

Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Fibrinolitik Hasil Fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Amira Dira SURTI¹⁾, Achmad Toto POERNOMO^{1*)}, Isnaeni¹⁾, M. Faris ADRIANTO¹⁾

¹⁾Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

*Corresponding author: achmad.toto.p@gmail.com

ABSTRAK

Enzim fibrinolitik ditemukan pada beberapa mikroorganisme, termasuk *Bacillus subtilis*. Aktivitas enzim fibrinolitik *Bacillus subtilis* dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi substrat, pH, suhu, inhibitor, dan aktivator. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik *Bacillus subtilis* dalam medium molase. Molase mengandung gula 62% dari total gula, sehingga berpotensi sebagai substrat bagi pertumbuhan mikroba. Aktivitas enzim diukur sebagai satuan tirosin per mililiter per menit. Kruud enzim diperoleh pada kisaran pH dan suhu masing-masing 5.0-9.0 dan 20-60° C. Aktivitas fibrinolitik optimal 0,3897 Unit.mL⁻¹.minute⁻¹. Aktivitas enzim tersebut diperoleh dalam medium molase 0,1% pada suhu dan pH masing-masing 28° C dan 6,0.

Kata kunci: pH, suhu, enzim fibrinolitik, *Bacillus subtilis* ATCC 6633

ABSTRACT

Fibrinolytic enzyme was found in some microorganisms, including *Bacillus subtilis*. Fibrinolytic enzyme activity of *Bacillus subtilis* was influenced by several factors, such as substrate concentration, pH, temperature, inhibitors, and activator. This research had been done for determining the influence of pH and temperature on fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* in molasses medium. Molasses containing sugar 62% of the total sugar, so it is potentially as a substrate for microbial growth. Enzyme activity was measured as unit of tyrosine per milliliter per minute. Crude enzymes were obtained after microbial incubation process for 30 hours. The enzyme activity assay was determined at the pH and temperature range of 5.0-9.0 and 20-60°C, respectively. The optimum fibrinolytic activity was 0.3897 Unit.mL⁻¹.minute⁻¹. That enzyme activity was obtained in 0.1% molasses medium at the temperature and pH of 28°C and 6.0, respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fibrinolytic enzyme, fibrinolytic activity, molasse.

PENDAHULUAN

Peranan enzim sebagai biokatalisator dalam berbagai bidang industri semakin penting. Enzim fibrinolitik sangat berperan dalam proses pembekuan darah. Menurut Kotb (2012) terdapat banyak bakteri penghasil enzim fibrinolitik, salah satunya adalah *Bacillus subtilis*. Aktivitas enzim fibrinolitik *Bacillus subtilis* dipengaruhi oleh faktor konsentrasi enzim, substrat, pH, suhu lingkungan, senyawa inhibitor, dan aktivator (Noviyanti and Ardiningsih, 2013). Pada penelitian ini dilakukan pengujian pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik Hasil yang diperoleh adalah profil pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik. Fibrin yang digunakan sebagai substrat reaksi enzimatis akan menghasilkan produk berupa asam amino, antara lain tirosin, fenilalanin dan triptofan. Tirosin digunakan sebagai standar baku yang diukur dengan spektrofotometer UV pada λ_{maks} 274 nm. Nilai dari aktivitas fibrinolitik yang terukur dinyatakan dalam unit per mL tyrosine per menit (Yusriah and Kuswytasari, 2013).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bacillus subtilis ATCC 6633 (Thermo scientific), Nutrient broth (Oxoid), Skim Milk Agar

(SMA), fibrin bovine blood (SIMAGCHEN), Agar Bacteriological (Oxoid), dapar fosfat, metilen blue, molase, air suling, L-tirosin (Merck), TCA p.a (Merck), NaCl (Merc), dan Natto-10 (Lappi Laboratories)

Alat

Cawan petri, labu ukur, pipet mikro (Soccorex), gelas ukur, venoject, pipet volum, tabung sentifuge, jangka sorong, sonicator, incubator (Mettler), vortex Genie (Wilen), tabung appendorf, sengkeli (Öse), autoclave (HL-340 Speedy Autoclave), centrifuge Hettich Zentrifugen EBA 20, hotplate, timbangan digital (Sartorius Type BP 221S), spektrofotometer UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda EZ 201), Laminar Air Flow (type pvc-750 APG seisa KHUSO LTD), thermoshaker Gerhardt (TH0500).

