

## ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK ENZIM FIBRINOLITIK BAKTERI YANG BERASAL DARI LIMBAH CAIR RUMAH PEMOTONGAN AYAM (RPA) DI KARANGANYAR

Ensa Ayu Permatasari<sup>1\*</sup>, Ana Indrayati<sup>2</sup>, Fitri Kurniasari<sup>3</sup>

Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta<sup>1,2,3</sup>

\*Corresponding Author : ensaayu6097@gmail.com

### ABSTRAK

Penumpukan fibrin berlebihan mengakibatkan thrombosis yang menyebabkan kelainan miokard serta penyakit kardiovaskular lain. Enzim fibrinolitik merupakan golongan enzim protease yang bekerja memecah fibrin. Enzim fibrinolitik dari mikroba dipilih sebagai alternatif yang lebih aman dan efektif untuk terapi trombolitik. Tujuan penelitian ini mengetahui bakteri yang diduga berpotensi sebagai agen fibrinolitik dan jenis bakteri yang mempunyai aktivitas enzim fibrinolitik tertinggi. Penelitian ini menggunakan sampel limbah cair industri RPA di Karanganyar. Penelitian ini diawali pengambilan sampel, isolasi bakteri, uji aktivitas proteolitik, pemurnian bakteri, identifikasi bakteri pewarnaan gram serta uji biokimia, ekstraksi enzim, pemurnian ekstrak kasar enzim, uji aktivitas fibrinolitik metode Clot lysis, dan identifikasi secara molekuler berdasarkan sekuens gen 16S rRNA yang dibandingkan dengan data base *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Hasil uji proteolitik menghasilkan 4 koloni bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik pada media SMA. Hasil identifikasi pewarnaan Gram menunjukkan isolat bakteri 2, 5, 11 adalah Gram positif, sedangkan isolat bakteri 7 adalah Gram negatif. dan uji biokimia menunjukkan hasil yang bervariasi pada tiap isolat bakteri. Isolat RPA 7 menghasilkan persentase lisis terbesar dengan rata-rata nilai persentase lisis konsentrasi 20%, 40%, dan 80% secara berturut-turut adalah 6,42%; 30,57%; dan 55,13%. Berdasarkan hasil sekuensing yang dibandingkan dengan data base NCBI menggunakan BLAST isolat RPA 7 merupakan bakteri *Morganella morganii*.

**Kata kunci** : bakteri, *clot lysis*, enzim fibrinolitik, limbah cair RPA

### ABSTRACT

*Excessive fibrin buildup results in thrombosis that causes myocardial abnormalities and other cardiovascular diseases. Fibrinolytic enzymes are a class of protease enzymes that break down fibrin. Fibrinolytic enzymes from microbes are chosen as a safer and more effective alternative for thrombolytic therapy. The purpose of this study was to determine the bacteria suspected of having potential as fibrinolytic agents and the type of bacteria that have the highest fibrinolytic enzyme activity. This study used samples of RPA industrial wastewater in Karanganyar. This study began with sampling, isolation of bacteria, proteolytic activity test, purification of bacteria, identification of gram staining bacteria and biochemical tests, enzyme extraction, purification of enzyme crude extract, fibrinolytic activity test using Clot lysis method, and molecular identification based on 16S rRNA gene sequences compared with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) data base using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Proteolytic test results produced 4 bacterial colonies that have proteolytic activity on SMA media. The results of Gram stain identification showed that bacterial isolates 2, 5, 11 were Gram positive, while bacterial isolate 7 was Gram negative. and biochemical tests showed varying results in each bacterial isolate. Isolate RPA 7 produces the largest percentage of lysis with an average percentage value of lysis concentrations of 20%, 40%, and 80% are 6.42%; 30.57%; and 55.13%, respectively. Based on sequencing results compared with NCBI data base using BLAST, isolate RPA 7 is *Morganella morganii* bacteria.*

**Keywords** : *fibrinolytic enzyme, bacteria, RPA effluent, clot lysis*

### PENDAHULUAN

Fibrin merupakan protein yang membentuk gumpalan untuk menghentikan pendarahan setelah cedera maupun trauma (Sumi *et al.*, 1990). Penumpukan fibrin yang berlebihan

menyebabkan terjadinya thrombosis yang menyebabkan kelainan miokard serta penyakit kardiovaskular lain (Kim dan Choi, 2000). Obat trombolitik yang telah disetujui oleh FDA sebagai pengobatan penyakit karena trombosis yaitu *tissue plasminogen activator* (t-PA) dan streptokinase (SK) (Baruah *et al.*, 2006). Selain obat trombolitik tersebut terdapat suatu enzim yang mampu memecah gumpalan darah yaitu enzim fibrinolitik (Sumi *et al.*, 1990).

Enzim fibrinolitik adalah terapi antitrombotik yang dapat memecah trombus. Enzim fibrinolitik dibedakan menurut mekanisme kerjanya seperti jaringan plasminogen aktivator (t-PA), urokinase, dan protein plasmin (Kotb, 2012). Enzim fibrinolitik dapat memecah fibrin menjadi fragmen terlarut (Suhartono, 1992). Enzim fibrinolitik berasal dari tanaman, hewan, maupun mikroorganisme (Peng *et al.*, 2005). Enzim fibrinolitik dari sumber mikroba dipilih sebagai alternatif yang lebih aman dan efektif untuk terapi trombolitik yang mempunyai keterbatasan biaya produksi yang tinggi dan efek samping seperti perdarahan berlebihan (Bode *et al.*, 1996). Bakteri memiliki keunggulan karena sel bakteri mudah ditumbuhkan, produksi sel pada bakteri mudah ditingkatkan, pertumbuhan bakteri tidak bergantung musim, waktu yang diperlukan untuk tumbuh di media relatif cepat (Meyrath dan Volavseck, 1975), dapat ditumbuhkan di media yang murah, lebih mudah dikendalikan, dan dapat menghasilkan tingkat enzim sangat tinggi (Akhdiya, 2003). Sebagian besar enzim fibrinolitik yang berasal dari mikroorganisme dihasilkan oleh genus *Bacillus* (Mine *et al.*, 2005). Beberapa contoh spesies *Bacillus* yang mempunyai aktivitas fibrinolitik diantaranya yaitu *Bacillus subtilis* BK-17 (Jeong *et al.*, 2001), *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 (Peng *et al.*, 2003), *Bacillus thuringiensis* IROD1 (Safitri *et al.*, 2018), *Bacillus sp.* K-1 (Yang *et al.*, 2006).

Berdasarkan data BPS, permintaan daging ayam di Provinsi Jawa Tengah mencapai 621.718,06 ton pada tahun 2021 dan meningkat menjadi 742.948,31 ton pada tahun 2022 (Badan Pusat Statistik, 2022). Meningkatnya kebutuhan terhadap daging ayam mengakibatkan berdirinya usaha peternakan ayam potong dan rumah pemotongan ayam untuk memenuhi permintaan masyarakat (Singgih, 2008). Rumah Pemotongan Ayam (RPA) adalah industri yang mengolah ayam menjadi produk siap olah. RPA dibagi menjadi RPA skala kecil (tradisional) dan RPA skala besar (pabrik). Berdasarkan persyaratan yang tercantum dalam SNI 016160-1999, RPA membutuhkan lokasi dan fasilitas yang sesuai. Lokasi RPA harus jauh dari pemukiman penduduk supaya tidak menimbulkan pencemaran disekitar lokasi berdirinya RPA. Akan tetapi masih ada beberapa RPA skala kecil yang berbatasan langsung dengan jalan raya sehingga hal tersebut dapat menimbulkan polusi. Kegiatan yang ada di RPA menimbulkan berbagai macam limbah seperti limbah cair. Limbah cair tersebut berasal dari air hasil pencucian daging ayam serta peralatan yang digunakan untuk pemotongan ayam (Al Kholif, 2015). Limbah cair RPA mengandung limbah kimia-fisik dan mikrobiologi. Berdasarkan penelitian sebelumnya limbah cair RPA mengandung bakteri seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus fusiformis* (Tarntip dan Sirichom, 2011), *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.* (Herliani, 2015) dan *Escherichia coli* (Kartikasari, 2019). Penelitian ini bertujuan mengisolasi bakteri yang diduga berpotensi sebagai agen fibrinolitik dan menguji aktivitas ekstrak enzim fibrinolitik bakteri yang berasal dari limbah cair RPA di Karanganyar.

