beta$ ) yaitu tipe hemolisis yang dapat memecah sel darah merah secara sempurna. Kemampuan bakteri dalam menghemolisis sel darah merah, karena bakteri menghasilkan enzim hemolisin.

**2.2. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan Gram.** Berdasarkan hasil pengujian dengan pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri *B. cereus* termasuk dalam kelompok bakteri Gram positif, hal ini ditunjukkan dengan sel yang berwarna violet atau ungu, berbentuk batang (basil), dengan susunan sel tunggal pada pengamatan dengan menggunakan mikroskop (Gambar 2). Perbedaan respon yang ditimbulkan terhadap mekanisme pewarnaan Gram didasarkan pada komposisi dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif mengandung protein dengan prevalensi lebih rendah dan memiliki dinding sel yang tebal, dimana dinding terluar bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa dilindungi lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida seperti pada bakteri Gram negatif yang memiliki peptidoglikan tipis, sehingga pada saat diberikan larutan kristal violet dan diperkuat dengan lugol iodine sel berwarna ungu. Pemberian etanol 96% akan melarutkan lapisan lipid dan membentuk pori-pori kecil pada bakteri Gram positif menyebabkan pewarna safranin tidak dapat masuk sehingga sel tetap berwarna ungu[21].

**2.3. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan endospora.** Pewarnaan endospora bertujuan untuk mendapatkan genus yang lebih spesifik dari isolat yang sebelumnya telah dilakukan pewarnaan Gram dan telah diketahui bahwa isolat tersebut merupakan bakteri Gram positif[22]. Hasil dari pewarnaan endospora menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan endospora (Gambar 3). *B. cereus*

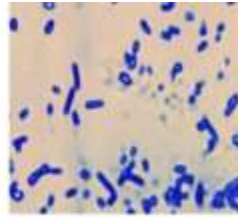


mempunyai endospora yang berbentuk oval atau kadang-kadang berbentuk bulat atau silinder. Hal ini disebabkan karena bakteri mengikat kuat senyawa pewarna yaitu *malachite green* dan ketika dilakukan pewarnaan selanjutnya menggunakan safranin, spora tidak dapat berikatan dengan pewarna lain karena sudah berikatan dengan *malachite green*[23].

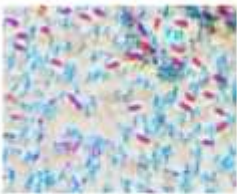
**2.4 Identifikasi *B. cereus* dengan uji katalase dan koagulase.** Hasil uji katalase dari bakteri *B. cereus* menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen (Gambar 4). Enzim katalase memecah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ [24]. Hasil uji koagulase positif ditunjukkan dengan terbentuknya *clot* atau *jelly*. *B. cereus* memberikan hasil koagulase positif (Gambar 5). Gumpalan atau *clot* yang terbentuk pada uji koagulase ini terjadi akibat adanya aktivitas enzim koagulase yang mengubah fibrinogen dalam plasma sitrat menjadi fibrin<sup>[12]</sup>.