Penapisan Aktivitas Proteolitik

Penapisan enzim proteolitik dilakukan pada media skim milk agar. Media dibuat dengan cara membuat larutan 15% susu skim, yaitu dengan menimbang 6,0 gram susu skim dilarutkan dalam 40,0 mL aqua bidest, kemudian disterilkan dengan cara pasteurisasi, yaitu dipanaskan 90°C selama 15 menit di atas hotplate. Sedangkan, larutan agar 2% dibuat dengan cara menimbang 1,2 gram agar yang dilarutkan dalam

60,0 mL aqua bidest, kemudian disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 30 menit. Larutan susu skim yang telah dipasteurisasi dicampur dengan larutan agar yang telah disterilisasi dengan cara memanaskan di atas *hotplate* 90°C dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga menjadi campuran yang homogen. Media penapisan proteolitik menggunakan media *skim milk agar* sebagai *single layer*. Media *skim milk agar* diambil 20,0 mL untuk dituang ke cawan petri (Sevinc and Demirkan, 2011). Suspensi bakteri (transmitan 25% pada spektrofotometer *visible* dengan panjang gelombang 580 nm) dimasukkan dalam sumur media penapisan *skim milk agar*. Sumur yang lain diisi dengan dapar fosfat 0,2 M pH 7,8 sebagai kontrol negatif. Kemudian media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam hingga dapat diamati zona jernih. Diameter zona jernih diukur dan ditentukan indeks proteolitiknya (Mishra, 2016). Indeks proteolitik = perbandingan diameter zona jernih dengan diameter koloni bakteri (Prihanto *et al.*, 2013).

Penapisan Aktivitas Fibrinolitik dengan *Fibrin Plate*

Penapisan enzim fibrinolitik dilakukan pada media *fibrin plate* yang dibuat dengan cara membuat larutan 0,3% fibrin, yaitu dengan menimbang 0,12 gram fibrin dilarutkan dalam 40,0 mL dapar fosfat 0,2 M pH 7,8, kemudian disterilkan dengan pasteurisasi selama 30 menit. Sedangkan, larutan agar 2% dibuat dengan cara menimbang 1,2 gram agar yang dilarutkan dalam 60,0 mL aqua bidest, kemudian disterilkan dengan autoklaf 121°C selama 30 menit. Larutan fibrin yang telah disterilisasi dicampur dengan larutan agar yang telah disterilisasi dan 400 µL larutan *methylene blue* 2000 µg/mL untuk setiap 20,0 mL media, kemudian dipanaskan di atas *hotplate* 90°C dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga menjadi campuran yang homogen. Media penapisan fibrinolitik menggunakan *fibrin plate* sebanyak 20,0 mL sebagai *single layer* (Kotb, 2013). Dibuat beberapa sumur pada setiap *fibrin plate*, yaitu terdapat beberapa sumur yang masing-masing berisi dapar fosfat 0,2 M pH 7,8, suspensi bakteri dengan transmitan 25% dan natto 2000 µg/mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Natto digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan dapar fosfat 0,2 M pH 7,8 sebagai kontrol negatif. Diameter zona jernih diukur menggunakan jangka sorong. Diukur diameter zona jernih dan ditentukan indeks proteolitiknya (Chung *et al.*, 2010).

Pembuatan Starter

Biakan murni *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang positif memberikan zona jernih pada uji *fibrin plate* diperbanyak dengan menumbuhkannya di media *nutrient agar*. Inokulum *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang telah diinkubasi selama 1 hari ditambah dengan 9,0 mL larutan NaCl 0,9% steril, kemudian divortex sampai bakteri terlepas dari medianya. Kemudian dilakukan pengenceran sampai didapatkan suspensi bakteri dengan transmitan sebesar 25%. Dimasukkan 10,0 mL suspensi ke dalam erlenmeyer yang berisi 100,0 mL *nutrient broth*. Bakteri diinkubasi pada *shaker incubator* dengan

kecepatan pengocokan 90 rpm selama 24 jam dengan suhu 28°C (Bhasin, Joshi and Modi, 2016).

Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan dan produksi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dilakukan pada media *molasses broth* dengan tiga macam konsentrasi, yaitu 0,1%; 0,25%; dan 0,5%. Suspensi starter diambil 15,0 mL untuk dicampurkan dengan 150,0 mL molase pada Erlenmeyer. Diinkubasi pada temperatur 28°C selama 30 jam dalam *shaker incubator* dengan kecepatan pengocokan 90 rpm. Setiap interval 3 jam diambil sebanyak 5,0 mL, divortex dan diukur *optical density* (OD) pada panjang gelombang 580 nm serta dilakukan uji aktivitas enzim fibrinolitik. Pada kurva pertumbuhan bakteri, sebagai sumbu x adalah waktu inkubasi (jam ke-) sedangkan sumbu y adalah *optical density* (Younis *et al.*, 2010).