## METODE

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu Botol kaca steril, cooler box, sentrifugator, shaker, tabung eppendorf, *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit* (Zymo Research, USA), *MyTaq HS Red Mix* (Bioline, USA). Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu NaCl 0,9%, *Skim Milk Agar* (SMA), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), akuades, kristal violet, lugol iodine, alkohol, *Simmons Citrat Agar* (SCA), *Sulfit Indol Motility* (SIM), *Kligler Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, plasma darah kelinci, *Brain Heart Infusion* (BHI), ammonium sulfat, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), nattokinase, gel agarose 0,8%, buffer

Tris-Borat-EDTA (TBE), larutan Ethidium Bromide (EtBr). Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan di kawasan industri RPA yang berada di Karanganyar. Sampel diambil dengan kedalaman 10 cm dari air hasil pencucian peralatan untuk pemotongan ayam sebanyak 100 mL dan dimasukkan di dalam botol kaca yang telah disterilkan dalam oven pada suhu 160-170°C selama 2 jam (Setyaingtyas *et al.*, 2018; Ayun, 2019). Sampel dibawa ke laboratorium dengan menggunakan *cooler box* untuk melindungi sampel karena kerusakan akibat panas, selanjutnya dilakukan penelitian. Pengenceran  $10^{-1}$  dilakukan dengan dimasukkan 1 mL sampel dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL NaCl 0,9%. Sebanyak 1 mL larutan pengenceran  $10^{-1}$  diambil dan dimasukkan pada tabung reaksi berisi 9 mL NaCl 0,9% sehingga dihasilkan pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran bertingkat dilakukan hingga  $10^{-5}$  (Syarifuddin *et al.*, 2020). Pengenceran  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  diambil 100  $\mu$ L dan diinokulasi pada media NA dengan metode *pour plate*. Media NA diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam.

### Uji Aktivitas Proteolitik

Sebanyak 12 isolat bakteri dengan karakteristik morfologi yang berbeda diambil satu ose dan ditusukkan pada media SMA menggunakan jarum needle. Media SMA diinkubasi sesuai suhu sampel selama  $\pm 48$  jam. Aktivitas proteolitik ditentukan dengan menghitung ukuran diameter zona bening (cm) dan diameter koloni (cm) menggunakan rumus:

$$\text{Indeks Aktivitas Enzim (IAE)} = \frac{\text{Diameter zona bening (cm)}}{\text{Diameter koloni (cm)}}$$

### Pemurnian bakteri

Pemurnian bakteri dilakukan pada isolat bakteri yang memiliki nilai IAE tertinggi dengan metode *streak kuadran* pada media NA baru dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Isolat murni yang dihasilkan dikembangkan pada media NA miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebagai stok pengujian lebih lanjut (Azizah *et al.*, 2014).

### Identifikasi Bakteri

#### Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri

Pengujian dilakukan dengan pengamatan makroskopis dengan memperhatikan bentuk koloni, permukaan koloni, tepi koloni, dan warna koloni pada media NA.

#### Identifikasi Bakteri Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan dengan diambil satu ose isolat bakteri akuades diletakkan pada kaca objek, diratakan, kemudian dilakukan fiksasi dengan dipanaskan di atas lampu bunsen. Pewarnaan dilakukan menggunakan kristal violet, lugol iodine, alkohol dan safranin. Setiap tahapan pewarnaan diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit dan dibilas menggunakan akuades. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100x.

#### Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia

##### Uji *Simmons Citrat Agar* (SCA)

Satu ose isolat bakteri digores dan ditusukkan pada bagian tengah hingga dasar media SCA pada tabung reaksi. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari hijau menjadi warna biru.

##### Uji *Sulfit Indol Motility* (SIM)

Satu ose bakteri diinokulasi dengan ditusukkan jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media SIM dalam tabung reaksi. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati jejak pergerakan bakteri.

**Uji Kligler Iron Agar (KIA)**

Satu ose bakteri diinokulasikan dengan ditusukkan jarum ose secara tegak dan digoreskan pada bagian miring media KIA. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**Uji Lysine Iron Agar (LIA)**

Satu ose bakteri diinokulasikan dengan ditusukkan jarum ose secara tegak dan digoreskan pada bagian miring media LIA. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

**Uji Katalase**

Satu ose bakteri dioleskan pada gelas objek yang telah disterilkan dengan alkohol dan ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% 1-2 tetes. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas.

**Uji Koagulase**

Dimasukkan 200 uL plasma secara aseptis dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3 ose isolat bakteri ditambahkan dalam tabung reaksi. Tabung dimasukkan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif apabila terbentuk *clot* atau *jelly* pada tabung reaksi.

**Ekstraksi Enzim Fibrinolitik Bakteri**

Suspensi bakteri 4% dibuat dengan diambil 2 ose bakteri dari 4 bakteri yang mempunyai nilai IAE tertinggi, dimasukkan dalam labu Erlenmeyer yang berisi 25 mL media BHI, dan dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 75 rpm pada suhu 25°C selama 24 jam. Suspensi bakteri dimasukkan dalam 500 mL media BHI, dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 75 rpm pada suhu 25°C selama 24 jam. Pemanenan sel bakteri dilakukan sentrifugasi 5000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit.

**Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri**

Pemurnian ekstrak kasar fibrinolitik dilakukan dengan fraksinasi ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40% pada kondisi dingin. Setiap ekstrak kasar enzim dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer sebanyak 200 mL, diletakkan di atas *magnetic stirrer* dengan *magnetic bar* di dalamnya. Ammonium sulfat dimasukkan sedikit demi sedikit dalam setiap ekstrak kasar enzim dan dilakukan pengadukan secara konstan hingga larut sempurna ( $\pm 15$  menit), selanjutnya disentrifugasi selama 30 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 5000 rpm. Endapan yang dihasilkan merupakan fraksi fibrinolitik. Endapan tersebut ditimbang dan dilarutkan dengan buffer PBS dengan pH 7,4 dengan perbandingan volume pelet dan buffer yaitu 1:2.

**Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode *Clot lysis***

Pengujian aktivitas fibrinolitik metode *clot lysis* dilakukan dengan dimasukkan darah kelinci pada 5 tabung eppendorf steril dengan berat tiap tabung yaitu 200  $\mu$ L, diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C hingga terbentuk koagulasi, serum darah dibuang setelah terbentuknya koagulasi. Berat bekuan darah setiap tabung eppendorf ditimbang untuk menentukan berat bekuan darah. Setiap sampel enzim kasar yang diperoleh dengan konsentrasi 20, 40, dan 80% ditambahkan dalam 3 tabung eppendorf dengan berat masing-masing 100  $\mu$ L (HA *et al.*, 2023). Dua tabung eppendorf terakhir dimasukkan dengan kontrol positif nattokinase serta kontrol negatif akuades. Suspensi nattokinase dibuat dengan disiapkan 100 mg serbuk dari sediaan kapsul nattokinase, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan akuades hingga tanda batas.

