

UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK ETIL ASETAT BAKTERI YANG BERASAL DARI LIMBAH CAIR RUMAH POTONG AYAM (RPA) DI KARANGANYAR

Duanty Indi Ardina^{1*}, Ana Indrayati², Ganet Eko Pramukantoro³
Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta^{1,2,3}
*Corresponding Author: duantyindiardina@gmail.com

ABSTRAK

Atherothrombosis adalah penyakit yang terjadi akibat tersumbatnya bekuan darah (trombus) pada pembuluh darah (arteri). Salah satu pengobatan untuk atherothrombosis dapat berupa fibrinolitik. Agen fibrinolitik dapat berasal dari hewan, tumbuhan atau mikroba. Tujuannya untuk mengetahui ekstrak metabolit sekunder bakteri limbah cair RPA yang mempunyai aktivitas fibrinolitik. Tiga isolat bakteri berhasil diisolasi dari limbah cair RPA. Hasil identifikasi bakteri menunjukkan bahwa bakteri limbah cair RPA merupakan bakteri gram positif pada koloni A dan B, bakteri gram negatif pada koloni C. Hasil uji SIM, sitrat, katalase, dan koagulase menunjukkan 2 dari 3 koloni menunjukkan hasil positif. Ekstrak tersebut disaring fitokimianya dan hasilnya menunjukkan 3 koloni positif mengandung flavonoid. Konsentrasi yang paling efektif dalam melisiskan bekuan darah adalah konsentrasi 80% dengan persentase 55,04% pada koloni A.

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

ABSTRACT

Atherothrombosis is a disease that occurs due to blockage of a blood clot (thrombus) in a blood vessel (artery). One of the treatments for atherothrombosis can be fibrinolytics. Fibrinolytic agents can come from animals, plants or microbes. The aims to determine the secondary metabolite extracts of RPA liquid waste bacteria which have fibrinolytic activity. Three bacterial isolates were successfully isolated from RPA liquid waste. The results of bacterial identification showed that the RPA liquid waste bacteria were gram positive bacteria in colonies A and B, gram negative bacteria in colony C. The SIM, citrate, catalase, and coagulase test results showed that 2 of the 3 colonies showed positive results. The extract was screened for phytochemicals and the results showed that 3 colonies were positive for flavonoids. The most effective concentration in lysing blood clots was a concentration of 80% with a percentage of 55.04% in colony A.

Keywords : *clot lysis, fibrinolytic RPA liquid waste*

PENDAHULUAN

Penyakit jantung koroner adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh atherotrombosis ini. Berdasarkan *World Health Organization* (WHO), menyebutkan bahwa lebih dari 17 juta orang di dunia meninggal akibat penyakit jantung dan pembuluh darah. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesmas) tahun 2018, angka kejadian penyakit jantung dan pembuluh darah di Indonesia meningkat dari tahun ke tahun dengan prevalensi penyakit jantung di Indonesia sebesar 1,5% yang dapat diartikan 15 dari 1.000 orang Indonesia menderita penyakit jantung. Tubuh manusia mempunyai beberapa agen dan dua jalur mekanisme yang berperan melisiskan bekuan darah yang terdapat dalam pembuluh darah. Jalur mekanisme trombolisis bekerja dengan melisiskan bekuan pembuluh darah yang terbentuk karena aktivasi plasminogen sehingga agregat fibrin yang terbentuk dapat membentuk sumbatan pembuluh darah dan selanjutnya akan terdestruksi oleh plasmin, lalu dihasilkan produk degradasi yaitu fragmen-fragmen protein yang larut dalam air. Berdasarkan penelitian, agen fibrinolitik bisa melisiskan bekuan fibrin darah, menghambat aktivasi trombosit, dan mencegah trombosit untuk menggumpal (Ji *et al.*, 2008).

Agen trombolitik mempunyai 3 generasi. Pada generasi pertama yaitu streptokinase dan urokinase. Streptokinase adalah protein yang diperoleh dari kultur *streptokokus* β -hemolitik kelompok C yang mampu mengikat plasminogen, membentuk kompleks dengannya dan mengubahnya menjadi plasmin. Urokinase adalah protein yang mampu menurunkan fibrin dan fibrinogen, sehingga menghasilkan aksi fibrinolitik langsung. Pada generasi kedua terdapat alteplase sebagai aktivator plasminogen jaringan manusia (t-PA), yang diperoleh dengan teknik DNA rekombinan. Pada generasi ketiga, terdapat reteplase dan tenecteplase. Reteplase adalah t-PA yang bisa diubah dengan penghilangan struktur asam amino (Katzung dan Holford, 2002).