Uji Aktivitas Enzim Metode Spektrofotometri Ultraviolet

Aktivitas enzim fibrinolitik diukur dengan metode modifikasi (Chang *et al.*, 2012) dengan menggunakan substrat fibrin (3% b/v). Sebanyak 1 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dicampur dengan 1 mL fibrin 3% (3,0 gram fibrin dalam 100,0 mL aqua bidest), kemudian ditambahkan 1 mL larutan enzim (hasil fermentasi) pada tabung sampel. Sedangkan untuk tabung blanko dimasukkan 1 mL fibrin 3% dan 2,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8. Kemudian kedua tabung tersebut diinkubasi selama 10 menit pada suhu 28°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan TCA (trichloro acetic acid) 5% (5,0 gram TCA dalam 100,0 mL aqua bidest) sebanyak 1,0 mL. Setelah penambahan TCA, lalu disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 15 menit. Kemudian supernatan yang berisi *crude enzyme* diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tirosin, yaitu 274 nm. Nilai *optical density* yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar tirosin untuk menentukan unit aktivitas enzim yang terkandung dalam sampel enzim.

Kurva baku tirosin menunjukkan hubungan antara konsentrasi standar tirosin dan absorbansi. Dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi tirosin 10-100 µg/mL (100,0 mg tirosin dilarutkan dalam 1,0 L HCl 0,1 M). Kemudian dilakukan scanning pada panjang gelombang UV terhadap larutan tirosin untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum (Wijaya, 2005; Sitanggang, 2006). Dibuat kurva *optical density* dan uji aktivitas enzim fibrinolitik (sumbu x = waktu inkubasi (jam ke-); sumbu y = *optical density*). Waktu di mana unit aktivitas enzim fibrinolitik paling tinggi merupakan waktu pengambilan sampel untuk produksi enzim fibrinolitik (Hassanein *et al.*, 2011).

Produksi Enzim Fibrinolitik

Dari kurva aktivitas enzim fibrinolitik dipilih jam inkubasi yang memiliki unit aktivitas tertinggi untuk dilakukan produksi. Produksi enzim fibrinolitik dilakukan dalam kondisi yang sama seperti proses

pengambilan sampel, yaitu 25% transmittan suspensi bakteri yang telah dilakukan peremajaan selama 1 hari, dalam Erlenmeyer yang berisi 150,0 mL molase, lalu diinkubasi pada temperatur 28°C selama waktu aktivitas enzim fibrinolitik maksimum dalam *shaker incubator* dengan kecepatan pengocokan 90 rpm. Diambil larutan sebanyak 20,0 mL dari media produksi, diuji aktivitasnya lalu pada panjang gelombang 274 nm. (Younis *et al.*, 2010).

Penentuan Suhu Optimum

Prosedur kerja penentuan suhu optimum enzim fibrinolitik sama seperti uji aktivitas dengan variasi suhu pengujian 20-60°C (20, 28, 40, 50, dan 60°C) dalam 0,05 M buffer fosfat pH 7,8 (Younis *et al.*, 2010).

Penentuan pH Optimum

Prosedur kerja penetapan pH optimum enzim fibrinolitik sama seperti uji aktivitas enzim, tetapi dengan variasi pH. Penentuan pH optimum dilakukan pada variasi pH 5,0-9,0, yaitu dapar asetat (pH 5,0), dapar fosfat (pH 6,0; 7,0; dan 7,8), dan dapar borat (pH 9,0) (Younis *et al.*, 2010).

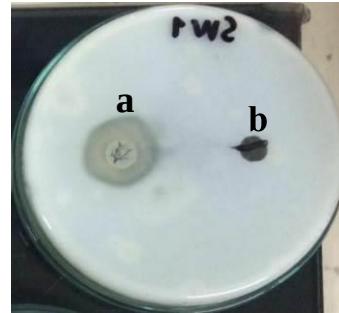
Pembuatan Kurva Baku Tirosin

Dibuat baku induk tirosin 500,0 ppm dengan cara menimbang 50,0 mg tirosin dilarutkan dengan HCl 0,1 M dalam *beaker glass*, lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 100,0 mL, dilakukan ultra sonikasi selama 5 menit untuk menyempurnakan kelarutan tirosin, dan ditambahkan pelarut HCl hingga tepat tanda. Labu ukur ditutup rapat lalu homogenkan. Dibuat larutan baku kerja 5,0; 10,0; 30,0; 50,0; 80,0; 100,0; 200,0; dan 300,0 ppm dari larutan baku induk yang telah dibuat. Ukur absorbansi dari tiap-tiap standar baku kerja pada λ maksimum tirosin (274 nm), sebagai blanko adalah larutan HCl 0,1 M. Kurva standar baku tirosin diperoleh dari nilai absorbansi sebagai sumbu Y dan kadar standar baku tirosin (ppm) sebagai sumbu X.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penapisan Enzim Proteolitik dari Hasil Fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Gambar 1 menunjukkan hasil penapisan enzim proteolitik dilakukan dengan media susu skim. Warna putih dari susu skim disebabkan adanya ikatan kompleks kalsium-protein, kemudian terbentuk zona jernih karena terhidrolisisnya protein oleh enzim proteolitik, menghasilkan asam amino yang lebih larut dalam media.