Tabung eppendorf diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C untuk diamati fusi gumpalan (Michail *et al.*, 2006). Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Tabung eppendorf yang terdapat leburan bekuan darah ditimbang untuk ditentukan perbedaan berat lisis bekuan

darah. Persentase lisis bekuan dinyatakan sebagai perbedaan yang dihasilkan dengan penimbangan sebelum dan setelah terjadinya leburnya bekuan. Persentase lisis digunakan untuk menetapkan isolat bakteri yang mempunyai aktivitas enzim fibrinolitik tertinggi. Persentase lisis dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Persentase lisis (\%)} = \frac{\text{Berat lisis bekuan darah}}{\text{Berat bekuan darah sebelum lisis}} \times 100\%$$

### Identifikasi Molekuler

Tahap identifikasi molekuler dilakukan dengan ekstraksi DNA, amplifikasi DNA metode PCR, elektroforesis, sekuensing dua arah, dan analisis bioinformatika hasil sanger sekuensing yang dilakukan oleh ResearchHub Indonesia. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan *Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, USA)*. Hasil ekstraksi dikuantifikasi menggunakan Nanodrop serta digunakan sebagai template untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan metode PCR. Tahapan PCR dilakukan menggunakan *MyTaq HS Red Mix (Bioline, USA)* dengan volume 30  $\mu\text{L}$ . Sebanyak 1  $\mu\text{L}$  produk amplifikasi divisualisasi pada gel agarose 0,8% dalam *buffer* TBE pada kondisi 100 Volt selama 20 menit dengan DNA ladder 1 kb (dalam 2,5  $\mu\text{L}$ ). Agarose direndam dengan larutan Ethidium Bromide (EtBr) selama 15 menit tanpa disinari cahaya dan diamati di bawah sinar UV. Hasil amplifikasi DNA dilakukan Sekuensing dua arah menggunakan metode *Sanger DNA Sequencing by using Capillary Electrophoresis* serta dilakukan analisis Bioinformatika hasil Sanger Sequencing. Hasil urutan 16S rRNA dicocokkan dengan database NCBI GenBank menggunakan algoritma BLAST.

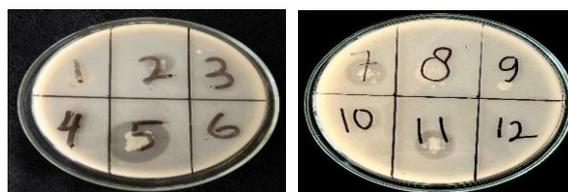
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengambilan Sampel dan Isolasi Bakteri

Sampel limbah cair diperoleh dari Rumah Potong Ayam yang berada di Klodran, Kecamatan Colomadu, Kabupaten Karanganyar. Pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 02 Oktober 2023. Sampel limbah cair RPA diambil menggunakan botol kaca steril pada kedalaman 10 cm sebanyak 100 mL. Sampel dimasukkan dalam *cooler box* untuk melindungi kerusakan sampel akibat panas selama perjalanan menuju laboratorium Universitas Setia Budi. Pengenceran sampel dilakukan secara bertingkat dari  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$ . Sebanyak 12 koloni bakteri yang tumbuh pada media NA dipisahkan berdasarkan perbedaan warna, ukuran dan bentuk koloni untuk dilakukan pengujian aktivitas proteolitik.

### Uji Aktivitas Proteolitik

Enzim proteolitik (protease) adalah enzim yang dapat menghidrolisis atau memecah molekul protein (Suhartono dan Artika, 2017). Pengujian aktivitas proteolitik bertujuan mengetahui aktivitas proteolitik dari isolat bakteri. Media yang digunakan adalah media *Skim Milk Agar (SMA)* karena kaya akan nutrisi yang sesuai untuk pertumbuhan mikroba. Zona bening menunjukkan isolat bakteri memanfaatkan protein dalam media SMA sebagai sumber nutrisi (Badriyah dan Ardyati, 2013). Perhitungan Indeks Aktivitas Enzim (IAE) merupakan perbandingan diameter zona bening yang berada di sekitar koloni dengan diameter koloni bakteri (Baehaki *et al.*, 2019). Hasil pengamatan dari 12 isolat bakteri diperoleh 4 isolat bakteri yang memiliki aktivitas proteolitik.



Gambar 1. Pengujian Aktivitas Proteolitik Isolat Bakteri Limbah Cair RPA

**Tabel 1. Nilai Indeks Aktivitas Enzim (IAE) Isolat Bakteri Limbah Cair RPA**

Isolat	Diameter Zona Bening (cm)	Diameter Koloni (cm)	IAE	Keterangan
RPA 1	-	-	-	-
RPA 2	1,31	0,605	2,17	+
RPA 3	-	-	-	-
RPA 4	-	-	-	-
RPA 5	2,61	0,805	3,24	+
RPA 6	-	-	-	-
RPA 7	1,61	0,51	3,16	+
RPA 8	-	-	-	-
RPA 9	-	-	-	-
RPA 10	-	-	-	-
RPA 11	1,605	0,81	1,98	+
RPA 12	-	-	-	-

Isolat bakteri yang menghasilkan enzim protease adalah isolat dengan kode RPA 2, RPA 5, RPA 7, dan RPA 11. Pengamatan secara visual keempat isolat bakteri yang menghasilkan aktivitas proteolitik memiliki perbedaan dari segi tepi, warna, dan bentuk yang diduga karena setiap isolat bakteri berbeda jenis sehingga aktivitas proteolitik yang dihasilkan terdapat perbedaan dari besarnya diameter zona bening. Semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar isolat bakteri, maka aktivitas proteolitik yang dihasilkan semakin besar (Fitria, 2021).

Isolat RPA 2 menunjukkan aktivitas proteolitik paling rendah dengan nilai IAE 2,17. Isolat RPA 5 menunjukkan aktivitas proteolitik paling tinggi dengan nilai IAE 3,24. Menurut penelitian Cahyaningrum *et al.*, (2021) bakteri hasil isolasi limbah cair tahu menghasilkan rata-rata nilai IAE antara 2,75 hingga 3,206. Indeks proteolitik kategori rendah apabila kurang dari 2,1, sedangkan kategori sedang berkisar 2,1 hingga 3,1, dan selebihnya dikategorikan tinggi (Ahmad *et al.*, 2013). Tingginya nilai IAE isolat RPA 5 kemungkinan disebabkan karena isolat tersebut mempunyai kemampuan cepat dalam mensintesis dan mendegradasi asam amino (Sumardi dan Lengkana, 2009). Isolat RPA 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12 tidak memiliki aktivitas proteolitik karena tidak terbentuk zona bening di sekitar koloni.

### Pemurnian Bakteri

Pemurniaan bakteri bertujuan mengaktivasi dan mengoptimalkan pertumbuhan koloni bakteri. Pemurnian bakteri dilakukan pada 4 isolat bakteri yang memiliki nilai IAE tertinggi dengan memindahkan biakkan mikroba lama ke media NA baru dengan metode *streak kuadran* (Machmud, 2001). *Streak kuadran* bertujuan memurnikan kembali koloni yang disimpan untuk mendapatkan isolat tunggal serta menghindari terjadinya kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan (Handayani dan Sulistiani, 2016). Isolat tunggal yang dihasilkan masing-masing bakteri ditumbuhkan pada media NA miring sebagai stok pengujian lebih lanjut.

### Identifikasi Bakteri

#### Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri

**Tabel 2. Identifikasi Morfologi Koloni Bakteri Limbah Cair RPA**

Isolat	Bentuk koloni	Permukaan koloni	Tepi koloni	Warna koloni
RPA 2	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih susu
RPA 5	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Entire</i>	Putih susu
RPA 7	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>	<i>Entire</i>	Kekuningan
RPA 11	<i>Circular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	Putih susu

Pengamatan morfologi koloni dilakukan secara makroskopis pada isolat bakteri pada media NA. Berdasarkan Tabel 2. menunjukkan bahwa hasil identifikasi morfologi koloni bakteri yang diisolasi dari limbah cair RPA ditemukan adanya perbedaan bentuk, permukaan, tepi, dan warna koloni. Isolat RPA 2 dan 5 memiliki morfologi *circular, flat, entire*, dan berwarna putih susu. Isolat RPA 7 memiliki morfologi *circular, convex, entire*, dan berwarna kekuningan. Isolat RPA 11 memiliki morfologi *circular, flat, undulate*, dan berwarna putih.

### Identifikasi Bakteri Pewarnaan Gram

Bertujuan melihat bentuk sel dan sifat bakteri terhadap zat pewarna yang diamati menggunakan mikroskop. Bakteri terbagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif apabila sel berwarna kebiruan atau keunguan dan bakteri Gram negatif apabila sel berwarna kemerahan. Bakteri Gram positif dan negatif terdapat antara perbedaan yang disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel serta komposisi dinding sel kedua kelompok bakteri tersebut (Prameswari, 2015). Bakteri Gram negatif tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet pada metode pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif dapat mempertahankan zat warna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol. Identifikasi bakteri pewarnaan Gram menunjukkan bahwa isolat bakteri RPA 2, 5, dan 11 mempunyai karakteristik Gram positif dengan bentuk batang, sedangkan isolat bakteri 7 merupakan bakteri Gram negatif bentuk batang.

### Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia

#### Uji *Simmons Citrat Agar* (SCA)

Uji *Simmons Citrat Agar* (SCA) dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon (Liempepas *et al.*, 2019). Bakteri yang dapat menggunakan sitrat, maka asam akan dihilangkan dari medium, sehingga mengakibatkan peningkatan pH dan perubahan warna media dari hijau menjadi biru (Kusumasari *et al.*, 2023). Berdasarkan uji SCA isolat bakteri yang menggunakan sitrat sebagai sumber karbon adalah bakteri isolat RPA 2 dan isolat RPA 5.

#### Uji *Sulfit Indol Motility* (SIM)

Uji *Sulfit Indol Motility* (SIM) Dilakukan untuk mengetahui pembentukan sulfida, indol, dan motilitas bakteri (Wulandari dan Purwaningsih, 2019). Hasil positif sulfida apabila terdapat warna hitam pada media. Prinsip reduksi sulfida adalah bakteri dapat mereduksi sulfur menjadi hydrogen sulfide yang kemudian akan bereaksi dengan zat besi menjadi endapan ferric sulfide berwarna hitam. Positif indol apabila terbentuk cincin merah setelah ditambahkan reagen kovac. Positif motilitas apabila pertumbuhan bakteri menyebar pada media atau terbentuk bercak menyebar pada garis ditusukkan pada media (Afrianti dan Muhammad, 2017). Berdasarkan hasil uji SIM menunjukkan bahwa dari keempat isolat bakteri limbah cair RPA hanya isolat bakteri RPA 7 menunjukkan hasil positif pada uji SIM. Isolat RPA 7 menunjukkan hasil positif pada sulfida dengan terbentuknya warna hitam pada media dan terbentuk cincin merah setelah penambahan reagen kovac.

#### Uji *Kligler Iron Agar* (KIA)

Uji *Kligler Iron Agar* (KIA) dilakukan untuk menguji fermentasi karbohidrat yaitu laktosa dan glukosa, serta sulfida (Kusumasari *et al.*, 2023). Kemampuan bakteri dalam mengubah glukosa dan laktosa serta menghasilkan hidrogen sulfida menjadi dasar untuk identifikasi pertumbuhan bakteri pada media KIA (Suyati, 2010). Semua isolat bakteri limbah cair RPA menghasilkan warna merah pada lereng media dan warna kuning pada dasar media, hal tersebut menunjukkan bahwa keempat isolat bakteri limbah cair RPA mampu mengubah glukosa dan laktosa, tetapi tidak dapat menghasilkan H<sub>2</sub>S sehingga tidak terbentuk warna hitam pada media.

**Uji Lysine Iron Agar (LIA)**

Uji *Lysine Iron Agar* (LIA) dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil enzim yang dapat mendeaminasi atau mendekarboksilasi lisin serta memproduksi gas H<sub>2</sub>S (Chainulfiffah, 2012). Deaminasi lisin merupakan proses aerobik yang terjadi pada media yang miring. Dekarboksilasi lisin merupakan proses anaerobik yang terjadi di bagian dasar media. Isolat yang memiliki enzim dekarboksilasi dapat menguraikan lisin sehingga media tetap berwarna ungu. Isolat yang tidak mempunyai enzim dekarboksilasi atau dapat mendeaminasi lisin pada kondisi asam media menjadi warna kuning (Brooks *et al.*, 2013). Berdasarkan hasil uji LIA menunjukkan bahwa semua isolat bakteri limbah cair RPA terbentuk warna kuning pada dasar media sehingga dilambangkan A, hal tersebut menunjukkan bahwa semua isolat bakteri limbah cair RPA tidak dapat memecah lisin serta tidak mampu memproduksi sulfida karena tidak terdapat warna hitam pada media.

**Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui karakteristik bakteri dalam menghasilkan enzim katalase (Effendi, 2020). Terbentuknya buih atau gelembung udara menandakan bahwa sel bakteri memproduksi enzim katalase. Isolat 7 menunjukkan hasil positif uji katalase karena adanya enzim katalase pada bakteri yang mampu mengubah H<sub>2</sub>O menjadi oksigen.

**Uji Koagulase**

Uji koagulase dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim koagulase (Dewi, 2013). Koagulase adalah suatu protein mirip enzim yang mampu menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor pada serum. Faktor reaksi koagulase serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan mengaktifkan protrombin menjadi trombin (Jawetz *et al.*, 2001). Hasil uji koagulase menunjukkan hanya isolat RPA 7 yang menunjukkan hasil positif.

**Tabel 3. Hasil Uji Biokimia Isolat Bakteri Limbah Cair RPA**

Pengujian	RPA 2	RPA 5	RPA 7	RPA 11
SCA	+	+	-	-
SIM	---	---	++-	---
KIA	K/A S-	K/A S-	K/A S-	K/A S-
LIA	K/A S-	K/A S-	K/A S-	K/A S-
Katalase	-	-	+	-
Koagulase	-	-	+	-
Dugaan	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Morganella</i>	<i>Listeria</i>
Pustaka	Manurung, 2017	Manurung, 2017	Aida dan Manalu, 2023	Barrow dan Feltham, 1993

Hasil pengujian identifikasi bakteri diduga isolat RPA 2 dan 5 diduga merupakan bakteri genus *Corynebacterium* karena memiliki morfologi *circular, flat, entire*, berwarna putih susu, bakteri Gram positif bentuk batang, menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, tidak terdapat warna hitam pada media, tidak terbentuk cincin merah setelah ditambahkan reagen kovac, tidak terbentuk bercak menyebar pada garis ditusukkan pada media, mampu mengubah glukosa dan laktosa tetapi tidak dapat menghasilkan H<sub>2</sub>S sehingga tidak terbentuk warna hitam, tidak dapat memecah lisin serta tidak mampu memproduksi sulfida karena tidak terdapat warna hitam pada media, tidak terbentuk buih pada uji katalase, dan tidak terbentuk *clot* pada uji koagulase (Manurung, 2017).

Isolat RPA 7 diduga merupakan bakteri genus *Morganella* karena memiliki morfologi *circular, convex, entire*, berwarna kekuningan, bakteri Gram negatif bentuk batang, tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, terdapat warna hitam pada media, terbentuk cincin merah setelah ditambahkan reagen kovac, tidak terbentuk bercak menyebar pada garis ditusukkan pada media, mampu mengubah glukosa dan laktosa tetapi tidak dapat menghasilkan

H<sub>2</sub>S sehingga tidak terbentuk warna hitam, tidak dapat memecah lisin serta tidak mampu memproduksi sulfida karena tidak terdapat warna hitam pada media, terbentuk buih pada uji katalase, dan terbentuk *clot* pada uji koagulase (Aida dan Manalu, 2023).

Isolat RPA 11 diduga merupakan bakteri genus *Listeria* karena memiliki morfologi *circular, flat, undulate*, berwarna putih, bakteri Gram positif bentuk batang, tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon, tidak terdapat warna hitam pada media, tidak terbentuk cincin merah setelah ditambahkan reagen kovac, tidak terbentuk bercak menyebar pada garis ditusukkan pada media, mampu mengubah glukosa dan laktosa tetapi tidak dapat menghasilkan H<sub>2</sub>S sehingga tidak terbentuk warna hitam, tidak dapat memecah lisin serta tidak mampu memproduksi sulfida karena tidak terdapat warna hitam pada media, tidak terbentuk buih pada uji katalase, dan tidak terbentuk *clot* pada uji koagulase (Barrow dan Feltham, 1993).