Terapi yang bisa diberikan kepada penderita PJK yaitu agen trombolitik dan agen fibrinolitik secara intravena. Biaya produksi yang efektif dan efek samping yang rendah dimiliki oleh agen fibrinolitik dibandingkan agen trombolitik yang memiliki biaya relatif mahal, waktu paruh yang pendek, reaksi di dalam tubuh relatif lama, dan hanya bisa diberikan dalam bentuk injeksi karena jika diberikan secara per oral akan terjadi perdarahan usus (Peng *et al.*, 2005). Agen fibrinolitik dapat berasal dari tanaman, hewan, atau mikroba. Agen fibrinolitik yang berasal dari mikroba lebih menarik digunakan pada bidang kesehatan (Peng *et al.*, 2005). Penggunaan mikroba sebagai bahan penghasil agen fibrinolitik mempunyai kelebihan yaitu bakteri mudah dan cepat ditumbuhkan, produksi mudah ditingkatkan, dan dapat dilakukan terus menerus tanpa bergantung dengan musim (Meyrath dan Volavseck, 1975).

Penelitian ekstrak metabolit sekunder bakteri yaitu berjudul “Uji Daya Hambat Ekstrak Metabolit Sekunder Bakteri Yang Berasal Dari Usus Ikan Sapu- Sapu (*Hypostomus plecostomus*) terhadap Bakteri Patogen”. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa bakteri juga tersusun atas metabolit sekunder seperti saponin dan terpenoid. Ekstrak kasar enzim bakteri *Bacillus cereus* dengan variasi konsentrasi 20; 40; dan 80% memberikan efek fibrinolitik yang mampu mendegradasi fibrin dan fibrinogen dengan metode plat fibrin (HA *et al.*, 2022).

Berdasarkan latar belakang tersebut, belum ada informasi lengkap mengenai penggunaan metabolit sekunder limbah cair RPA sebagai agen fibrinolitik sehingga membuka peluang untuk dilakukan penelitian terhadap sampel ekstrak bakteri limbah cair RPA untuk mengetahui potensi ekstrak sebagai agen fibrinolitik alami yang diawali dengan isolasi dan identifikasi. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian fibrinolitik terhadap sampel ekstrak bakteri limbah cair RPA dengan variasi 20, 40, dan 80%. Penentuan potensi fibrinolitik sampel ekstrak bakteri limbah cair RPA dengan menggunakan metode *clot lysis*. Metode tersebut dipilih karena waktu saat pengujian yang singkat, mudah, tidak memerlukan biaya yang banyak dan aktivitasnya bisa diketahui dengan kemampuan sampel dalam melisis bekuan darah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak metabolit sekunder bakteri isolat limbah cair RPA yang mampu menghasilkan aktivitas fibrinolitik.

METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, penggaris, pipet volume, gelas ukur, inkubator, autoklaf, corong kaca, beaker glass, cawan petri, tabung reaksi, pipet tetes, erlenmeyer, gelas kimia, thermometer, magnetic stirrer, batang pengaduk, jarum ose, spatula, lampu bunsen, kertas saring, laminar air flow (LAF), freezer, hotplate stirrer, oven, petri disk, *cool box*, centrifuge, botol kaca, gelas objek, mikroskop binokuler, dan tabung eppendorf.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah cair Rumah Potong Ayam (RPA) di Karanganyar, akuades, media Nutrient Agar, kristal violet, lugol iodine, alkohol, minyak emersi, hidrogen peroksida, plasma darah kelinci, bekuan darah kelinci, etanol 96%, nattokinase, kloroform, Liebermann-Bouchard, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, besi (III) klorida, NaCl 9%, dan Skim Milk Agar. Sampel diambil sebanyak

250 mL menggunakan botol sampel yang terbuat dari kaca dan sudah disterilkan terlebih dahulu. Botol sampel dimasukkan di cool box yang berisi es batu supaya suhu mendekati 4°C untuk mengawetkan sebelum dilakukan pengujian lanjutan (Sinaga, K., 2021).