Gambar 1. Identifikasi *B. cereus* pada media BAP



Gambar 2. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan Gram



Gambar 3. Identifikasi *B. cereus* dengan pewarnaan endospora



Gambar 4. Identifikasi *B. cereus* pada uji katalase



Gambar 5. Identifikasi *B. cereus* pada uji koagulase

### 3. Isolasi ekstrak kasar enzim fibrinolitik bakteri *B. cereus*

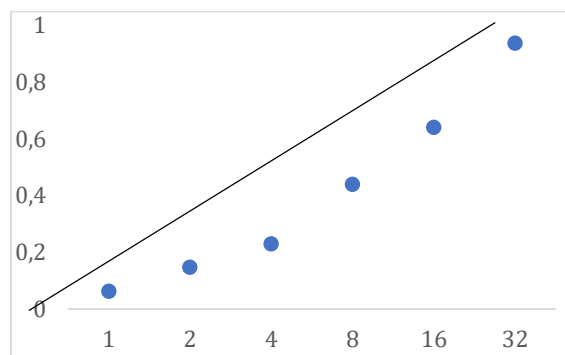
Isolasi ekstrak kasar enzim fibrinolitik dari bakteri *B. cereus* dimulai dengan bakteri ditumbuhkan pada media cair, diinkubasi dan disentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan dengan dua tahapan, hasil sentrifugasi tahap pertama diperoleh pelet sel sebanyak 4,84 gram dan supernatan sebanyak 485 mL. Pelet sel dipecah dengan metode sonikasi untuk mengeluarkan enzim dari dalam sel bakteri. Prinsip dasar dari sonikasi adalah adanya getaran yang disebabkan oleh frekuensi gelombang ultrasonik pada resonansi 15–25 kHz. Gelombang ultrasonik akan menyebabkan terjadi kavitasasi yang dapat merusak dinding sel bakteri[16]. Hasil yang didapat dari proses sonikasi dilanjutkan dengan sentrifugasi tahap kedua untuk memisahkan protein dari dari komponen-komponen yang tidak diinginkan, hasilnya didapatkan supernatan yang berisi ekstrak kasar enzim intraseluler sebanyak 10 mL yang kemudian hasil dari proses sentrifugasi disimpan didalam tabung mikro pada suhu 4°C.

#### 4. Penetapan kadar protein total ekstrak kasar *B. cereus*

Penetapan kandungan protein yang terdapat dalam ekstrak kasar enzim bakteri *B. cereus* ditentukan dengan menggunakan metode Bradford. Prinsip dari metode Bradford ini adalah pengikatan zat pewarna *Commassive Brilliant Blue G-250* (CCB) yang terdapat dalam pereaksi Bradford dengan protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, dan fenilalanin) atau bersifat basa (arginin, histidin, dan leusin) membentuk kompleks berwarna biru<sup>[9]</sup>. Metode Bradford digunakan karena tingkat kemurniannya tinggi dan harganya relatif murah dibandingkan dengan metode Lowry<sup>[17]</sup>. Pengukuran konsentrasi protein dalam larutan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm. Tabel 1 menunjukkan nilai serapan spektrofotometri UV-Vis panjang gelombang 595 nm seri pengenceran larutan BSA (sebagai standar).

**Tabel 1. Larutan standar BSA (*Bovine Serum Albumin*)**

Larutan BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Absorbansi ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ )
1	0,063
2	0,148
4	0,231
8	0,440
16	0,642
32	0,934