### Ekstraksi Enzim Fibrinolitik Bakteri

Ekstraksi enzim bertujuan mengeluarkan ekstrak enzim dari sel dan jaringan atau untuk memperoleh ekstrak kasar dari hasil sentrifugasi (Nadea *et al.*, 2023). Ekstrak yang dihasilkan dilakukan pendinginan untuk mencegah rusaknya enzim yang terkandung ekstrak. Proses pendinginan bertujuan mengendapkan residu pada ekstrak yang selanjutnya dipisahkan dengan sentrifugasi (Warninghiyun *et al.*, 2023). Proses sentrifugasi bertujuan memisahkan supernatan dari senyawa pengotor bukan enzim yang tertinggal di dalamnya (Sebayang *et al.*, 2020).

**Tabel 4. Hasil Ekstraksi Enzim Fibrinolitik Isolat Bakteri Limbah Cair RPA**

Isolat	Pelet Ekstraksi	Supernatan Ekstraksi
RPA 2	15,3 gram	440 mL
RPA 5	16 gram	470 mL
RPA 7	5,1 gram	440 mL
RPA 12	7,3 gram	440 mL

Hasil dari proses sentrifugasi merupakan pelet dan supernatan ekstrak. Pelet berada di bagian bawah tabung karena berat jenis yang lebih besar dibandingkan berat jenis enzim. Pelet dan supernatan ekstrak hasil sentrifugasi dapat disimpan dalam lemari untuk mencegah kerusakan enzim atau terjadinya denaturasi (Nadea *et al.*, 2023). Supernatan hasil proses sentrifugasi pertama merupakan ekstrak kasar (*crude enzym*) yang digunakan sebagai sampel pengujian aktivitas fibrinolitik setelah proses pemurnian enzim.

### Pemurnian Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri

Pemurnian bertujuan mendapatkan enzim dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi. Proses pemurnian ekstrak kasar enzim dari limbah cair RPA dilakukan dengan menambahkan garam ammonium sulfat konsentrasi 40%.

**Tabel 5. Hasil Pemurnian Ekstrak Enzim Isolat Bakteri Limbah Cair RPA**

Isolat	Pelet Ekstraksi	Supernatan Ekstraksi
RPA 2	3,9 gram	247 mL
RPA 5	5,4 gram	249 mL
RPA 7	3,9 gram	246 mL
RPA 11	4 gram	225 mL

Penambahan ammonium sulfat dapat meningkatkan aktivitas enzim dengan mengendapkan protein dan mengurangi pengotor. Konsentrasi ammonium sulfat yang digunakan untuk pemurnian enzim dapat bervariasi karena besarnya konsentrasi ammonium sulfat dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim yang dihasilkan (Nadea *et al.*, 2023).

Pemurnian enzim fibrinolitik menggunakan ammonium sulfat yang memiliki konsentrasi pada antara 25-80% (Palanivel *et al.*, 2013). Menurut penelitian Vijayaraghavan dan Vincent (2014) ammonium sulfat dengan kejenuhan 30%-70% optimum untuk prepitasi enzim fibrinolitik.

### Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode *Clot lysis*

Pengujian aktivitas ekstrak kasar enzim fibrinolitik bakteri limbah cair RPA menggunakan metode *clot lysis*. *Clot lysis* merupakan suatu parameter untuk mengetahui kemampuan fibrinolisis berdasarkan banyak sedikitnya retraksi bekuan darah selama masa inkubasi (Rohmah, 2019). Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan lisisnya bekuan darah pada tabung eppendorf dan dilakukan perhitungan persentase lisis. Persentase lisis dinyatakan sebagai selisih hasil penimbangan sebelum dan setelah terjadinya leburnya bekuan (Nadea *et al.*, 2023).

Nattokinase digunakan sebagai kontrol positif karena nattokinase adalah suatu enzim fibrinolitik yang berasal dari kedelai yang difermentasi dengan bakteri *Bacillus subtilis*. Akuades digunakan sebagai kontrol negatif karena akuades tidak memiliki aktivitas untuk melisis gumpalan darah (Zaman *et al.*, 2015).

**Tabel 6. Hasil Pengujian *Clot Lysis* Isolat Bakteri Limbah Cair RPA**

Isolat RPA 2	Persentase Lisis Gumpalan Darah (%)			Rata-rata (%) ± SD
	1	2	3	
20%	3,13	2,18	4,26	3,19 ± 1,04
40%	25,51	15,57	16,07	19,05 ± 5,60
80%	48	43,80	37,44	43,08 ± 5,32
Kontrol -	3,26	2,13	2,90	2,76 ± 0,58
Kontrol +	74,38	75	79,65	76,49 ± 2,88

Isolat RPA 5	Persentase Lisis Gumpalan Darah (%)			Rata-rata (%) ± SD
	1	2	3	
20%	3,66	3,21	3,99	3,62 ± 0,39
40%	16,39	29,64	28,57	24,87 ± 7,36
80%	46,28	45,42	51,22	47,64 ± 3,13
Kontrol -	1,72	2,08	2,54	2,11 ± 0,41
Kontrol +	81,31	76,67	84,35	80,78 ± 3,87

Isolat RPA 7	Persentase Lisis Gumpalan Darah (%)			Rata-rata (%) ± SD
	1	2	3	
20%	6,06	6,67	6,52	6,42 ± 0,32
40%	29,17	29,73	32,8	30,57 ± 1,95
80%	54,43	53,98	56,98	55,13 ± 1,62
Kontrol -	2,27	2,04	3,19	2,5 ± 0,61
Kontrol +	80,33	74,36	73,21	75,97 ± 3,82

Isolat RPA 11	Persentase Lisis Gumpalan Darah (%)			Rata-rata (%) ± SD
	1	2	3	
20%	1,56	1,15	4,17	2,29 ± 1,63
40%	13,08	12,99	11,11	12,39 ± 1,11
80%	34,57	31,18	29,63	31,79 ± 2,53
Kontrol -	1,96	2,78	1,25	2 ± 0,77
Kontrol +	72,22	76,32	87,46	78,6 ± 7,89

Tabel 6 menunjukkan bahwa aktivitas fibrinolitik dengan persentase lisis tertinggi yaitu kontrol positif yang berupa nattokinase dengan rata-rata persentase lisis setiap pengujian yaitu 75-80%, hal sesuai dengan penelitian yang dilakukan Weng *et al.*, (2017) yang menyatakan bahwa nattokinase mempunyai kemampuan kuat untuk memecah trombi dan fibrin. Sumber utama nattokinase yang murni berasal dari produk fermentasi kedelai. Sedangkan pada kontrol

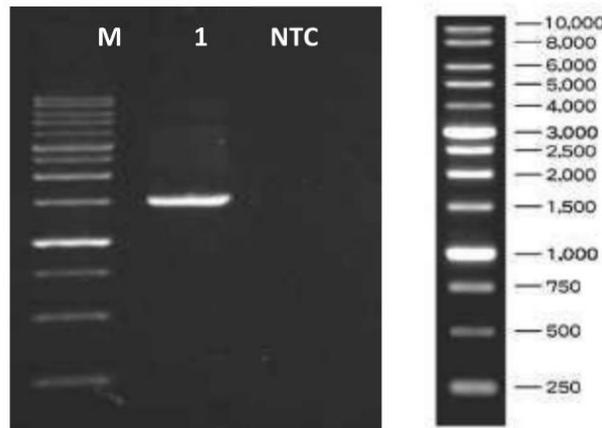
negatif menunjukkan persentase lisis paling rendah dengan rata-rata setiap pengujian yaitu 2%, hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan Zaman *et al.*, (2015) yang menyatakan bahwa akuades tidak memiliki aktivitas untuk melisis gumpalan darah. Namun dalam penelitian ini akuades mampu menghasilkan nilai persentase lisis kemungkinan hal tersebut disebabkan pada saat sampel ditambahkan dalam tabung eppendorf bekuan darah bagian atas ikut terlarut, sehingga mengurangi gumpalan darah dan mengakibatkan terjadinya lisis.