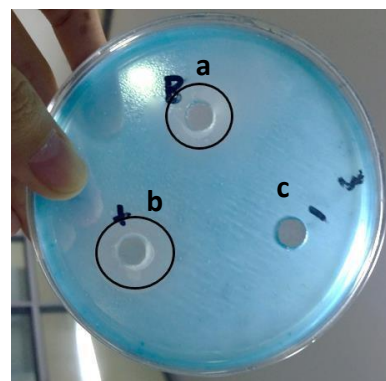
Gambar 1. Hasil penapisan enzim proteolitik *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang diinkubasi selama 24 jam dengan pengisian lubang sumbu (a) suspensi *Bacillus subtilis* ATCC 6633; (b) dapar fosfat 0,2 M pH 7,8 (kontrol negatif).

Tabel 1. Hasil pengamatan harga indeks proteolitik

No	Suspensi <i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 6633	Indeks Proteolitik
a	Replikasi 1	2,80
	Replikasi 2	2,60
	Replikasi 3	2,70
	Rata-rata $\pm$ SD	2,70 $\pm$ 0,10
b	Dapar fosfat 0,2M pH 7,8 (kontrol negatif)	(-)

Hasil Penapisan Enzim Fibrinolitik dari Hasil Fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Sebagai metode awal untuk mengetahui aktivitas enzim fibrinolitik perlu dilakukan penapisan enzim fibrinolitik dengan cara uji *fibrin plate*. Zona jernih terbentuk dikarenakan oleh proses lisis substrat fibrin berwarna putih keruh yang dicampur dalam media.



Gambar 2. Hasil penapisan fibrinolitik dengan lubang sumbu (a) suspensi *Bacillus subtilis* ATCC 6633; (b) Nattokinase (kontrol positif); (c) dapar fosfat 0,2 M pH 7,8 (kontrol negatif).

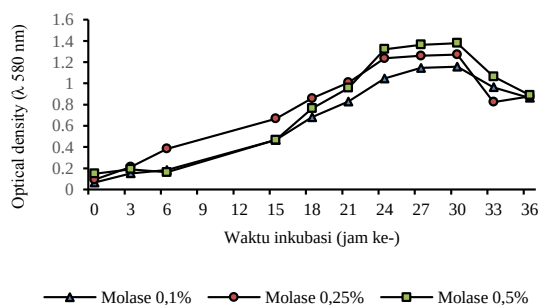
Tabel 2. Hasil pengamatan harga indeks fibrinolitik

No	Suspensi <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Indeks fibrinolitik
a	Replikasi 1	2,10
	Replikasi 2	2,30
	Replikasi 3	2,50
	Rata-rata ± SD	2,30 ± 0,20
b	Nattokinase (kontrol positif)	2,60
c	Dapar fosfat 0,2 M pH 7,8 (kontrol negatif)	(-)

Kurva Pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Untuk memperoleh kurva pertumbuhan, bakteri ditanam pada media pertumbuhan molase dengan beragam konsentrasi dan diinkubasi pada suhu pertumbuhan 28°C. Data yang diperoleh didasarkan pada kekeruhan media pertumbuhan dari waktu ke waktu dan diukur menggunakan spektrofotometer *visible* pada λ 580 nm seperti pada Tabel 3. Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ditampilkan pada Gambar 3.

Dari Gambar 3 dapat dilihat kurva pertumbuhan bakteri yang menunjukkan bahwa fase *lag* berlangsung pada 6 jam pertama, sedangkan fase *log* yang merupakan fase pertumbuhan maksimal berlangsung hingga jam ke-24 dan mencapai fase stasioner hingga jam ke-30. Pada jam ke-33 dan 36 terjadi penurunan aktivitas fibrinolitik, hal ini



Gambar 3. Kurva pertumbuhan dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%; 0,25%; dan 0,5%.

Penetapan Aktivitas Fibrinolitik

Data absorbansi hasil uji aktivitas fibrinolitik disubstitusikan pada kurva baku tirosin untuk mendapatkan unit aktivitas enzim fibrinolitik yang terkandung dalam sampel. Perhitungan aktivitas fibrinolitik ditampilkan pada Tabel 4. Satu unit aktivitas enzim fibrinolitik (U) didefinisikan sebagai banyaknya mL enzim yang dibutuhkan untuk disebut fase *decline*. menghasilkan 1 μ mol tirosin tiap menit dengan fibrin sebagai substrat, sehingga aktivitas enzim fibrinolitik dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{Akt. Fibrinolitik} \frac{U}{ml} = \frac{[Ts] \left(\frac{\mu g}{ml} \right) \times \text{Vol reaksi (ml)}}{t(\text{menit}) \times V_{\text{sampel}} (ml) \times \text{BM tir} \left(\frac{\mu g}{\mu mol} \right)} = \frac{\mu mol}{ml \cdot \text{menit}}$$

[Ts] : Konsentrasi tirosin sampel dalam (μ g/ml) x faktor pengenceran

V reaksi : Volume akhir pada reaksi enzim

t : Waktu inkubasi/waktu reaksi (10 menit)