**Gambar 6. Grafik kurva standar BSA**

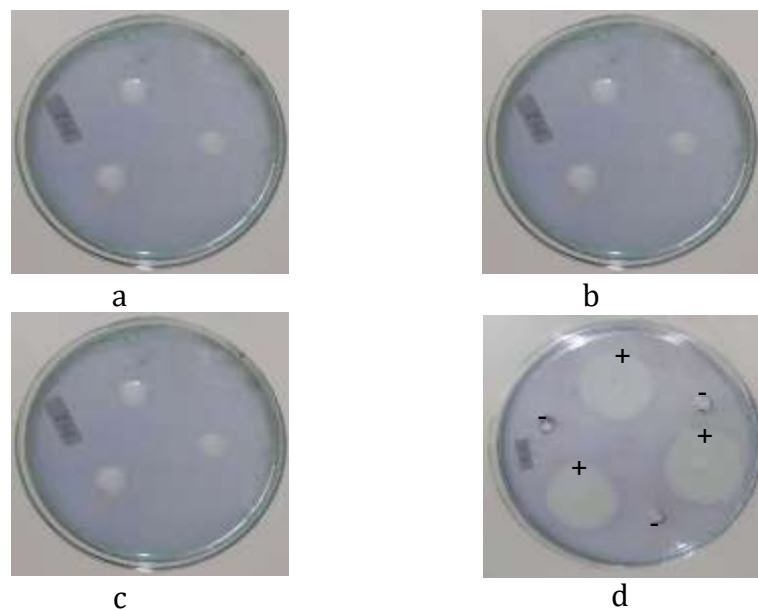
Gambar grafik kurva diatas menunjukkan *slope* positif dengan gradien garis yang mendekati 1 ( $r=0,9740$ ) dengan regresi linear yang diperoleh dengan nilai  $a = 0,123$  dan  $b = 0,0273$ . Persamaan dalam garis linear dirumuskan  $y = bx + a$ , sehingga diperoleh persamaan regresi kurva standar yaitu  $y = 0,0273x + 0,1230$ . Hasil pengujian kurva standar menunjukkan bahwa nilai absorbansi semakin meningkat seiring dengan penambahan volume BSA pada tiap tabung. Penyebabnya adalah semakin banyaknya volume pelarut protein dalam hal ini adalah aquades, maka semakin sedikit jumlah larutan BSA, jumlah protein yang larut akan semakin banyak karena pengompleksan protein dan zat warna CBB dalam reagen *Bradford* berkurang, sehingga nilai absorbansi semakin kecil<sup>[25]</sup>.



Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan bahwa kandungan protein dalam ekstrak kasar enzim bakteri *B. cereus* sebesar 19,63 mg/mL. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim fibrinolitik bakteri *B. cereus* RSA1 memiliki kadar protein sebesar 15,4 mg/ml[26]. Perbedaan kadar protein yang didapat kemungkinan disebabkan karena perlakuan yang diberikan terhadap sampel seperti media biakan, volume starter, waktu inkubasi, maupun pelarut yang digunakan pada proses resuspensi yang digunakan.

### 5. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim *B. cereus in vitro*

Pengujian aktivitas ekstrak kasar enzim fibrinolitik menggunakan metode plat fibrin pada sampel uji. Pengukuran aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim bakteri *B. cereus* dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi yakni 20, 40, dan 80% dan hasil pengukuran diameter yang diperoleh digunakan digunakan untuk menentukan Indeks Aktivitas Enzim (IAE). Hasil pengukuran diameter zona bening berturut-turut dari konsentrasi 20, 40, 80% adalah 2,54; 6,11; dan 7,94 mm (Gambar 7). Hasil pengujian menunjukkan konsentrasi 80% merupakan konsentrasi yang mempunyai aktivitas paling tinggi dalam mendegradasi fibrin, hal ini ditunjukkan dengan semakin besarnya zona bening yang terbentuk (Gambar 7c)



**Gambar 7.** Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim *B. cereus* plat fibrin *in vitro* (a) Konsentrasi 20 %, (b) Konsentrasi 40%, (c) Konsentrasi 80%, (d) Kontrol (-) dan (+).

Indeks fibrinolitik yaitu rasio antara hasil diameter zona bening yang terbentuk dari sampel uji dengan diameter lubang (sumuran) uji. Rasio indeks fibrinolitik sampel uji terhadap kontrol positif Nattokinase sebesar 7,64 kali lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positifnya (Nattokinase) yang mempunyai indeks fibrinolitik 8,64 dan besar diameter zona bening yang dihasilkan adalah 60,46 mm. Perbedaan yang dihasilkan pada zona beningnya dapat disebabkan oleh

faktor perbedaan tingkat kemurnian enzim yang diuji, dimana Nattokinase yang digunakan sebagai kontrol positif mempunyai kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim fibrinolitik bakteri *B. cereus* dan juga perbedaan konsentrasi dalam pengujian tidak sebanding antara sampel uji dengan Nattokinase FU[27]. Hasil yang diperoleh dari pengujian yang digunakan baik sampel uji maupun kontrol positif Nattokinase sudah dapat dikatakan sama-sama mempunyai aktivitas fibrinolitik yang terbukti dari zona bening yang terbentuk disekitar lubang media uji plat fibrin.