Variasi konsentrasi ekstrak kasar enzim tiap isolat bakteri dengan konsentrasi 20, 40, dan 80% memiliki nilai persentase lisis yang berbeda-beda. Berdasarkan Tabel 6. dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi, maka semakin tinggi pula aktivitas fibrinolitik yang dihasilkan. Perbandingan rata-rata nilai persentase lisis tiap isolat bakteri dengan variasi konsentrasi menunjukkan bahwa isolat RPA 11 menghasilkan persentase lisis terendah dengan rata-rata nilai persentase lisis 2,29% pada konsentrasi 20%; 12,39% pada konsentrasi 40%; dan 31,79% pada konsentrasi 80%. Isolat RPA 7 menghasilkan persentase lisis terbesar dengan rata-rata nilai persentase lisis 6,42% pada konsentrasi 20%; 30,57% pada konsentrasi 40%; dan 55,13% pada konsentrasi 80%. Berdasarkan Tabel 1. isolat RPA 5 yang memiliki nilai IAE tertinggi yaitu sebesar 3,24 ternyata memiliki rata-rata nilai persentase lisis yang lebih rendah daripada isolat RPA 7, hal tersebut dapat terjadi karena enzim protease memiliki spesifitas aktivitas proteolitik yang berbeda untuk berbagai substrat. Substrat kasein pada media SMA adalah protein umum yang dapat dipecah oleh bakteri sehingga bakteri yang dapat memecah kasein belum tentu mampu memecah protein fibrin secara spesifik.

Data yang dihasilkan dari uji aktivitas fibrinolitik metode *clot lysis* dilakukan analisis data menggunakan software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) metode *Shapiro-wilk* untuk melihat apakah data sudah terdistribusi normal. Pengujian ini dihasilkan nilai signifikansi tiap isolat bakteri RPA  $> 0,05$  yang berarti data telah terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan analisis homogenitas dan dihasilkan nilai signifikansi tiap isolat bakteri RPA  $> 0,05$ , hal tersebut berarti data terdistribusi normal dan homogen. Data yang terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan analisa data dengan metode *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan bermakna pada variasi konsentrasi ekstrak kasar enzim bakteri limbah cair RPA. Hasil analisis *One Way ANOVA* didapatkan adalah nilai signifikansi pada semua isolat bakteri RPA sebesar 0,00 ( $< 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan bermakna dari variasi konsentrasi ekstrak enzim limbah cair RPA pada tiap isolat bakteri terhadap persentase lisis yang dihasilkan. Pengujian dilanjutkan dengan *Post Hoc Tuckey* dilakukan untuk mengetahui kelompok yang memberikan perbedaan bermakna. Hasil analisis *Post Hoc Tuckey* menunjukkan bahwa setiap sampel isolat bakteri limbah cair RPA terdapat perbedaan bermakna antara variasi konsentrasi 20%, 40% dan 80%, namun pada konsentrasi 20% tiap isolat bakteri limbah cair RPA tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan kontrol negatif. Isolat RPA 7 dengan konsentrasi 80% ditetapkan sebagai konsentrasi optimum karena memiliki efek fibrinolitik paling besar.

### Identifikasi Molekuler

Prinsip utama pada isolasi DNA adalah penghancuran membran sel, pemisahan DNA, dan presipitasi DNA (Walker dan Rapley, 2008). Pengukuran konsentrasi DNA dihasilkan nilai konsentrasi 148,5 ng/ $\mu$ L. Hasil pengukuran kemurnian DNA pada nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  adalah 1,88. Standar kemurnian DNA rasio  $A_{260/280}$  yang baik antara 1,8-2,0 (Widayat *et al.*, 2019). Nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  adalah 0,50. Visualisasi hasil amplikasi ditunjukkan pada Gambar 2.



Keterangan : NTC = Kontrol negatif amplikasi  
Gambar 2. Gambar Elektroforesis Produk Amplifikasi

Nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  berguna sebagai indikator untuk mendeteksi kontaminan organik atau senyawa organik lain. Standar nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  yang baik antara 2,0-2,2 (Widayat *et al.*, 2019). Berdasarkan hasil pengukuran nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  sampel RPA 7 berada di bawah standar nilai absorbansi yang baik, hal tersebut dapat terjadi karena terbawanya senyawa organik lain pada saat dilakukan ekstraksi. Menurut Widayat *et al.*, (2019) pada beberapa kasus nilai absorbansi rasio  $A_{260/230}$  yang berada di bawah standar tidak mempengaruhi analisis PCR sehingga sampel dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

**Sequence Assembly 1392bp**

```

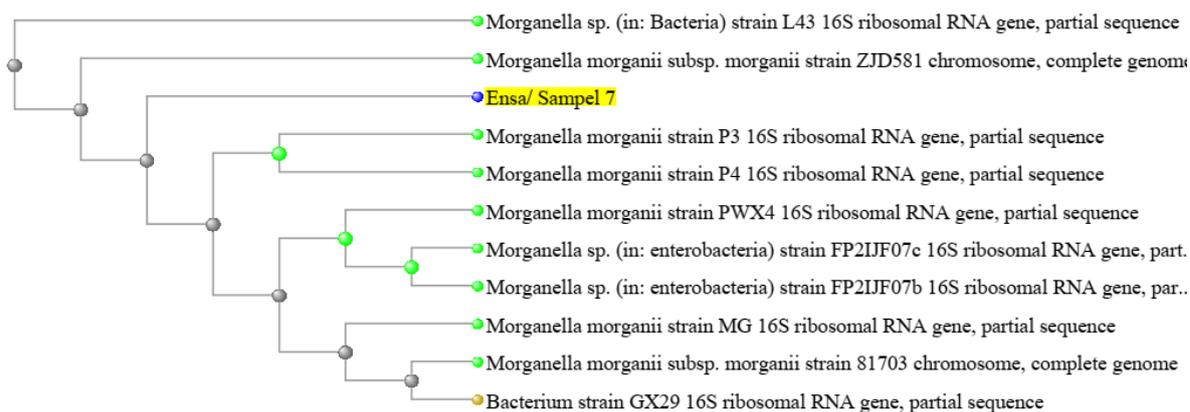
1      TAAGCTACCT ACTTCTTTG CAACCCACTC CCATGGTGTG GACGGGCGGT GTGTACAAGG
61     CCGGGAACG TATTCACCGT AGCATTCTGA TCTACGATTA CTAGCGATTC CGACTTCATG
121    GAGTCGAGTT GCAGACTCCA ATCCGGACTA CGACGTACTT TATGAGTTCC GCTTGCCCTC
181    GCGGGGTCGC TTCCTTTGTT ATACGCCATT GTAGCACGTG TGTAGCCCTA CTCGTAAGGG
241    CCATGATGAC TTGACGTCAT CCCCACCTTC CTCCGGTTTA TCACCCGCAG TCTCCTTTGA
301    GTTCCCGACA TTAICTCGCTG GCAACAAAGG ATAAGGGTTG CGTCTGTTGC GGGACTTAAC
361    CCAACATTTT ACAACACGAG CTGACGACAG CCATGCAGCA CCTGTCTCAG AGTTCGCCAA
421    GGCACCAAAG CATCTCTGCT AAGTTCTCTG GATGTCAAGA GTAGTAAGG TTCTTCGCGT
481    TGCATCGAAT TAAACCCACA TGCTCCACCG CTTGTGCGGG CCCCCTCAA TTCATTTGAG
541    TTTTAACTT GCGGCCGTAC TCCCAGGCGG GTCGACTTAA CGCGTTAGCT CCGGAAGCCA
601    CGCCTCAAGG GCACAACCTC CAAGTCGACA TCGTTTACAG CGTGGACTAC CAGGGTATCT
661    AATCCTGTTT GCTCCCCACG CTTTTCGCACC TGAGCGTCAG TCCTTTGTCCA GGGGGGCCGC
721    CTTCCGCCACC GGTATTCTCT CACATCTCTA CGCATTTTAC CGCTACACAT GGAATTTTAC
781    CCCCCTCTAC AAGACTCTAG CTGACCAGTA TCAGATGCAA TTCCCCTGGT AAGCCCGGGG
841    ATTTACATC TGACTCAATC AACCCCTGCG GTGCGCTTTA CGCCCAGTAA TTCCGATTA
901    CGCTTGCAAC CTCCTGATTA CCGCGGCTGC TGGCACGGAG TTAGCCGGTG CTTCTTCTGT
961    CGGTAACGTC AATTGATAAG GTTATTAACC TTACCACCTT CCTCCCGACT GAAAGTACTT
    
```

