

Research Article

**Pengaruh Sumber Karbon Organik Terhadap Produksi Protease Fibrinolitik
Bacillus Sphaericus BM 9.1 Dengan *Solid State Fermentation* (SSF)**

Afrilia Diana Fitri, Achmad Toto Poernomo*, Muhammad Faris Adrianto

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Campus C
 Jl. Dr. Ir. H. Soekarno

*Corresponding author. E-mail: achmad-t-p@ff.unair.ac.id

Article History

Received: 12 juli 2020; Received in Revision: 23 Agustush 2020; Accepted: 1 Oktober 2020

ABSTRACT

Fibrinolytic enzymes are a group of protease serine enzymes capable of destroying blood clots (fibrin) in various thrombotic diseases. Fibrinolytic enzyme sources can be obtained from microorganisms. *Bacillus* sp is one of the microorganisms that has the potential to produce fibrinolytic enzymes. Medium has an important role in growing and producing fibrinolytic enzymes. In a medium, sufficient carbon source is required for the growth of a bacterium. In microbial fermentation, carbon sources are indispensable for the formation of biomass and energy production. The medium used in this research is Nutrient agar medium with organic carbon source added. Sources of carbon used are glucose, fructose, sucrose, and starch with each 1% w/v concentration. Addition of carbon sources with 1% w/v concentration to the medium showed different effects on fibrinolytic enzymes production by *Bacillus sphaericus* BM 9.1. So among all the carbon sources tested, fructose yielded the highest fibrinolytic index (2.86 ± 0.03). The next step is to optimize the concentration of fructose carbon source. Optimization of fructose concentration to be tested at concentrations of 1%, 2%, 3%, and 4%. All concentrations has been tested, fructose 1% w/v concentration yielded the highest fibrinolytic index (2.82 ± 0.04).

Keywords: *Bacillus sphaericus*, carbon source, fibrinolytic enzyme

ABSTRAK

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease serin yang mampu menghancurkan bekuan darah (fibrin) pada berbagai penyakit trombotik. Sumber enzim fibrinolitik dapat diperoleh dari mikroorganisme. *Bacillus* sp merupakan salah satu mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan enzim fibrinolitik. Medium memiliki peran penting dalam menumbuhkan dan memproduksi enzim fibrinolitik. Dalam medium, sumber karbon yang cukup diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Dalam fermentasi mikroba, sumber karbon sangat diperlukan untuk pembentukan biomassa dan produksi energi. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Nutrient agar yang ditambahkan sumber karbon organik. Sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, fruktosa, sukrosa, dan pati dengan konsentrasi masing-masing 1% b/v. Penambahan sumber karbon dengan konsentrasi 1% b/v pada medium menunjukkan pengaruh yang berbeda terhadap produksi enzim fibrinolitik oleh *Bacillus sphaericus* BM 9.1. Jadi di antara semua sumber karbon yang diuji, fruktosa menghasilkan indeks fibrinolitik tertinggi ($2,86 \pm 0,03$). Langkah selanjutnya adalah mengoptimalkan konsentrasi sumber karbon fruktosa. Optimasi konsentrasi fruktosa diuji pada konsentrasi 1%, 2%, 3%, dan 4%. Semua konsentrasi telah diuji, konsentrasi fruktosa 1% b/v menghasilkan indeks fibrinolitik tertinggi ($2,82 \pm 0,04$).

Kata kunci: *Bacillus sphaericus*, sumber karbon, fibrinolitik, enzyme

Pendahuluan :

Salah satu penyebab utama dari berbagai penyakit kardiovaskular adalah intravaskular trombus, suatu proses terjadinya pembentukan trombus pada pembuluh darah. Komponen protein utama pembekuan darah tersebut adalah fibrin. Sementara itu, dalam keadaan normal gumpalan fibrin dapat dihidrolisis menjadi hasil degradasi fibrin oleh plasmin untuk menghindari terjadinya trombus di pembuluh darah. Bila dalam keadaan tidak seimbang yang disebabkan oleh beberapa gangguan, maka trombus tidak dapat dihidrolisis oleh plasmin, sehingga diperlukan enzim fibrinolitik eksogen yang menyerupai plasmin (Kotb, 2015).