**Tabel 2. Hasil pengukuran aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* yang dinyatakan sebagai diameter zona bening**

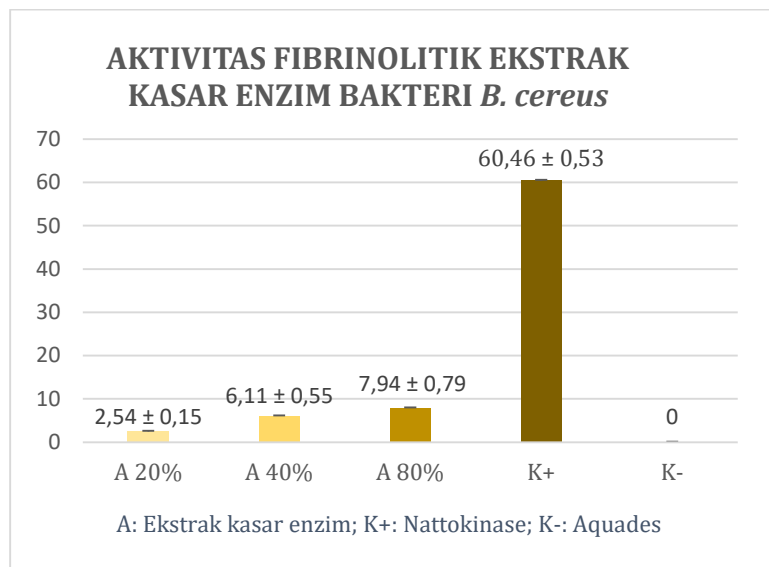
Konsentrasi sampel (%)	R <sub>1</sub> (mm)	R <sub>2</sub> (mm)	R <sub>3</sub> (mm)	$\bar{x}$ Diameter $\pm$ SD	Diameter lubang (mm)	Indeks fibrinolitik
20	2,38	2,56	2,68	2,54 $\pm$ 0,15	7,00	0,36
40	5,67	5,92	6,73	6,11 $\pm$ 0,55	7,00	0,87
80	7,28	7,73	8,82	7,94 $\pm$ 0,79	7,00	1,13
K+	60,95	59,90	60,54	60,46 $\pm$ 0,53	7,00	8,64
K-	-	-	-	-	7,00	-

**Keterangan :** K+ = Kontrol positif Nattokinase  
 K- = Kontrol negatif aquadest  
 $\bar{x}$  Diameter = Rata-rata diameter zona bening yang terbentuk  
 R = Replikasi pengujian

Hasil pengujian menunjukkan ekstrak kasar enzim fibrinolitik dari mempunyai aktivitas fibrinolitik. Aktivitas tertinggi didapat pada sampel konsentrasi 80%. Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin tinggi aktivitas fibrinolitik yang dihasilkan. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah kemurnian enzim. Aktivitas yang masih rendah dari sampel disebabkan karena pada penelitian ini belum dilakukan pemurnian enzim untuk memisahkan zat-zat pengotor yang terdapat dalam sampel. Beberapa peneliti telah melakukan pemurnian enzim pada bakteri yang sama seperti pemurnian protein pada bakteri *B. cereus* B80 mendapatkan kadar protein sebanyak 87,2 mg/ml[28] dan pemurnian protein pada bakteri *B. cereus* IND5 mendapatkan kadar protein 36,5 mg/ml[29]. Hal ini menunjukkan bahwa pemurnian enzim berperan penting dalam peningkatan kadar protein serta aktivitasnya.

Nattokinase (NK) digunakan sebagai pembanding pada pengujian. NK adalah serin protease dengan aktivitas fibrinolitik, antihipertensi, antiaterosklerosis, menurunkan lipid, anti-platelet dan memiliki efek neuroprotektif. NK merupakan suplemen makanan yang mudah diserap oleh usus sebagai hasil fermentasi pada kondisi spesifik dari biji-bijian seperti natto, kedelai, dan *douche* menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* natto.