HASIL

Pengambilan Sampel

Penelitian diawali dengan pengambilan sampel limbah cair Rumah Potong Ayam diperoleh dari Rumah Potong Ayam di UD Syafina, Desa Bendungan, Klodran, Colomadu, Karanganyar. Pengambilan dilakukan tanggal 02 Oktober 2023. Pengambilan sampel menggunakan botol kaca steril sebanyak 250 mL. Sampel dimasukkan ke dalam *cool box* untuk menghindari suhu meningkat saat perjalanan menuju Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Pengenceran Sampel

Pengenceran sampel dilakukan dengan tujuan memperoleh isolat murni dari bakteri (Wondal et al., 2019). Sampel limbah cair RPA dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} . Sampel ditambahkan dengan NaCl steril dengan perbandingan 1:10 dengan sampel dan dilanjutkan dengan isolasi bakteri.

Isolasi Bakteri

Isolasi bakteri dilakukan untuk memisahkan satu jenis bakteri dari campuran bakteri atau mikroorganisme lain. Hasil dari inkubasi terbentuk koloni bakteri yang menyebar. Koloni tunggal pada tiap sampel diambil untuk dilakukan pemurnian bakteri. Bakteri yang diisolasi adalah bakteri yang memiliki bentuk, warna, dan tepian yang berbeda. Isolasi bakteri diambil dari pengenceran 10^{-4} sebagai koloni A, 10^{-5} sebagai koloni B, dan 10^{-6} sebagai koloni C.

Pemurnian Bakteri

Isolat bakteri dari 3 pengenceran dipilih 3 bakteri yang memiliki warna, bentuk, tepian yang berbeda untuk dilanjutkan ke tahap pemurnian bakteri dengan menggunakan media *nutrient agar*. Pemurnian dilakukan menggunakan metode *streak plate* untuk memisahkan sekumpulan bakteri menjadi koloni tunggal dengan metode kuadran 4. Hasil dari inkubasi terbentuk koloni tunggal pada tiap sampel.

Kultur Bakteri pada Media Nutrient Agar (NA)

Salah satu tujuan dilakukan kultur bakteri adalah memperbanyak stok jumlah bakteri. Isolat bakteri yang tumbuh pada pemurnian di media NA kemudian ditumbuhkan di media *nutrient agar* miring dengan cara penggoresan menggunakan ose steril pada media miring NA. Pemilihan media NA sebagai kultur bakteri karena termasuk media umum yang bisa menumbuhkan dan mengisolasi berbagai jenis mikroorganisme. Hasil didapatkan, tiap media NA menumbuhkan bakteri.

Identifikasi Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk melihat jenis morfologi bakteri yang sudah di kultur sebelumnya. Pewarnaan gram digunakan untuk melihat isolat bakteri gram negatif atau gram positif. Hasil yang didapatkan pada perbesaran 100x adalah bakteri koloni A memiliki bentuk batang dan berwarna ungu. Koloni B memiliki bentuk bulat dan berwarna ungu. Koloni C memiliki bentuk bulat dan berwarna merah. Hal ini menunjukkan pada koloni A dan B adalah bakteri Gram Positif. Sedangkan, koloni C adalah Gram Negatif.

Tabel 1. Hasil Pewarnaan Gram

Koloni	Bentuk	Warna	Susunan
A	Basil	Ungu	Diplobasil
B	Coccus	Ungu	Streptococcus
C	Coccus	Merah	Diplococcus

Identifikasi Biokimia

Tabel 2. Hasil Identifikasi Biokimia

Koloni	SIM	KIA	LIA	Sitrat	Katalase	Koagulase	Genus	Pustaka
A	+-	K/A S- G+	K/K S+ G+	+	+	+	Aeromonas	<i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>
B	++	K/A S+ G-	K/K S+ G-	+	-	-	Streptococcus sp.	<i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>
C	--	K/A S- G-	K/K S- G-	+	+	+	Serratia	<i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i>

Uji SIM

Hasil penelitian menunjukkan bakteri A memberikan hasil Sulfide (+), Indol (-), Motility (+) yang artinya bakteri A motil karena ada penyebaran bakteri di bekas tusukan dan ada kekeruhan pada media. Bakteri B memberikan hasil Sulfide (+), Indol (+), Motility (-) yang artinya bakteri B tidak motil ditunjukkan dengan hasil reaksi positif terbentuk warna hitam dan cincin merah di bagian atas setelah penambahan reagen ehrlich. Bakteri C memberikan hasil Sulfide (-), Indol (-), Motility (+) yang artinya bakteri C motil karena menunjukkan reaksi positif muncul penyebaran bakteri di bekas tusukan saat pengujian.