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok enzim protease serin yang mampu menghancurkan bekuan darah (fibrin) dalam berbagai penyakit trombus. Enzim fibrinolitik juga menjadi pilar utama untuk mengobati penyakit kardiovaskuler. Enzim fibrinolitik eksogen diantaranya adalah urokinase, streptokinase, dan tissue plasminogen activator (t-PA). Jenis lain yaitu plasmin seperti enzim fibrinolitik yang secara langsung menurunkan fibrin sehingga melarutkan trombus dengan cepat. Walaupun aktivator plasminogen dan urokinase masih digunakan sebagai terapi trombolitik hingga saat ini, tetapi kedua terapi tersebut mahal dan dapat menyebabkan efek samping seperti terjadinya hemorrhage internal ketika diberikan secara peroral (Kotb, 2013). Oleh karena itu perlu dilakukan pengembangan studi lebih lanjut mengenai sumber enzim fibrinolitik yang lebih efisien dan lebih aman. Enzim fibrinolitik merupakan protein yang dapat diperoleh dari tanaman, hewan, ataupun mikroorganisme (bakteri, jamur dan alga) serta berbagai makanan fungsional. Sumber enzim fibrinolitik dari mikroorganisme mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan tanaman dan hewan, diantaranya kemudahan sel mikroba untuk ditumbuhkan, kecepatan pertumbuhan, skala produksi sel lebih mudah ditingkatkan, kondisi produksi tidak tergantung pada musim dan waktu yang dibutuhkan relatif tidak lama (Meyrath & Volavsec, 1975).

Pada penelitian tentang skrining bakteri penghasil enzim fibrinolitik asal perairan pantai ekowisata mangrove wonorejo kota Surabaya yang dilakukan oleh (Fakhri, 2015), pada penelitian tersebut telah ditemukannya bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dan bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 terbukti memiliki aktivitas enzim fibrinolitik cukup besar.

Agar dapat menghasilkan enzim fibrinolitik yang optimal, media memegang peranan penting. Media untuk menumbuhkan mikroorganisme terdiri atas substansi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme berupa sumber karbon, sumber

nitrogen, sulfur, besi, fosfat, magnesium dan faktor-faktor pertumbuhan lain (Atlas, 2010).

Sumber karbon diperlukan untuk pembentukan biomassa dan produksi energi. Karbohidrat sangat dibutuhkan oleh bakteri karena karbohidrat merupakan substrat utama untuk metabolisme bakteri. Hampir setengah berat kering suatu bakteri adalah unsur karbon. Karbon dapat ditemukan dalam senyawa karbohidrat, sehingga karbohidrat sangat berperan penting untuk mendukung pertumbuhan bakteri (Radji, 2011). Senyawa karbohidrat dapat dibagi menjadi monosakarida,

disakarida dan polisakarida. Jenis monosakarida dapat ditemukan dalam bentuk seperti glukosa, fruktosa, galaktosa dan manosa. Pada disakarida dapat ditemukan dalam bentuk seperti sukrosa, laktosa dan manosa. Sedangkan pada polisakarida dapat ditemukan dalam bentuk seperti pati (amilum), selulosa, pektin, lignin dan kitin.

Dengan analogi diatas, di Indonesia belum ada yang melakukan penelitian tentang produksi enzim fibrinolitik dari *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan menggunakan glukosa, fruktosa, sukrosa, dan amilum sebagai sumber karbon pada pertumbuhan *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan tujuan membandingkan aktivitas enzim fibrinolitik pada media dengan sumber karbon organik apa yang memiliki aktivitas lebih besar

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan: sumber karbon organik yaitu glukosa, fruktosa, sukrosa, dan amilum, *Bacillus sphaericus* BM 9.1 hasil isolasi tanah Pantai Mangrove Surabaya, Aquadest, NaCl 0,9%, fibrin Bovine Blood Sigmachem, standar nattokinase, larutan dapar fosfat, Nutrient Broth, agar, susu skim dan methilen blue.