**Gambar 8. Histogram aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim fibrinolitik *B. cereus* terhadap diameter zona bening**

Fibrinogen adalah protein solubel yang akan diubah menjadi fibrin suatu protein non-solubel oleh enzim serin protease thrombin. Hal ini terjadi pada proses pembekuan darah. NK sebagai agen fibrinolitik bekerja dengan cara memecah fibrin menjadi molekul-molekul yang lebih kecil[30] Ekstrak kasar enzim yang berasal bakteri *B. cereus* diduga memiliki mekanisme yang sama dengan NK. Mekanisme kerja agen trombolitik dibagi menjadi dua yaitu *fibrin dependent* (tergantung fibrin) dan *non-fibrin dependent*. *Tissue plasminogen activator* (tPA) merupakan contoh agen trombolitik dengan mekanisme fibrin dependent, sedangkan streptokinase merupakan contoh *non-fibrin dependent*.

#### 4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bakteri *B. cereus* dari air hutan Mangrove Maroon Edupark Semarang menghasilkan ekstrak kasar enzim fibrinolitik dengan kadar sebesar 19,63 mg/mL. Ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas fibrinolitik yang ditunjukkan dengan zona bening pada media plat fibrin. Aktivitas fibrinolitik pada konsentrasi 20, 40, 80% berturut-turut sebesar 2,54; 6,11; dan 7,94 mm.

#### 5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] World Health Organization. (2011). The world health report (2008): primary health care now more than ever. Geneva: WHO Library Cataloguing-in Publication.
- [2] Macintosh DJ, Ashton EC, dan Havanon S. (2002). Mangrove rehabilitation and intertidal biodiversity: a study in the Ranong mangrove ecosystem, Thailand. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(3): 331-345.
- [3] Siti S, Sutrisno A, dan Niniek W. (2017). Kelimpahan bakteri heterotroph sedimen berbagai tipe kerapatan dikawasan konservasi mangrove Desa

- Bendono, Kecamatan Sayung, Demak. *JOURNAL OF MAQUARES*, volume 6, nomor 3: 311-317
- [4] Villain S, Luo Y, Hildreth M, dan Brozel V. (2006). Analysis of the Life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied Environmental Microbiology*, 72(7): 4970-4977.
- [5] Choi N S, Kim B Y, Lee J Y, Yoon K S, Han K Y dan Kim S H. (2002). Relationship between acrylamide concentration and enzymatic activity in an improved single fibrin zymogram gel system. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(2), 236-238. Oxoid. *Manual Oxoid*. Edisi 9.
- [6] Nugraha U S, Haryani T S, Larashati. (2018). Skrining isolat bakteri limbah industri berpotensi menurunkan konsentrasi kadmium (Cd) secara *in vitro*. *JOM*, 2: 2-3
- [7] Krihariyani D, Evy D W, Entuy K. (2016). Pola pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media agar darah manusia golongan O, AB, dan darah domba sebagai kontrol. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kesehatan*, 3: 193-198
- [8] Arifin A, Hayati Z, Jamil K F. (2016). Isolasi dan identifikasi bakteri di lingkungan laboratorium mikrobiologi klinik RSUDZA Banda Aceh. *Original Article*, 1: 3-4.
- [9] Wijayati N, Astutiningsih C, dan Mulyati S. (2014). Transformasi-pinena dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 6(1): 24-28.
- [10] Dinoto A, Julistiono H, Handayani R, Roswiem A P, Sari P N dan Saputra S. (2020). Seleksi bakteri asam laktat dari nira aren [(*Arenga pinnata* (Wurmb))] asal Papua sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Biologi Indonesia*, 16(1).
- [11] Dayanara, I., Kawuri, R., & Yulihastuti, D. A. (2019). The presences of pathogenic bacteria in snack for school children on Sapeken Island, Sumenep, East Java. *Jurnal Biologi Udayana*, 23(2), 68-79.
- [12] Marler Linda M, Siders Jean A, Allen, Stephen D. (2017). *Atlas Pewarnaan Gram*. Jakarta: EGC.
- [13] Oktari A, Supriatin Y, Kamal M and Syafrullah H. (2017). The bacterial endospore stain on Schaeffer Fulton using variation of methylene blue solution. *J. Phys.: Conf. Ser*, 812 012066.
- [14] Lay B W. (1994). Analisis Mikroba di Laboratorium. *PT. Raja Persada*, Jakarta.
- [15] Siagian R. (2016). Identifikasi jamur pada apusan AC di ruang kelas S-1 Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- [16] Anggraini N E D, dan Awan N C E. (2018). Uji daya hambat antibakteri ekstrak kasar enzim bromelin dari bonggol nanas (*Ananas comosus* (L) Merr) terhadap *Lactobacillus acidophilus* (Doctoral dissertation, Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang).
- [17] Utami P, Lestari S, dan Lestari S D. (2016). Pengaruh metode pemasakan terhadap komposisi kimia dan asam amino ikan seluang (*Rasbora argyrotaenia*). *Jurnal Fishtech*, 5(1), 73-84.