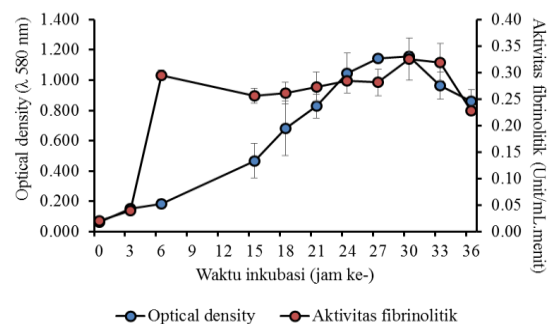
V sampe: Volume enzim (sampel) yang digunakan pada reaksi

BM tir : Berat Molekul tirosin (181,2 μ g / μ mol)

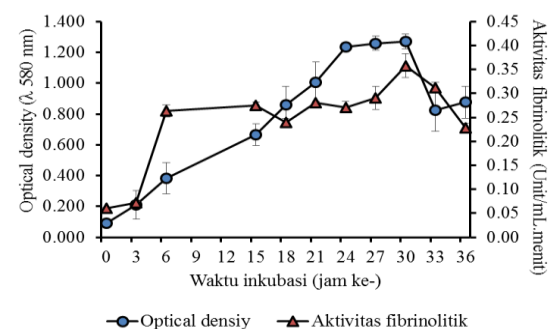
Aktifitas Fibrinolitik : U/ml.

Hasil Plot antara Kurva Pertumbuhan dan Kurva Produksi

Kurva pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan kurva produksi enzim fibrinolitik diplot untuk mendapatkan waktu pengambilan sampel, yaitu waktu absorbansi kurva produksi enzim fibrinolitik yang terbesar. Hasil plot tersebut dapat dilihat pada Gambar 4 – Gambar 6. Dari ketiga gambar tersebut dapat dilihat bahwa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mempunyai absorbansi kurva produksi enzim fibrinolitik terbesar pada jam ke-30, sehingga waktu pengambilan sampel untuk uji pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik adalah jam ke-30.



Gambar 4. Hasil plot kurva pertumbuhan dan kurva produksi hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%.



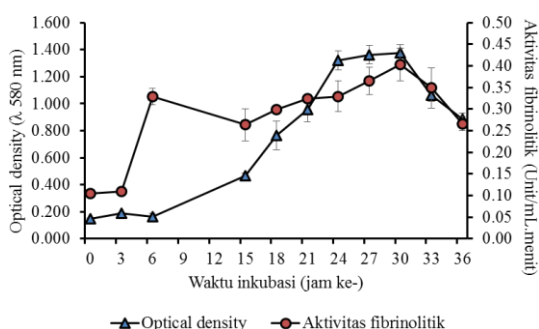
Gambar 5. Hasil plot kurva pertumbuhan dan kurva produksi hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,25%.

Tabel 3. Hasil pengamatan *optical density* dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%; 0,25%; dan 0,5%. (dilakukan 3 kali replikasi)

Waktu inkubasi (jam ke-)	Molase 0,1%		Molase 0,25%		Molase 0,5%	
	OD rata-rata	SD	OD rata-rata	SD	OD rata-rata	SD
0	0,065	0,001	0,092	0,002	0,148	0,008
3	0,151	0,017	0,211	0,092	0,190	0,004
6	0,183	0,030	0,383	0,103	0,161	0,029
15	0,467	0,115	0,667	0,071	0,467	0,018
18	0,681	0,180	0,858	0,120	0,764	0,105
21	0,828	0,077	1,007	0,129	0,956	0,090
24	1,045	0,133	1,235	0,025	1,321	0,069
27	1,145	0,021	1,259	0,046	1,363	0,067
30	1,157	0,029	1,271	0,049	1,378	0,062
33	0,962	0,089	0,824	0,137	1,063	0,043
36	0,863	0,076	0,876	0,105	0,888	0,045

Tabel 4. Hasil pengamatan aktivitas fibrinolitik hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%; 0,25%; dan 0,5%. (dilakukan 3 kali replikasi)

Waktu inkubasi (jam ke-)	Molase 0,1%		Molase 0,25%		Molase 0,5%	
	Aktivitas (U/mL.mnt)	SD	Aktivitas (U/mL.mnt)	SD	Aktivitas (U/mL.mnt)	SD
0	0,0194	0,0030	0,0688	0,0013	0,1220	0,0009
3	0,0377	0,0017	0,0706	0,0010	0,1079	0,0003
6	0,2896	0,0046	0,2713	0,0015	0,3469	0,0451
15	0,2539	0,0198	0,2691	0,0149	0,2614	0,0631
18	0,2598	0,0286	0,2439	0,0004	0,2841	0,0143
21	0,2699	0,0382	0,2786	0,0002	0,2826	0,0669
24	0,2849	0,0085	0,2757	0,0124	0,3166	0,0386
27	0,2744	0,0303	0,3001	0,0248	0,3543	0,0350
30	0,3349	0,0502	0,3306	0,0028	0,4175	0,0404
33	0,1938	0,0073	0,2197	0,0508	0,2848	0,0171
36	0,2173	0,0172	0,1791	0,0382	0,2901	0,0125



Gambar 6. Hasil plot kurva pertumbuhan dan kurva produksi hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,5%.