Alat: cawan petri, batang pengaduk, beaker glass, gelas ukur, pipet tetes dan tabung reaksi, kertas perkamen, autoclave electric HL-340 Series Vertical Type Steam Sterilizer, incubator Memmert, timbangan digital Sartorius Type BP 221S, Laminar Air Flow Cabinet, lemari pendingin, centrifuge Hettich Zentrifugen EBA 20, vortex Thermolyne Maxi Mix, pH meter Fisher Versamix, mikropipet, jangka sorong dan sengkeli (Ose).

Preparasi Media Peremajaan Kultur

Media yang digunakan untuk peremajaan *Bacillus sphaericus* BM 9.1 ialah Nutrient Agar. Media Nutrient Agar dibuat dengan cara melarutkan 2 gram agar ditambahkan 1,3 gram Nutrient Broth lalu ditambahkan aquadest sampai 100 ml dan dipanaskan. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml, lalu tutup ujung tabung dengan kapas berlemak dan sterilisasi dengan

autoklaf 121°C selama 30 menit, kemudian miringkan dan biarkan hingga memadat.

Preparasi Media Uji Aktivitas Enzim Proteolitik

Media untuk uji aktivitas enzim proteolitik yang digunakan adalah Skim Milk Agar (SMA). Pertama yang dilakukan untuk membuat 100 ml media SMA adalah menimbang 5 gram susu skim, dilarutkan dalam aquadest 100 ml kemudian ditambah dengan 2 gram agar, lalu dipanaskan dan diaduk hingga larut homogen. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 20 ml, lalu tutup ujung tabung dengan kapas berlemak dan sterilisasi dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Kemudian media dituang ke dalam cawan petri diratakan hingga rata dan tunggu hingga memadat.

Preparasi Media Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Uji aktivitas fibrinolitik digunakan metode fibrin plate. Fibrin plate dibuat dengan mencampurkan fibrin sebanyak 2% dalam 100 ml dapar fosfat pH 7,4 dicampur dengan agar sebanyak 2%, kemudian ditambahkan metilen blue sebanyak 400 µL lalu dipanaskan dan diaduk hingga larut homogen. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 20 ml, lalu tutup ujung tabung dengan kapas berlemak dan sterilisasi dengan autoklaf 121°C selama 15 menit. Ditambahkannya metilen blue dengan tujuan agar zona jernih fibrinolitik terlihat dengan jelas. Kemudian media yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri. Diamkan plate selama 30 menit pada suhu ruang hingga memadat (modifikasi metode Ashipala & He, 2008).

Preparasi Media Produksi

Media produksi enzim pada bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 menggunakan 3 media pertumbuhan yaitu media Nutrient Agar, Nutrient Agar + sumber karbon organik dan media agar + sumber karbon organik. Media Nutrient Agar digunakan sebagai standar dan dibuat dengan melarutkan 2 gram agar ditambahkan 1,3 gram Nutrient Broth lalu ditambahkan aquadest sampai 100 ml. Media Nutrient Agar dengan campuran sumber karbon organik dibuat dengan melarutkan 2 gram agar ditambahkan 1,3 gram Nutrient Broth lalu ditambahkan sumber karbon organik masing-masing dengan konsentrasi 1% b/v kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Sedangkan media agar + sumber karbon organik digunakan sebagai media substrat, dibuat dengan mencampurkan 2 gram agar dengan sumber karbon organik masing-masing dengan konsentrasi 1% b/v kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Masing-masing media dibagi menjadi 8 ml untuk base layer dan 10 ml untuk seed layer. Kemudian semua media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit (modifikasi metode Arulanantham et al., 2012)

Peremajaan *Bacillus sphaericus* BM 9.1.

Panaskan ujung ose, lalu buka tutup pada tabung reaksi dari kultur bakteri induk. Panaskan sekilas mulut tabung reaksi diatas api. Kemudian mengambil bakteri dari tabung reaksi sebanyak 1 goresan ose. Panaskan kembali mulut tabung reaksi lalu segera ditutup dengan kapas berlemak. Buka tutup tabung reaksi berisi media agar miring, sekilas panaskan diatas api. Gesekkan ose yang berisi biakan bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 secara aseptis ke dalam media Nutrient Agar miring dan dilakukan dalam Laminar Air Flow Cabinet. Panaskan ujung ose kembali. Diinkubasi pada suhu kamar 37±1°C selama 24 jam.