Uji KIA

Uji KIA dilakukan untuk melihat fermentasi karbohidrat dengan ada tidaknya gas sulfida. Hasil pengujian menunjukkan bakteri A terbentuk K/A dengan adanya gas dibawah media. Bakteri B terbentuk K/A dengan adanya sulfida atau kehitaman. Bakteri C terbentuk K/A dengan tidak adanya sulfida maupun gas. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri A, B, dan C adalah fermentor glukosa.

Uji LIA

Uji LIA dilakukan untuk membedakan basil gram negatif berdasarkan dekarboksilasi atau deaminasi lisis dan produksi hidrogen sulfida (H₂S). . Bakteri A, B, dan C menunjukkan hasil yang positif, terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dan kembali ungu. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga bakteri mempunyai kemampuan memecah lisin yang ada pada media.

Uji Sitrat

Uji sitrat dilakukan untuk mengetahui sumber karbon bakteri menggunakan atau tidak menggunakan sitrat. Hasil menunjukkan bahwa bakteri A sampai C positif dengan perubahan dari hijau ke biru yang berarti bakteri A, B, dan C menggunakan sitrat sebagai sumber karbon.

Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk melihat perubahan H₂O₂ yang toksin menjadi air dan oksigen yang tidak toksin. . Pada bakteri A dan C muncul buih yang tidak hilang selang beberapa saat yang artinya bakteri memiliki enzim katalase yang bisa memecah H₂O₂ menjadi

H₂O dan O₂. Pada bakteri B tidak muncul buih. Menurut penelitian Bergey's 1984, genus bacillus didapatkan hasil positif pada uji katalase. Hasil pengujian pada bakteri A dan C positif katalase dan bakteri B negatif katalase.

Uji Koagulase

Uji koagulase dilakukan untuk melihat bakteri bisa memproduksi enzim yang bisa menggumpalkan fibrin. Pada bakteri A dan C didapatkan reaksi positif terbentuk gumpalan dan saat dimiringkan gumpalan tetap berada di dasar tabung. Pada bakteri B saat dimiringkan gumpalan bergerak. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri A dan C bisa memproduksi enzim yang bisa menggumpalkan fibrin.

Pemanenan Bakteri

Tujuan dilakukan pemanenan bakteri adalah memperoleh produk dalam keadaan relatif stabil. Pemanenan dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan murni dari media NA miring dan ditambahkan kedalam erlenmeyer yang berisi media BHI 2% dilakukan shaker inkubator selama 24 jam. Sampel 2% ditambahkan ke dalam media BHI 250 mL dilakukan shaker inkubator selama 2 hari 120 rpm. Ketiga sampel dilakukan sentrifugasi selama 15 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dari supernatan, diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil Pemanenan Bakteri Isolat Limbah Cair RPA

Koloni	Pelet (gram)	Supernatan (gram)
A	11	178
B	11	192
C	7	182

Ekstraksi Metabolit Sekunder Isolat Bakteri Limbah Cair Rumah Potong Ayam

Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etil asetat 1:1. Berat sampel 100 gram dengan pelarut 100mL di ekstraksi cair cair dengan bantuan corong pisah. Hasil ekstraksi terbagi menjadi 2 fase. Fase etil asetat diambil dan dipanaskan di atas water bath sampai terbentuk ekstrak kental.

Tabel 4. Hasil Ekstrak Etil Asetat Limbah Cair RPA

Koloni	Sebelum di pekatkan (gram)	Setelah di pekatkan (gram)
A	227	155
B	224	155
C	218	155

Identifikasi Fitokimia

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam sampel bakteri. Hasil didapatkan bahwa ketiga sampel bakteri positif mengandung flavonoid. Senyawa flavonoid bisa mencegah penggumpalan darah. Salah satu senyawa turunan flavonoid yaitu rutin bisa menghambat akumulasi trombosit dan pembentukan fibrin selama pembentukan trombus (The Harvard Gazette, 2012).