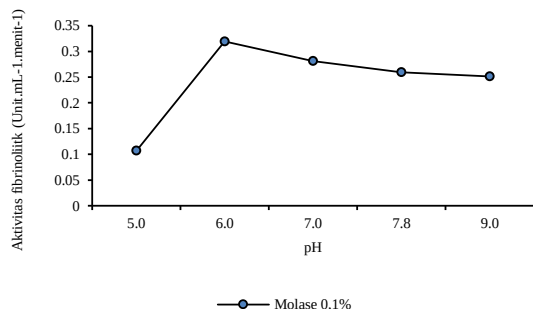
Pengaruh pH terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik
Untuk mengetahui pH optimum aktifitas enzim fibrinolitik dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dilakukan

pengujian aktivitas enzim pada pH 5,0; 6,0; 7,0; 7,8; dan 9,0 dengan suhu 28°C. Variasi pH menggunakan dapar asetat (pH 5,0), dapar fosfat (pH 6,0; 7,0; dan 7,8), dan dapar borat (pH 9,0). Hasil pengujian disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengamatan pengaruh pH terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%. (dilakukan 3 kali replikasi)

Perlakuan pH	Molase 0,1%	
	Aktivitas (Unit.mL ⁻¹ .menit ⁻¹)	SD
5,0	0,1067	0,0057
6,0	0,3194	0,0085
7,0	0,2810	0,0173
7,8	0,2593	0,0094
9,0	0,2513	0,0048

Berikut ini adalah profil pengaruh pH terhadap aktivitas enzim fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Pada pH 6,0 merupakan pH optimal dari aktivitas enzim fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan nilai aktivitas enzim fibrinolitik sebesar $0,3194 \pm 0,0085$. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1% ditampilkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva pengaruh pH terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%.

Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Untuk mengetahui suhu optimum aktifitas enzim fibrinolitik dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dilakukan pengujian aktivitas enzim pada suhu 20, 28, 40, 50, dan 60°C dengan dapar fosfat pH 7,8. Suhu 20°C dilakukan pada wadah berisi es batu. Sedangkan pada suhu tinggi digunakan oven. Hasil pengujian disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Pengaruh suhu terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%. (dilakukan 3 kali replikasi)

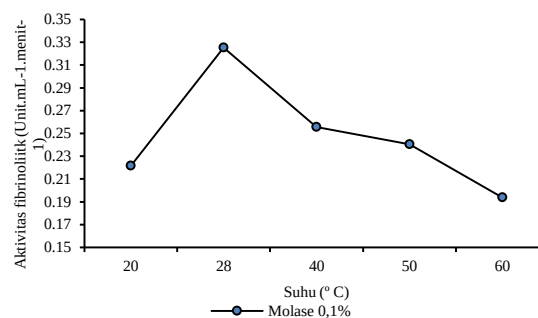
Perlakuan suhu (° C)	Molase 0,1%	
	Aktivitas (Unit.mL ⁻¹ .menit ⁻¹)	SD
20	0,2216	0,0339
28	0,3253	0,0392
40	0,2556	0,0267
50	0,2404	0,0315
60	0,1938	0,0310

Berikut ini adalah profil pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Pada suhu 28°C merupakan suhu optimal dari aktivitas enzim fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan nilai aktivitas enzim fibrinolitik sebesar $0,3253 \pm 0,0392$. Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1% ditampilkan pada Gambar 8.

Hasil Uji Statistik

Hasil optimasi konsentrasi media pertumbuhan dan produksi enzim diuji dengan cara perhitungan

statistik independent t test. Independent t test menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara aktivitas fibrinolitik dengan ketiga perbedaan konsentrasi media, yaitu media molase 0,1%; 0,25%; dan 0,5%. Oleh karena itu, pada penelitian ini dipilih media molase 0,1% (konsentrasi terkecil) sebagai media pertumbuhan dan produksi enzim. Media molase 0,1%, dianggap paling efektif dan ekonomis bila ditinjau dari segi industri.



Gambar 8. Kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas fibrinolitik dari hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media molase 0,1%.