Inokulasi Bakteri Pada Media Produksi

Masing-masing media base layer 8 ml dituang ke dalam cawan petri steril. Diratakan kemudian diamkan hingga memadat. Kemudian membuat suspensi bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan cara menambahkan 10 ml NaCl 0,9% steril ke dalam tabung biakan yang telah diinkubasi sebelumnya, lalu divortex hingga bakteri

terlepas dari medianya. Kemudian mengukur % transmittan suspensi bakteri yang didapat dan dilakukan pengenceran hingga didapatkan transmittan sebesar 25%. Sebanyak 10 µl kultur suspensi bakteri diinokulasikan pada masing-masing media steril 10 ml media seed layer secara aseptis. Kemudian media divortex selama 5 menit untuk menghomogenkan lalu dituang ke dalam cawan petri yang sudah terisi base layer sebelumnya. Plate yang telah diinokulasikan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (modifikasi metode Vijayaraghavan et al., 2016).

Uji Aktivitas Enzim Proteolitik

Mengambil 20 ml media Skim Milk Agar (SMA) lalu dimasukkan ke dalam cawan petri dengan merata dan di tunggu hingga memadat. Kemudian menandai pada masing-masing media SMA untuk sumuran Nutrient Agar Standar, Nutrient Agar + sumber karbon organik dan agar + sumber karbon organik. Membuat empat sumuran dengan logam pelubang steril pada masing-masing media SMA. Masing-masing media fermentasi dilubangi dengan logam pelubang steril namun pellet hasil pelubangan diletakkan pada sumuran media SMA. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Jika bakteri menghasilkan enzim proteolitik akan menimbulkan zona jernih di sekitar koloni. Diukur diameter zona jernih dan ditentukan indeks proteolitiknya (Chung, 2010). Lakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Indeks proteolitik (IP) = R / r

R : diameter zona jernih (mm)

r : diameter koloni bakteri (mm)

Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Mengambil 20 ml media fibrin plate yang telah dibuat kemudian menandai pada masing-masing media fibrin plate untuk sumuran Nutrient Agar Standar, Nutrient Agar \neg + sumber karbon organik dan agar + sumber karbon organik. Membuat empat sumuran dengan logam pelubang steril pada masing-masing media fibrin plate. Masing-masing media fermentasi dilubangi dengan logam pelubang steril namun pellet hasil pelubangan diletakkan pada sumuran media fibrin plate. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37oC. Amati zona jernih yang terbentuk di sekitar lubang dan ukur diameter zona jernih. Lakukan replikasi tiga kali. Zona jernih diindikasikan hasil dari degradasi fibrin dan diameternya sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik.

Indeks fibrinolitik (IR) = R / r

R : diameter zona jernih (mm)

r : diameter koloni bakteri (mm)

Optimasi Konsentrasi Sumber Karbon Terpilih

Setelah dilakukan uji aktivitas proteolitik dan uji aktivitas fibrinolitik ditentukan sumber karbon optimum yang menghasilkan zona jernih terlebar. Digunakan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4% terhadap sumber karbon optimum yang telah ditentukan. Tahapan penelitiannya adalah sebagai berikut:

Preparasi Media Produksi Enzim

Media produksi enzim pada bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 menggunakan 3 media pertumbuhan yaitu media Nutrient Agar, Nutrient Agar + sumber karbon optimum dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4% dan media agar + sumber karbon optimum dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4%. Media Nutrient Agar digunakan sebagai standar dan dibuat dengan melarutkan 2 gram agar ditambahkan 1,3 gram Nutrient Broth lalu ditambahkan aquadest sampai 100 mL. Media Nutrient Agar dengan campuran sumber karbon organik dibuat dengan melarutkan 2 gram agar ditambahkan 1,3 gram Nutrient Broth lalu ditambahkan sumber karbon optimum dengan konsentasi 1%, 2%, 3% dan 4% kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Sedangkan media agar + sumber karbon organik digunakan sebagai media substrat, dibuat dengan mencampurkan 2 gram agar dengan sumber karbon optimum dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4% kemudian dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Masing-masing media dibagi menjadi 8 ml untuk base layer dan 10 ml untuk seed layer. Kemudian semua media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121oC selama 30 menit.