Uji Potensi Fibrinolitik

Uji potensi aktivitas fibrinolitik dilakukan untuk menentukan kemampuan ekstrak etil asetat bakteri limbah cair RPA dalam melisis bekuan darah kelinci. Penelitian ini menggunakan darah kelinci karena mudah didapatkan. Metode *clot lysis* adalah parameter identifikasi kemampuan fibrinolitik berdasar pada banyak atau sedikitnya lisis bekuan darah setelah diberi perlakuan.

Pengukuran aktivitas potensi fibrinolitik ekstrak etil asetat limbah cair RPA dibuat dalam beberapa variasi konsentrasi, yaitu 20 ; 40 ; dan 80%. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO. Kontrol positif yang digunakan adalah nattokinase. Pemilihan nattokinase sebagai kontrol positif karena sudah terbukti sebagai agen fibrinolitik dan diduga memiliki kesamaan mekanisme kerja dengan ekstrak etil asetat limbah cair RPA.

Berdasarkan hasil penelitian, sampel ekstrak etil asetat limbah cair RPA dengan konsentrasi 80% memiliki persentase lisis bekuan darah tertinggi yaitu rata-rata persentase lisis sebesar 55,04% dibandingkan konsentrasi lainnya. Konsentrasi 80% menghasilkan persentase lisis bekuan darah kelinci tertinggi karena merupakan konsentrasi tertinggi sehingga menghasilkan hasil optimal dalam melisiskan bekuan darah. Semakin tinggi konsentrasi sampel yang diujikan, semakin besar persentase lisis yang diperoleh.

Tabel 5. Hasil Persentase Lisis Ekstrak Etil Asetat Limbah Cair RPA Koloni A

Konsentrasi	Persentase Lisis Bekuan Darah (%)			Rata rata % ± SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
20%	16,67	26,53	12,64	18,61 ± 7,1
40%	22,80	36,15	21,21	26,72 ± 8,2
80%	55,75	46,95	62,42	55,04 ± 7,7
Nattokinase	60,45	58,87	65,45	61,59 ± 3,4
DMSO	1,29	1,36	0,79	1,14 ± 0,31

Tabel 6. Hasil Persentase Lisis Ekstrak Etil Asetat Limbah Cair RPA Koloni B

Konsentrasi	Persentase Lisis Bekuan Darah (%)			Rata rata % ± SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
20%	23,52	15,59	10,97	16,69 ± 6,3
40%	45,58	33,01	33,63	37,40 ± 7,0
80%	67,36	36,17	59,44	54,32 ± 16,2
Kontrol +	67,56	45,45	70,12	61,04 ± 13,5
Kontrol -	1,78	1,14	1,25	1,39 ± 0,3

Tabel 7. Hasil Persentase Lisis Ekstrak Etil Asetat Limbah Cair RPA Koloni C

Konsentrasi	Persentase Lisis Bekuan Darah (%)			Rata rata % ± SD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	
20%	16,12	16	7,2	13,10 ± 5,1
40%	37,03	32,40	36,36	35,26 ± 2,5
80%	55,33	46,77	40	47,36 ± 7,6
Kontrol +	57,37	47,05	56,25	53,55 ± 5,6
Kontrol -	0,97	0,64	1,86	1,15 ± 0,6



Gambar 1. Gumpalan Darah Koloni A yang Telah Lisis dengan Metode *Clot Lysis*



Gambar 2. Gumpalan Darah Koloni B yang Telah Lisis dengan Metode *Clot Lysis*



Gambar 3. Gumpalan Darah Koloni C yang Telah Lisis dengan Metode *Clot Lysis*

Analisis data

Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas fibrinolitik dilakukan analisis data dengan software SPSS dengan metode *Shapiro-wilk* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal. Hasil didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya data sudah terdistribusi normal. Lalu dilanjutkan dengan analisis homogenitas dan didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$ yang artinya data terdistribusi normal dan homogen. Maka dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan yang bermakna ada kelompok sampel variasi konsentrasi ekstrak etil asetat bakteri dan hasil didapatkan nilai signifikansi $< 0,00$ karena nilai $\text{sig} < 0,05$ maka terdapat perbedaan bermakna satu sama lain antar variasi konsentrasi ekstrak etil asetat bakteri terdapat hasil persentase lisis. Uji lanjutan dengan post hoc test didapatkan hasil pada nattokinase dengan sampel konsentrasi 80% tidak memiliki perbedaan yang bermakna dan berada di subset yang sama sehingga bisa diartikan bahwa sampel memiliki aktivitas fibrinolitik yang sama.