Gambar 3. Hasil Sequence Assembly Produk Amplifikasi

Identifikasi molekuler isolat RPA 7 dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rRNA. Sekuensing dilakukab dua arah menggunakan metode *Sanger DNA Sequencing by using Capillary Electrophoresis*. Proses sekuensing DNA sampel RPA 7 pada daerah 16S rRNA dihasilkan ukuran 1392 bp yang ditunjukkan pada Gambar 3.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii subsp. morganii strain ZJD581 chromosome complete genome</a>	2549	17682	99%	0.0	99.78%	<a href="#">CP064826.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii strain P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2545	2545	100%	0.0	99.71%	<a href="#">KJ626253.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii strain P4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2545	2545	100%	0.0	99.71%	<a href="#">KJ626252.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii subsp. morganii strain 81703 chromosome complete genome</a>	2543	17645	99%	0.0	99.71%	<a href="#">CP064830.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella sp. (in: enterobacteria) strain FP2IJF07c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2540	2540	100%	0.0	99.64%	<a href="#">OR373644.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii strain MG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2538	2538	99%	0.0	99.64%	<a href="#">MG050048.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella sp. (in: enterobacteria) strain FP2IJF07b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2538	2538	99%	0.0	99.64%	<a href="#">OR373643.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella sp. (in: Bacteria) strain L43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2534	2534	100%	0.0	99.57%	<a href="#">MT505125.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Morganella morganii strain PWX4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2534	2534	100%	0.0	99.57%	<a href="#">KJ942484.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium strain GX29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2534	2534	100%	0.0	99.57%	<a href="#">ON386994.1</a>

Gambar 4. Hasil Top Hit BLAST terhadap NCBI



Gambar 5. Pohon filogenetik by NCBI BLAST Tree Method

Hasil sekuensing dicocokkan dengan bakteri pada database NCBI GenBank menggunakan algoritma BLAST. Identifikasi menggunakan marka 16S rRNA, maka dikatakan identikal (*similar*) pada level spesies apabila nilai *percentage identity* di atas 97,5% dan pada level genus apabila nilai *percentage identity* di atas 95% (Stackebrandt dan Goebel, 1994). Hasil BLAST yang ditunjukkan Gambar 4. dan pohon filogenetik pada Gambar 5. menunjukkan bahwa urutan nukleotida 16S rRNA dari isolat RPA 7 yang berasal dari limbah cair RPA memiliki kemiripan yang tinggi dengan *Morganella morganii* strain ZJD581 (99,78%) dan *Morganella morganii* strain P3 (99,71%).

## KESIMPULAN

Pertama, isolat bakteri RPA 2, RPA 5, RPA 7, RPA 11 yang diisolasi dari limbah cair RPA berpotensi sebagai agen fibrinolitik. Kedua, rata-rata persentase lisis optimum ekstrak kasar enzim isolat bakteri RPA 7 konsentrasi 20% yaitu 6,42%; konsentrasi 40% yaitu 30,57%; dan 80% yaitu 55,13%. Ketiga, isolat bakteri RPA 7 yang menghasilkan aktivitas fibrinolitik tertinggi merupakan bakteri *Morganella morganii*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor, Wakil Rektor, Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta serta ResearchHub Indonesia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti Rahayu, S., dan Muhammad Hidayat Gumilar, M. 2017. Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 4(2): 50.
- Ahmad, B., Nigar, S., Shah, S.S.A., Bashir, S., Ali, J., Yousaf, S., dan Bangash, J.A. 2013. Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from municipal Waste and Their Screening For Potential Antimicrobial Activity. *World Applied Scinces Journal*. 27(11): 1420-1426.
- Aida, H., dan Manalu, K. 2023. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Limbah Cair Minyak Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq). *BIOEDUSAINS: Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*, 6(1): 47-57.
- Akhdiya, A. 2003. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease Alkalin Termotabil. *Indonesian Ministry of Agriculture*.

- Al Kholif, M. 2015. Pengaruh Penggunaan Media Dalam Menurunkan Kandungan Amonia Pada Limbah Cair Rumah Potong Ayam (RPA) dengan Sistem Biofilter Anaerob. *WAKTU: Jurnal Teknik UNIPA*, 13(1): 13-18.
- Ayun, N. Q. 2019. Analisis Mikroplastik Menggunakan FT-IR pada Air, Sedimen, dan Ikan Belanak (Mugil cephalus) di Segmen Sungai Bengawan Solo yang Melintasi Kabupaten Gresik. *Disertasi*. UIN Sunan Ampel Surabaya.
- Azizah, S. N., Muzakhar, K., dan Arimurti, S. 2014. Skrining Bakteri Selulolitik asal Vermicomposting Tandan Kosong Kelapa Sawit. *Berkala Sainstek*, 2(1): 26-30.
- Badan Standardisasi Nasional. 1999. *Standar Nasional Indonesia (SNI). 01-61601999, tentang Rumah Pemotongan Unggas*. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta.
- Badan Pusat Statistik. 2022 *Laporan Produksi Daging Ayam Ras Pedaging menurut Provinsi (Ton) Tahun 2020-2022*. BPS Jawa Tengah.
- Badriyah, B.I. dan T. Ardyati. 2013. Deteksi aktivitas proteolitik isolat bakteri asal ampas tahu pada substrat bekatul. *Jurnal Biotropika*, 1(3): 109-113.
- Baehaki, A., Nopianti, R., Saputra, E., dan Gofar, N. 2019. Eksplorasi Bakteri Penghasil Enzim Protease pada Air Rawa Tanjung Senai Indralaya Sumatera Selatan. *In Seminar Nasional Lahan Suboptimal*: 121-131.
- Baruah, D. B., Dash, R. N., Chaudhari, M. R., dan Kadam, S. S. 2006. Plasminogen Activators: a Comparison. *Vascular pharmacology*, 44(1): 1-9.
- Barrow, GI, dan Feltham, RKA, 1993, *Cowan And Steel's Manual For The Identification Of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, United Kingdom.
- Bode, C., Runge, M. S., dan Smalling, R. W. 1996. The Future of Thrombolysis in the Treatment of Acute Myocardial Infarction. *European heart journal*, 17:55-60.
- Brooks G, F., Carroll K, C., Butel J, S., Morse S, A., dan Mietzner T, A. 2013. *Mikrobiologi kedokteran Edisi 25*. EGC, Jakarta.
- Cahyaningrum, E., Wijanarka, W., dan Lunggani, A. T. 2021. Isolasi dan Pengaruh Monosodium Glutamat terhadap Pertumbuhan Bakteri Proteolitik Limbah Cair Tahu. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 23(2): 8490.
- Chainulfiffah, Y. 2012. Fermentasi Karbohidrat Oleh Isolat Salmonella SPP. Dari Jajanan Pinggir Jalan. *Jurnal ICA (Indonesian Chemia Acta)*, 3(01).
- Dewi, A. K. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas Staphylococcus aureus terhadap amoxicillin dari sampel susu kambing peranakan ettawa (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*, 31(2): 138-150.
- Effendi, I. 2020. *Metode Identifikasi dan Klasifikasi Bakteri*. Pekanbaru: Oceanum Press. 142.
- Fitria, L. 2021. Isolasi bakteri selulolitik dari bekatul dan uji aktivitas enzim selulase dengan variasi suhu inkubasi. *Disertasi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- HA, R. B., Indrayati, A., dan Purwaningsih, D. 2022. Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri Bacillus cereus yang Diisolasi dari Air Hutan Mangrove Maroon Edupark Semarang secara In Vitro. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 19(1): 110-123.
- Handayani, R., dan Sulistiani, S. N. 2016. Identifikasi produksi GABA dari kultur Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan metode TLC. *In Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 2 (2): 208-213.
- Herliani, H. 2015. Identifikasi Mikroba pada Karkas Ayam Potong Berasal dari RPA Tradisional di Kota Pelahari. *Jurnal Penelitian Peternakan Lahan Basah*, 2(1): 27-32.
- Jawetz, E., Melnick, J, L., dan Adelberg E, A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta (ID): Salemba Medika. Edisi Pertama. pp. 317-326.
- Jeong, Y. K., Park, J. U., Baek, H., Park, S. H., Kong, I. S., Kim, D. W., dan Joo, W. H. 2001. Purification and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Bacillus subtilis BK-17. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 89-92.