Inokulasi Bakteri Pada Media Produksi

Masing-masing media base layer 8 ml dituang ke dalam cawan petri steril. Diratakan kemudian diamkan hingga memadat. Kemudian membuat suspensi bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan cara menambahkan 10 ml NaCl 0,9% steril ke dalam tabung biakan yang telah diinkubasi sebelumnya, lalu

divortex hingga bakteri terlepas dari mediana. Kemudian mengukur % transmitan suspensi bakteri yang didapat dan dilakukan pengenceran hingga didapatkan transmitan sebesar 25%. Sebanyak 10 μ l kultur suspensi bakteri diinokulasikan pada masing-masing media steril 10 ml media seed layer secara aseptis. Kemudian media divortex selama 5 menit untuk menghomogonkan lalu dituang ke dalam cawan petri yang sudah terisi base layer sebelumnya. Plate yang telah diinokulasikan bakteri diinkubasi pada suhu 37oC selama 24 jam (modifikasi metode Vijayaraghavan et al., 2016).

Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Mengambil 20 mL media fibrin plate yang telah dibuat kemudian menandai pada masing-masing media fibrin plate untuk sumuran Nutrient Agar Standar, Nutrient Agar \neg + sumber karbon optimum dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4% dan agar + sumber karbon optimum dengan konsentrasi 1%, 2%, 3% dan 4%. Membuat empat sumuran dengan logam pelubang steril pada masing-masing media fibrin plate. Masing-masing media fermentasi dilubangi dengan logam pelubang steril namun pellet hasil pelubangan diletakkan pada sumuran media fibrin plate. Kemudian diinkubasi pada suhu 37oC selama 24 jam. Amati zona jernih yang terbentuk di sekitar lubang dan ukur diameter zona jernih. Lakukan replikasi tiga kali. Zona jernih diindikasikan hasil dari degradasi fibrin dan diameternya sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik.

Indeks fibrinolitik (IR) = R / r

R : diameter zona jernih (mm)

r : diameter koloni bakteri (mm)

, Hasil Dan Pembahasan

Hasil Kultur *Bacillus sphaericus* BM 9.1

Bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dibiakkan pada media *Nutrient* agar miring. Diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian disimpan dalam lemari es.

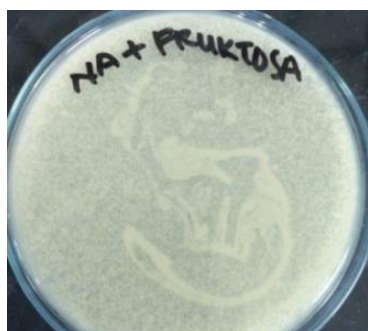


Gambar 1. Hasil kultur *Bacillus sphaericus* BM 9.1 pada media *nutrient* agar.

Media Produksi *Bacillus sphaericus* BM 9.1

Media produksi enzim pada bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 menggunakan 3 media pertumbuhan yaitu media *Nutrient Agar*, *Nutrient Agar* + sumber karbon organik masing-masing konsentrasi 1% b/v dan media agar + sumber karbon

organik masing-masing konsentrasi 1% b/v. Media yang telah dibuat akan dibagi menjadi 2 bagian yaitu *base layer* sebanyak 8 ml dan *seed layer* sebanyak 10 ml. Media *base layer* dituang terlebih dahulu kedalam cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat. Dalam media *seed layer* akan diinokulasikan bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan transmittan 25% yang dianggap mengandung jumlah bakteri 3×10^8 cfu/ml. Media *seed layer* yang telah diinokulasi kemudian dituang kedalam cawan petri yang sebelumnya terdapat media *base layer*, kemudian ditunggu sampai padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Salah satu hasil gambar media produksi *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dengan berbagai sumber karbon dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil pembuatan media produksi *Nutrient* agar dengan sumber karbon fruktosa oleh *Bacillus sphaericus* BM 9.1