- [18] Poernomo A T. (2015). Aktivitas in vitro enzim fibrinolitik ekstrak tempe hasil fermentasi *Rhizopus Oligosporus* ATCC 6010 pada substrat kedelai hitam. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 4(2), 18-24.
- [19] Zaman R, Parvez M, Jakaria M, Sayeed M A, dan Islam M. (2015). In vitro clot lysis activity of different extracts of *Mangifera sylvatica* roxb. leaves. *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(3): 135-140
- [20] Poernomo A T, dan Sudjarwo R A P. (2014). Purifikasi parsial enzim fibrinolitik tempe kacang koro. *Berkala Ilmiah Farmasi: Universitas Airlangga*.
- [21] Hakim R F, Fakhurrazi F, dan Ferisa W. (2016). Pengaruh air rebusan daun salam (*Eugenia polyantha* wight) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*, 1(1):21-28
- [22] Pratita M Y E, Putra S R. (2012). Isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber mata air panas di Songgoriti setelah dua hari inkubasi. *Teknik Pomits*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- [23] Beattie S H, Holt C, Hirst D, and Williams A G. (1998). Discrimination among *Bacillus cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis* and some other species of the genus *Bacillus* by Fourier transform infrared spectroscopy. *FEMS microbiology letters*, 164(1): 201-206.
- [24] Mercedes A, Xevi B, Pietro V, Carme R. (2009). The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 131(33): 1751-61
- [25] Khopkar S M. (2007). Konsep dasar kimia analitik, UI Press, Jakarta
- [26] Sharma C, Salem G E M, Sharma N, Gautam P, dan Singh R. (2020). Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1. *Biomolecules*, 10(1): 3.
- [27] Dabbagh F, Negahdaripour M, Berenjian A, Behfar A, Mohammadi F, Zamani M, dan Ghasemi Y. (2014). Nattokinase: production and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(22): 9199-9206
- [28] Saxena R, Singh R. (2015). MALDI-TOF MS and CD spectral analysis for identification and structure prediction of a purified, novel, organic solvent stable, fibrinolytic metalloprotease from *Bacillus cereus* B80. *BioMed Research International*, 13.
- [29] Biji GD, Arun A, Muthulakshmi E, Vijayaraghavan P, Arasu MV. (2016). Bioprospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND5 in solid state fermentation. *Biotech* 6: 231
- [30] Hongjie C, Eileen M, Nina R, Sara L, Najah N, Fatima S, Xianqin Q, and Yiguang L. (2018). Nattokinase: a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Biomark Insights*, 13: 1177271918785130.