- Kartikasari, A. M., Hamid, I. S., Purnama, M. T., Damayanti, R., Fikri, F., dan Praja, R. N. 2019. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli* Kontaminan Pada Daging Ayam Broiler di Rumah Potong Ayam Kabupaten Lamongan. *Jurnal Medik Veteriner*, 2(1): 66.
- Kim, S. H., dan Choi, N. S. 2000. Purification and Characterization of Subtilisin DJ-4 Secreted by *Bacillus* sp. Strain DJ-4 Screened from Doen-Jang. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(8): 1722-1725.
- Kotb, E. 2012. *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kusumasari, W., Indrayati, A., dan Cahyo, L. M. (2023). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Protease Ekstraseluler Dari Limbah Cair Industri Tahu. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 6(1): 134-143.
- Liempepas, A., Lolo, W. A., dan Yamlean, P. V. 2019. Isolasi dan uji antibakteri dari isolat bakteri yang berasosiasi dengan spons *Callyspongia aerizusa* Serta Identifikasi Secara Biokimia. *Pharmacon*, 8(2): 380-387.
- Machmud D. 2001. Teknik penyimpanan dan pemeliharaan mikroba. *Buletin AgroBio*, 4(1): 24-32.
- Manurung, U. N. 2017. Identifikasi bakteri patogen pada ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) di lokasi budidaya ikan air tawar Kabupaten Kepulauan Sangihe. *In Prosiding Seminar Nasional Kemaritiman dan Sumber Daya Pulau-Pulau Kecil*, 2(1).
- Meyrath, J., dan Volavsek, G. 1975. Production of Microbial Enzymes. *Enzymes in food processing*, 2.
- Michail, M., Vasiliadou, M., dan Zotos, A. 2006. Partial Purification and Comparison of Precipitation Techniques of Proteolytic Enzymes From Trout (*Salmo gairdnerii*) Heads. *Food chemistry*, 97(1): 50-55.
- Mine, Y., Wong, A. H. K., dan Jiang, B. 2005. Fibrinolytic Enzymes in Asian Traditional Fermented Foods. *Food Research International*, 38(3): 243250.
- Nadea, N. S. W. P., Indrayati, A., dan Leviana, F. 2023. Potensi Ekstrak Kasar Enzim dari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine soja* (L.) Merr.) sebagai Obat Fibrinolitik Alami dengan Metode Clot Lysis In Vitro: Potential of Crude Enzymes from Black Soybean Tempeh (*Glycine soja* (L.) Merr.) as a Natural Fibrinolytic Medicine with Clot Lysis In Vitro Method. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 5(2): 115-125.
- Palanivel, P., L. ashaokkumar, dan R. Balagurunathan. 2013. Production, Purification and Fibrinolytic Characterization of Alkaline Protease from Extremophilic Soil Fungi. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): 101-110.
- Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R. H., dan Zhang, Y. Z. 2003. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* DC-4 Screened from Douchi, a Traditional Chinese Soybean Food. *Comparative biochemistry and physiology part b: biochemistry and molecular biology*, 134(1): 45-52.
- Peng, Y., Yang, X., dan Zhang, Y. 2005. Microbial Fibrinolytic Enzymes: an Overview of Source, Production, Properties, and Thrombolytic Activity In Vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 126-132.
- Prameswari, D.A. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat dari Tanah Gambut Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu Bengkalis Riau. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Riau.
- Rohmah, M. K. 2019. Uji aktivitas fibrinolisis ekstrak alkaloid total rimpang lengkuas merah (*Alpinia Purpurata* (Vielli) K. Schum) secara in vitro. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 1(2): 1-14.
- Safitri, R., Muchlissin, S. I., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., dan Ethica, S. N. 2018. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Protease *Bacillus Thuringiensis* Irodi Pada Oncom Merah Pasca Fermentasi 24 Jam. *In Prosiding Seminar Nasional & Internasional*, 1(1).

- Sebayang, R., Idawati, Y., dan Sinaga, H. 2020. Analisis Lactat Dehydrogenase dalam Serum Darah Menggunakan Sentrifugasi. *Jurnal Keperawatan Silampari*, 4: 274–80.
- Setyaingtyas, T., Riyani, K., Dwiasi, D. W., dan Rahayu, E. B. 2018. Degradasi Fenol Pada Limbah Cair Batik Menggunakan Reagen Fenton Dengan Sinar UV. *Jurnal Kimia VALENSI Volume*, 4(1).
- Singgih, M. L. 2008. Peningkatan Produktivitas Dan Kinerja Lingkungan Dengan Pendekatan Green Productivity Pada Rumah Pematangan Ayam. *Jurnal Purifikasi*, 9(2): 137-146.
- Stackebrandt, E., dan Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4): 846-849.
- Suhartono, M. T. 1992. Protease. Bogor. *IPB PAU Bioteknologi*.
- Suhartono, S., dan Artika, W. 2017. Isolasi dan uji aktivitas protease dari aktinobakteri isolat lokal (AKJ-09) Aceh. *Jurnal Bioleuser*, 1(3).
- Sumardi dan Lengkana, D. 2009. Isolasi Bacillus Penghasil Protease dari Saluran Pencernaan Ayam Kampung. *Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*. Universitas Lampung.
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., dan Hiratani, H. 1990. Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of Nattokinases. *Acta haematologica*, 84(3): 139-143.
- Suyati. 2010. Identifikasi Dan Uji Antibiotik Bakteri Gram-Negatif Pada Sampel Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (Isk). *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Papua Manokwari.
- Syarifuddin, A., Yuliasuti, F., dan Pradani, M. P. K. 2020. Potensi Cemaran Bakteri Escherichia coli pada Limbah Cair Rumah Potong Ayam (RPA) Terhadap Lingkungan di Kota Magelang. *Jurnal Kesehatan*, 13(1): 46-53.
- Tarntip, R., dan Sirichom, T. 2011. Isolation of Proteolytic, Lipolytic, and Bioemulsifying Bacteria for Improvement of the Aerobic Treatment of Poultry Processing Wastewater. *African Journal of Microbiology Research*, 5(30): 5493-5497.
- Vijayaraghavan, P., dan Vincent, S.G.P. 2014. Statistical optimization of fibrinolytic enzyme production by Pseudoalteromonas sp. IND11 using cow dung substrate by response surface methodology. *Springerplus*. 3: 60
- Warninghiyun, H., Indrayati, A., dan Pudiastuti, R. S. P. 2023. Potensi Ekstrak Enzim Daun Pepaya (Carica papaya L.) Sebagai Agen Fibrinolitik Dengan Metode Clot Lysis in Vitro. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 5(2).
- Walker, M., dan Rapley, R. 2008. *Molecular Biomethods Handbook*, 2nd edn. NJ, USA: Humana Press.
- Widayat, W., Agustini, T. W., Suzery, M., Al-Baarri, A. N. M., Putri, S. R., dan Kurdianto, K. 2019. Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sebagai Alat Deteksi DNA Babi dalam Beberapa Produk Non-Pangan. *Indonesia Journal of Halal*, 2(1): 26-33.
- Wulandari, D., dan Purwaningsih, D. 2019. Identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi Colocasia esculenta L. secara morfologi, biokimia, dan molekuler. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 6(2): 247-258.
- Yang, J. L., Kim, H. S., Hong, J. H., dan Song, Y. S. 2006. Purification and Characteristics of Fibrinolytic Enzyme From Chongkukjang. *Preventive Nutrition and Food Science*, 11(2): 127-132.
- Zaman, R., Parvez, M., Jakaria, M., Sayeed, M. A., dan Islam, M. 2015. In Vitro Clot Lysis Activity of Different Extracts of Mangifera sylvaticaroxb. Leaves. *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(3): 135-140.