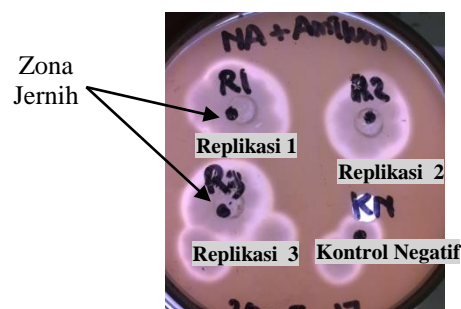
Koloni *Bacillus sphaericus* BM 9.1 nampak terlihat berwarna putih, tersebar merata pada permukaan, *base* maupun *seed layer*. Pertumbuhan pada media Nutrien agar dan kombinasi nutrien agar dan sumber karbon organik nampak lebih jelas secara visual dibandingkan pada media agar+sumber karbon organik

Uji Proteolitik *Bacillus sphaericus* BM 9.1 pada Media dengan Berbagai Sumber Karbon

Pada uji proteolitik digunakan media *Skim Milk Agar* (SMA) untuk mengetahui aktivitas enzim proteolitik pada bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1. Uji proteolitik dibuat dengan mencampurkan susu skim 5% dengan agar 2%. Unit aktivitas enzim proteolitik adalah ukuran diameter zona jernih yang dihasilkan di sekitar koloni. Aktivitas enzim tersebut dinyatakan dalam indeks proteolitik dimana indeks tersebut diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dan diameter lubang yang diukur menggunakan jangka sorong. Hasil uji proteolitik terbesar dapat dilihat pada Gambar 3.

Dalam penelitian ini sumber karbon glukosa, fruktosa, sukrosa, dan amilum memiliki pengaruh dalam uji proteolitik oleh *Bacillus sphaericus* BM 9.1, sehingga diharapkan pada uji fibrinolitik selanjutnya juga memberikan hasil positif. Zona jernih yang timbul akibat terjadinya hidrolisis ikatan

peptida pada protein yaitu kasein yang terdapat dalam *Skim Milk Agar*. Kasein merupakan protein susu yang berwarna putih sehingga apabila didegradasi oleh bakteri akan berubah menjadi asam amino yang tidak berwarna.



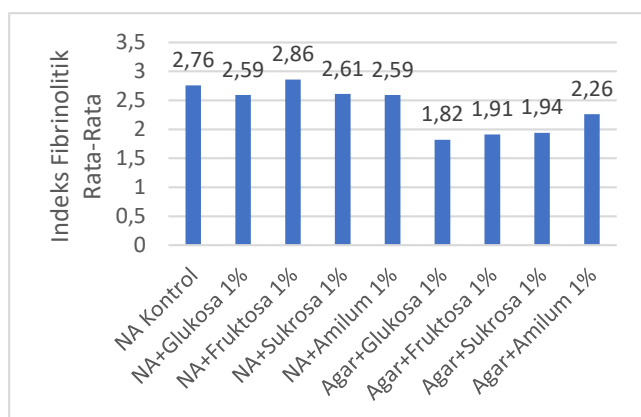
Gambar 3. Hasil uji proteolitik sampel media produksi *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dalam media *nutrient* agar + amilum 1% replikasi 1, replikasi 2, replikasi 3 dan kontrol negatif salin 0,9%.

Uji Fibrinolitik *Bacillus sphaericus* BM 9.1 pada Media dengan Berbagai Sumber Karbon

Uji *fibrin plate* adalah salah satu uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim fibrinolitik pada bakteri *Bacillus sphaericus* BM 9.1. Uji *fibrin plate* dibuat dengan mencampurkan fibrin sebanyak 2% dalam 100 ml dapar fosfat 0,1 M dicampur dengan agar sebanyak 2%, kemudian ditambahkan *metilen blue* sebanyak 400 µL. Unit aktivitas enzim fibrinolitik adalah ukuran diameter zona jernih yang dihasilkan di sekitar koloni. Aktivitas enzim tersebut dinyatakan dalam indeks fibrinolitik dimana indeks tersebut diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dan diameter lubang yang diukur menggunakan jangka sorong. Gambar dan diagram hasil pengukuran dari uji proteolitik dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5



Gambar 4. Hasil uji fibrinolitik sampel media produksi *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dalam media *nutrient* agar + fruktosa 1% replikasi 1, replikasi 2, replikasi 3 dan kontrol