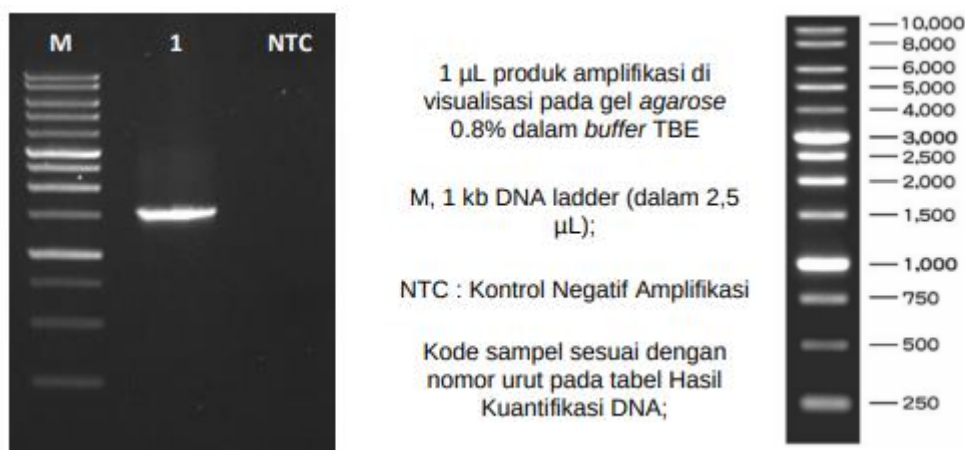
Identifikasi Molekuler

Tahapan proses PCR meliputi denaturasi DNA template, penempelan primer, dan polimerisasi rantai DNA. Pengukuran konsentrasi DNA dengan nanodrop dihasilkan nilai konsentrasi $79.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ dengan kemurnian DNA pada nilai absorbansi rasio A260/280 adalah 1.95. Standar kemurnian DNA rasio A260/280 yang baik antara 1,8-2,0 (Widayat et al.,2019).

Amplifikasi fragmen gen 16s rRNA metode PCR didapatkan hasil 1 untai ganda DNA yang sejajar dengan DNA Ladder $\pm 1500 \text{ bp}$ sejajar dengan produk amplifikasi gen 16s rRNA isolat koloni A sehingga bakteri dapat diamplifikasi.

Hasil amplifikasi dikirim ke 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa. Analisis lanjutan secara online dengan BLAST. Hasil BLAST menunjukkan tingkat persamaan urutan nukleotida gen 16S rRNA bakteri yang terdaftar di GenBank. Urutan basa nitrogen yang diperoleh mempunyai kemiripan 100% dengan fragmen gen 16s ribosomal RNA isolat bakteri *Aeromonas veronii* LCR7 (Genbank code access : MT226399. 1). Berdasarkan penelitian, genus *Aeromonas* termasuk bakteri gram negatif, motil, warna koloni

putih, bentuk bulat, margin lobate dan elevasi convex. Hasil sekuensing produk amplifikasi pada daerah 16S rRNA dihasilkan ukuran 1403 bp yang ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 4. Elektroforesis Produk Amplifikasi