Uji varian one-way anova dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara 5 macam variasi pengaruh pH dan suhu, yaitu pH 5,0-9,0 (5,0; 6,0; 7,0; 7,8; dan 9,0) dan suhu 20-60°C (20, 28, 40, 50, dan 60°C). Uji one-way anova mendapatkan nilai sig = 0,000 yang nilainya lebih kecil dari $\alpha = 0,05$ dan Fhitung = 298,272 yang nilainya lebih besar dari Ftabel = 3,478 sehingga H_0 diterima berarti ada perbedaan bermakna antara aktivitas fibrinolitik oleh pengaruh pH. Sedangkan untuk pengaruh suhu dengan uji one-way anova mendapatkan nilai sig = 0,006 yang nilainya lebih kecil dari $\alpha = 0,05$ dan Fhitung = 6,811 yang nilainya lebih besar dari Ftabel = 3,478 sehingga H_0 diterima berarti ada perbedaan bermakna antara aktivitas fibrinolitik oleh pengaruh suhu. Kerja enzim sangat tergantung pada kondisi lingkungannya. Perubahan kondisi lingkungan dapat mempengaruhi kerja enzim secara keseluruhan. Enzim juga dapat bekerja secara maksimal dan efisien jika berada pada kondisi lingkungan yang optimum. Kondisi optimum ini berbeda pada setiap enzim. Oleh karena itu, agar enzim dapat bekerja secara optimum, maka perlu diketahui karakteristik secara biokimiawi. Pada penelitian ini karakterisasi dilakukan pada aktivitas fibrinolitik yang meliputi pH dan suhu.

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim pada berbagai variasi suhu. Variasi suhu yang digunakan adalah 20, 28, 40, 50, dan 60°C. Aktivitas fibrinolitik hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mengalami peningkatan aktivitas mulai dari suhu 20°C (68%) hingga mencapai optimum pada suhu 28°C (100%) dengan aktivitas $0,3253 \pm 0,0392$ Unit.mL⁻¹.menit⁻¹ pada media molase 0,1%. Pengujian aktivitas mengalami penurunan mulai dari suhu 40°C (79%) hingga 60°C (60%). Hal ini memiliki

persamaan hasil dengan penelitian yang dilakukan oleh Bajaj, 2014, *Bacillus subtilis* I-2 memiliki stabilitas suhu

30-50°C dalam produksi fibrinolitik pada inkubasi 60 menit.

Tabel 7. Hasil Pengamatan Aktivitas Fibrinolitik dalam Media Molase 0,1% dengan pH 6,0 dan suhu 28°C.

Waktu inkubasi (jam ke)	Absorbansi (λ 274 nm)				Aktivitas fibrinolitik dalam media molase 0,1% (Unit/mL.menit)			
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata
0	0,1133	0,0850	0,1071	0,1018	0,0341	0,0238	0,0319	0,0299
3	0,1383	0,0866	0,1162	0,1137	0,0433	0,0244	0,0352	0,0343
6	0,7583	0,7161	0,7331	0,7358	0,2694	0,2540	0,2602	0,2612
15	0,9252	0,8397	0,7573	0,8407	0,3303	0,2991	0,2691	0,2995
18	0,7367	0,7558	0,8154	0,7693	0,2616	0,2685	0,2903	0,2734
21	0,8436	0,8013	0,8841	0,8430	0,3005	0,2851	0,3153	0,3003
24	0,8503	0,852	0,8509	0,8511	0,3030	0,3036	0,3032	0,3033
27	0,8974	0,9802	0,9253	0,9343	0,3202	0,3504	0,3304	0,3336
30	1,0512	1,1964	1,0167	1,0881	0,3763	0,4292	0,3637	0,3897
33	0,9025	0,9047	0,8798	0,8957	0,3220	0,3228	0,3138	0,3195

Setiap enzim memiliki aktivitas maksimal pada suhu tertentu. Enzim pada suhu rendah memiliki aktivitas kecil karena tumbukan antar partikel rendah. Adanya peningkatan suhu, maka akan terjadi peningkatan kecepatan reaksi, molekul bergerak lebih cepat dikarenakan kenaikan suhu, sehingga akan banyak interaksi antara enzim dan substrat. Ketika terjadi peningkatan suhu mencapai dan melampaui batas suhu tertentu, maka akan terjadi denaturasi, yaitu perubahan struktur enzim secara permanen yang menginaktivasi enzim. Saat terjadi denaturasi, ikatan kimia terputus dan enzim kehilangan bentuk spesifiknya (Dennison, 2002). Struktur protein menentukan aktivitas enzim dan apabila strukturnya berubah, maka aktivitasnya akan berubah pula (Wijaya, 2005).