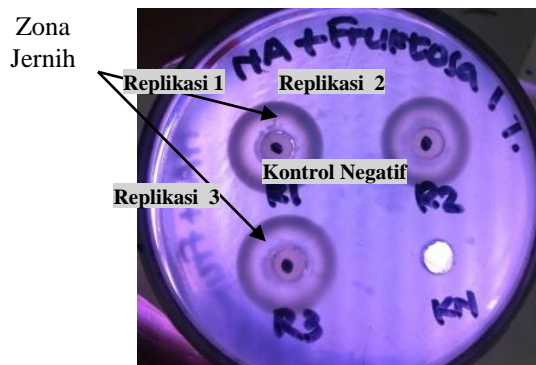


Gambar 5. Profil pengaruh media produksi dengan berbagai sumber karbon terhadap indeks fibrinolitik dari *Bacillus sphaericus* BM 9.1 negatif salin 0,9%.

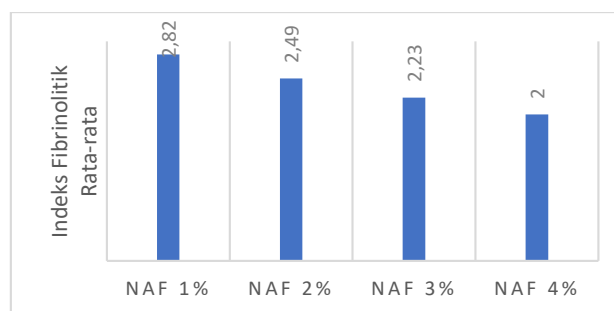
Hasil uji fibrinolitik pada media produksi *Bacillus sphaericus* dengan berbagai sumber karbon, didapatkan indeks fibrinolitik rata-rata tertinggi terdapat pada media *Nutrient* agar + fruktosa 1% yaitu sebesar $(2,86 \pm 0,03)$. Zona jernih yang timbul akibat terjadinya degradasi fibrin oleh enzim fibrinolitik. Dikarenakan fibrin berwarna transparan, oleh sebab itu perlu ditambahkan *metilen blue* yang memberikan warna biru sehingga zona jernih yang terbentuk akan terlihat lebih jelas

Optimasi Konsentrasi Sumber Karbon Terpilih

Sumber karbon optimum pada penelitian ini yaitu fruktosa. Perbandingan konsentrasi sumber karbon fruktosa yang akan dioptimasi yaitu 1%, 2%, 3%, dan 4%. Dalam optimasi konsentrasi sumber karbon fruktosa digunakan metode uji *fibrin plate* yang dibuat dengan mencampurkan fibrin sebanyak 2% dalam 100 ml dapar fosfat 0,1 M dicampur dengan agar sebanyak 2%, kemudian ditambahkan *metilen blue* sebanyak 400 μ L. Unit aktivitas enzim fibrinolitik adalah ukuran diameter zona jernih yang dihasilkan di sekitar koloni. Aktivitas enzim tersebut dinyatakan dalam indeks fibrinolitik dimana indeks tersebut diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dan diameter lubang yang diukur menggunakan jangka sorong. Gambar dan diagram hasil pengukuran dari uji proteolitik dapat dilihat pada Gambar 6 dan Gambar 7.



Gambar 6. Hasil uji fibrinolitik sampel media produksi *Bacillus sphaericus* BM 9.1 dalam media *nutrient* agar + fruktosa 1% replikasi 1, replikasi 2, replikasi 3 dan kontrol negatif salin 0,9%.



Gambar 7. Profil pengaruh konsentrasi media dengan sumber karbon fruktosa (b/v) terhadap indeks fibrinolitik dari *Bacillus sphaericus* BM 9.1. NAF : Nutrient Agar (NA) + Fruktosa

Uji Statistika *one-way* ANOVA dalam Menentukan Konsentrasi Optimum dari Sumber Karbon Terpilih

Suatu data dapat dilakukan analisis statistika menggunakan metode *one-way* ANOVA dengan syarat data tersebut harus memiliki distribusi yang normal dan homogen. Untuk uji distribusi data pada SPSS dilakukan dengan metode Uji Kolmogorov-Smirnov.