Sequence Assembly 1403bp

```

1      TGCAGTCGAG CGGCAGCGGG AAAGTAGCTT GCTACTTTTG CCGGCGAGCG GCGGACGGGT
61     GAGTAATGCC TGGGGATCTG CCCAGTCGAG GGGGATAACT ACTGGAAACG GTAGCTAATA
121    CCGCATAACG CCTACGGGGG AAAGCAGGGG ACCTTCGGGC CTTGCGCGAT TGGATGAACC
181    CAGGTGGGAT TAGCTAGTTG GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCGACGATC CCTAGCTGGT
241    CTGAGAGGAT GATCAGCCAC ACTGGAAC TGAGACCGGC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG
301    CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGGAAAC CCTGATGCAG CCATGCCGCG TGTGTGAAGA
361    AGGCCTTCGG GTTGTAAGC ACTTTCAGCG AGGAGGAAAG GTTGGTAGCT AATAACTGCC
421    AGCTGTGACG TFACTCGCAG AAGAAGCACC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
481    ACGGAGGGTG CAAGCGTTAA TCGGAATTAC TGGGCGTAAA GCGCACGCGG GCGGTTGGAT
541    AAGTTAGATG TGAAAGCCCC GGGCTCAACC TGGGAATTGC ATTTAAAAAT GTCCAGCTAG
601    AGTCTTGTAG AGGGGGGTAG AATTCAGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA GATCTGGAGG
661    AATACCGGTG GCGAAGGCGG CCCCTGGAC AAAGACTGAC GCTCAGGTGC GAAAGCGTGG
721    GGAGCAAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGTCG ATTTGGAGGC
781    TGTGTCTTGG AGACGTGGCT TCCGGAGCTA ACGCGTTAAA TCGACCGCCT GGGGAGTACG
841    GCCGCAAGGT TAAAACTCAA ATGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG GAGCATGTGG
901    TTTAATTCGA TGCAACGCGA AGAACCTTAC CTGGCCTTGA CATGTCTGGA ATCCTGCAGA
961    GATGCGGGAG TGCCTTCGGG AATCAGAACA CAGGTGCTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG
1021   TCGTGAGATG TTGGGTTAAG TCCGCAACG AGCGCAACCC CTGTCCTTTG TTGCCAGCAC
1081   GTAATGGTGG GAACTCAAGG GAGACTGCCG GTGATAAACG GGAGGAAGGT GGGGATGACG
1141   TCAAGTCATC ATGGCCCTTA CGGCCAGGGC TACACACGTG CTACAATGGC GCGTACAGAG
1201   GGCTGCAAGC TAGCGATAGT GAGCGAATCC CAAAAAGCGC GTCGTAGTCC GGATCGGAGT
1261   CTGCAACTCG ACTCCGTGAA GTCGGAATCG CTAGTAATCG CAAATCAGAA TGTTCGGGTG
1321   AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC CGTCACACCA TGGGAGTGGG TTGCACCAGA
1381   AGTAGATAGC TTAACCTTCG GGA
    
```

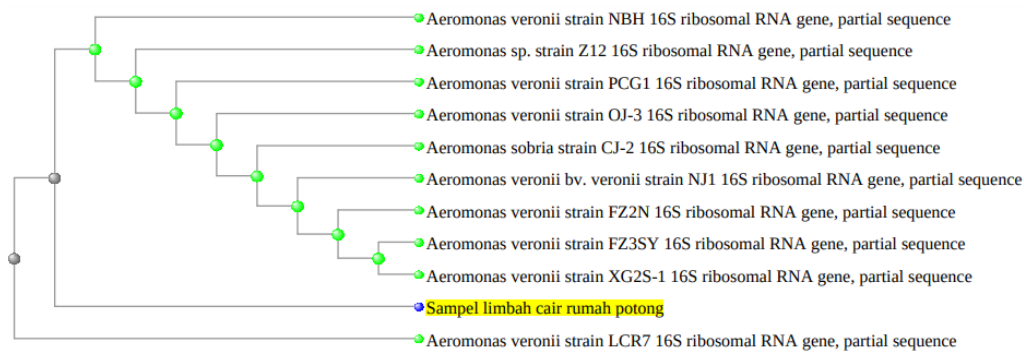
Gambar 5. Hasil Sekuensing Produk Amplifikasi

Hasil sekuensing produk amplifikasi dicocokkan dengan bakteri pada database NCBI GenBank dengan menggunakan algoritma BLAST. Identifikasi dengan marka 16S rRNA sehingga didapatkan hasil 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 pada BLAST dan *Phylogenetic Tree* dibawah menunjukkan bahwa urutan nukleotida 16S rRNA dari isolat koloni A yang berasal dari limbah cair RPA memiliki tingkat *similarity* yang tinggi yaitu 100% dengan *Aeromonas veronii strain*.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
✓	Aeromonas veronii strain LCR7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MT226399.1
✓	Aeromonas veronii strain NBH 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MT071624.1
✓	Aeromonas sp. strain Z12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MN922947.1
✓	Aeromonas veronii strain PCG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MN581681.1
✓	Aeromonas veronii strain OJ-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MN216290.1
✓	Aeromonas sobria strain CJ-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MN216284.1
✓	Aeromonas veronii bv. veronii strain NJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MK898824.1
✓	Aeromonas veronii strain FZ2N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MF716720.1
✓	Aeromonas veronii strain FZ3SY 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MF716718.1
✓	Aeromonas veronii strain XG2S-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2591	2591	100%	0.0	100.00%	MF716693.1