Selain dipengaruhi oleh suhu, aktivitas fibrinolitik juga dipengaruhi oleh pH. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim dilakukan menggunakan dapar asetat (pH 5,0), dapar fosfat (pH 6,0; 7,0; dan 7,8), dan dapar borat (pH 9,0). Aktivitas fibrinolitik hasil fermentasi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mengalami peningkatan mulai dari pH 5,0 (27%) hingga mencapai optimum pada pH 6,0 (100%) dengan aktivitas $0,3897 \pm 0,0083$ Unit.mL⁻¹.menit⁻¹ pada media molase 0,1%. Aktivitas fibrinolitik mengalami penurunan mulai dari pH 7,0 (72%) hingga pH 9,0 (64%). Hal ini memiliki persamaan hasil dengan penelitian yang dilakukan oleh Bajaj, 2014, *Bacillus* sp. tidak stabil dalam suasana asam dan memiliki stabilitas pada pH netral dalam produksi fibrinolitik pada inkubasi 60 menit. Aktivitas untuk masing-masing enzim berada pada daerah stabilitas pH optimal. Tinggi atau rendahnya pH juga akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim dan memberikan efek pada struktur ion dari enzim, substrat, atau keduanya. pH lingkungan yang terus berubah terjadi karena adanya perubahan gugus ionik enzim pada sisi aktif atau sisi lain yang secara tidak langsung

mempengaruhi sisi aktif ionisasi. Perubahan ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Murray *et al.*, 2006).

Penentuan pH dan suhu optimum terhadap aktivitas fibrinolitik dilakukan pada berbagai pH dan suhu. Hasil unit aktivitas fibrinolitik diperoleh bahwa terdapat perbedaan bermakna antara pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas fibrinolitik dengan cara perhitungan statistik *one-way anova*. Dari hasil pengamatan aktivitas fibrinolitik diperoleh unit aktivitas fibrinolitik optimum pada pH 6,0 dan suhu 28°C dengan nilai unit aktivitas $0,3897 \pm 0,0083$ Unit.mL⁻¹.menit⁻¹ pada media molase 0,1%.

KESIMPULAN

Bacillus subtilis ATCC 6633 mampu menghasilkan enzim fibrinolitik pada media fibrin plate yang diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan nilai indeks fibrinolitik sebesar $2,30 \pm 0,20$ mm. Molase dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan produksi enzim fibrinolitik, dengan konsentrasi optimum 0,1% sebagai karbon tunggal. Pada konsentrasi tersebut, dapat memberikan aktivitas enzim fibrinolitik sebesar $0,3254 \pm 0,0392$ Unit.mL⁻¹.menit⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Chang, C., Wang, P., Hung, Y. and Chung, Y. (2012) 'Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* - fermented red bean', Food Chemistry. Elsevier Ltd, 133(4), pp. 1611–1617. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.061.
- Chung, D. M., Choi, N. S., Maeng, P. J., Chun, H. K. and Kim, S. H. (2010) 'Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from chive (*Allium tuberosum*)', Food Science

- and Biotechnology. doi: 10.1007/s10068-010-0098-7.
- Hassanein, W. A., Kotb, E., Awny, N. M. and El-Zawahry, Y. A. (2011) 'Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42', *Journal of biosciences*. Springer, 36(5), pp. 773–779.
- Kotb, E. (2012) *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. 1st edn, SpringerBriefs in Microbiology. 1st edn. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. doi: 10.1007/978-3-642-24980-8.
- Kotb, E. (2013) 'Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes', *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 6647–6665. doi: 10.1007/s00253-013-5052-1.
- Mishra, V. K. (2016) 'Optimization of thermotolerant alkaline protease production from *Brevibacillus brevis* strain BT2 using surface response methodology', *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. Elsevier, 7, pp. 87–94.
- Murray, R.K., Granner D.K., & Rodwell, V.W., 2006. Eds. 27. *Biokimia Harper*. Diterjemahkan oleh Wulandari, N., Rendy, L., Dwijayanthi, L., Liena., Dany, F., dan Rachman, L.Y., Jakarta : EGC.
- Noviyanti, T. and Ardiningsih, P. (2013) 'Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protase Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels)', *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1(1), pp. 1–6. doi: 10.1117/12.559286.
- Noviyanti, T., Ardiningsih, P., Rahmalia, W. and Hadari Nawawi, J. H. (2013) 'Pengaruh Temperatur Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari Daun Sansakng (*Pycnarrhena Cauliflora* Diels)', *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1(1), pp. 1–6. Available at: <http://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmipa/article/view/990>.
- Prihanto, A. A., Darius, Firdaus, M. and Prihanto, A. A. (2013) 'Proteolytic and Fibrinolytic Activities of Halophilic Lactic Acid Bacteria From Two Indonesian Fermented Foods', *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(5), pp. 2291–2293.
- Sevinc, N. and Demirkan, E. (2011) 'Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties', *J. Biol. Environ. Sci*, 5(14), pp. 95–103.
- Sitanggang, P. P., et al., 2006. Isolasi dan karakterisasi enzim proteolitik dari ekstrak tape. Wang, S. L., et al., 2009. Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of marine wastes by these enzymes. *Marine Biotechnology*, 11, p.334–344.
- Wijaya, Rudy, 2005. *Karakteristik Enzim Serupa Tripsin dari Cacing Tanah*. [Tesis]. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Younis, M. A. M., Hezayen, F. F., Nour-Eldein, M. A. and Shabeb, M. S. A. (2010) 'Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses', *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 7(1), pp. 31–37.