Tabel 2. Interpretasi hasil uji statistik pada diameter zona jernih aktivitas fibrinolitik masing-masing konsentrasi media *nutrient* agar dengan sumber karbon fruktosa.

Uji normalitas <i>One-Sample Kolmogorov Smirnov Test</i>	<i>Test of Homogeneity of Variances</i>	<i>One Way Anova Test</i>	<i>Post Hoc Multiple Comparisons (Tukey HSD & Games-Howell)</i>	Kesimpulan
Test Statistic 0,163 > 0,05 □ kelompok berdistribusi normal	p-value (sig.) 0,588 lebih besar dari nilai alpha= 0,05 □ H0 tidak ditolak □ Varian antar kelompok homogen	Nilai F hitung 285,916 > F tabel 4,07 dengan p-value (sig.) =0,000 □ H0 ditolak □ ada perbedaan	Sig = 0,000 (The mean difference is significant at the 0,05 level). Perbedaan terbesar terdapat pada media <i>Nutrient</i> agar dengan konsentrasi fruktosa 1%	Ada perbedaan bermakna secara signifikan pada rata-rata diameter zona jernih pada masing-masing media <i>Nutrient</i> agar dengan fruktosa dalam berbagai konsentrasi

Dalam memilih konsentrasi optimal dari fruktosa dalam menghasilkan enzim fibrinolitik, dilakukan uji statistika terlebih dahulu. Analisis statistika digunakan metode *one-way* ANOVA dengan syarat data penelitian harus memiliki distribusi yang normal dan homogen. Berdasarkan hasil statistik *one-way* ANOVA didapatkan bahwa nilai derajat kepercayaan hitung (α) lebih kecil daripada nilai derajat kepercayaan yaitu 0.05 yang menunjukkan terdapat perbedaan bermakna. Untuk mengetahui konsentrasi mana dari media *nutrient* agar dengan fruktosa yang memiliki perbedaan bermakna maka dilakukan *post-hoc test* yaitu HSD Tukey dan didapatkan hasil bahwa perbedaan terbesar terdapat pada media *Nutrient* agar dengan konsentrasi fruktosa 1% dalam menghasilkan enzim fibrinolitik maksimal dari *Bacillus sphaericus* BM 9.1

Kesimpulan

Bacillus sphaericus BM 9.1 yang ditumbuhkan pada media dengan sumber karbon glukosa, fruktosa, sukrosa, dan amilum mampu menghasilkan enzim fibrinolitik. Sumber karbon glukosa, fruktosa, sukrosa, dan amilum memiliki pengaruh dalam memproduksi enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh *Bacillus sphaericus* BM 9.1, namun sumber karbon organik yang memiliki pengaruh paling besar yaitu fruktosa. Konsentrasi optimum yang dapat memproduksi enzim fibrinolitik maksimum yaitu pada sumber karbon fruktosa dengan konsentrasi 1%.

Daftar Pustaka

- Arulanantham, A., Sevvell, P., Nirmala, R., and Kularajany N. 2012. Alternative culture media for bacterial growth using different formulation of protein sources. *Scholar Research Library.*, 2(6): 697-700
- Ashipala, O. K., and He, Q. 2008. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). *Bioresource Technology.*, 99(10):4112-9.
- Atlas, M. Ronald. 2010. *Handbook of Microbiological Media Fourth Edition.* United States of America.
- Fakhri, C.H. 2015. "Skrinning Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik Asal Perairan Pantai Ekowisata Mangrove Wonorejo Kota Surabaya". *Skripsi.* Surabaya: Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga.
- Kotb, E. 2013. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 97(15): 6647–6665.
- Kotb, E. 2015. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 51(1): 34–43.
- Meyrath, J. and Volavsec, U. 1975. *Production and Microbial Enzyme, in Food Processing edited by Reed G.* New York: Academic Press.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran.* Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Vijayaraghavan, P., Samuel, G.P.V., Mariadhas, V.A., Naif, A.A.D. 2016. Bioconversion of Agro-industrial Wastes for the Production of Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus Halodurans* IND18: Purification and biochemical characterization. *Electronic Journal of Biotechnology.* Volume 20, pages 1–8.