Gambar 6. Hasil Top 10 Hit BLAST terhadap NCBI, Excluding Uncultured Sample Sequences



Gambar 7. Phylogenetic Tree by NCBI

KESIMPULAN

Pertama, bakteri limbah cair RPA memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu flavonoid yang ditunjukkan dengan adanya pemisahan pada lapisan amil alkohol dan terbentuknya warna kuning hingga jingga. Kedua, ekstrak dari bakteri limbah cair RPA di Karanganyar memiliki aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan adanya gumpalan darah kelinci yang lisis dengan penambahan sampel 3 bakteri. Ketiga, konsentrasi efektif ekstrak metabolit sekunder limbah cair RPA sebagai agen fibrinolitik secara *in vitro* adalah konsentrasi 80% dengan persentase lisis sebesar 55,04 % pada koloni A.

UCAPAN TERIMAKASIH

Saya dengan tulus ingin menyampaikan rasa terimakasih kepada semua pihak yang telah berpartisipasi dan memberikan kontribusi berharga dalam penelitian ini yang telah memberikan bantuan serta dukungan yang luar biasa dalam memperlancar jalannya penelitian ini. Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada seluruh civitas akademika Universitas Setia Budi Surakarta dan Genetika Science.

DAFTAR PUSTAKA

- Aini, A., Sriasih, M., & Kisworo, D. (2017). Studi Pendahuluan Cemaran Air Limbah Rumah Potong Hewan di Kota Mataram. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 15(1), 42. <https://doi.org/10.14710/jil.15.1.42-48>
- Al-Jauhari, A. (2021). *Profil Puskesmas Colomadu II*. Dialog. <https://doi.org/10.47655/dialog.v44i2.507>
- Apriansyah, A. (2021). Uji Daya Hambat Ekstrak Metabolit Sekunder Bakteri Yang Berasal Dari Usus Ikan Sapu-sapu (*Hypostomus Plecostomus*) Terhadap Bakteri Patogen (Doctoral dissertation, Universitas Islam Riau).

- Balai Informasi Teknologi LIPI (2009b) 'UPT – Balai Informasi Teknologi LIPI UPT', UPT - Balai Informasi LIPI.
- Baskin, J. et al., (2012). Thrombolytic therapy for central venous catheter occlusion. *Haematologica*, 97(5), pp.641-50.
- Clinical Education. (2019). Diakses pada 22 Juni 2023 dari <https://www.clinicaleducation.org/resources/reviews/potent-natural-fibrinolytic-enzymes-safely-reduce-clotting-risk/>
- Darmawati, S., Sembiring, L., Asmara, W., Artama, W.T. and Kawaichi, M., 2014. Phylogenetic relationship of Gram Negative Bacteria of Enterobacteriaceae Family in the Positive Widal Blood Cultures based on 16S rRNA Gene Sequences. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 19(1), pp.64-70.
- Defriman D., Monalisa, Fauziah E., R. M. (2017). Efek modifikasi faktor risiko modifiable penyakit jantung koroner: a hospital-based matched case control study. *Jurnal Kesehatan Masyarakat Andalas*.
- Dina, E. B. Rompas. Max. R. J. Runtuwane. 2016. Analisis Kandungan Fitokimia dan Uji Aktifitas Antioksidan dari Tanaman Lire (*hemigraphis repanda*), Unsrat Manado. 36-39 Hal
- Fox, K., White, H.D., Gersh, B. & Opie, L.H., (2013). Antithrombotic Agents: Platelet Inhibitors, Acute Anticoagulants, Fibrinolytics, and Chronic Anticoagulants. In *Drugs For The Heart*. Eighth Edition ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc. pp.378-87.
- HA, R. B., Indrayati, A., & 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.
- Hwang, Kim, Kim, Huh, Min, Park, Han, Lee, Kim, Ryu, & Kim. 2002. In vivo Evaluation of Lumbrokinase, a Fibrinolytic Enzyme Extracted from *Lumbricus rubellus*, in a Prosthetic Vascular Graft. *J. Cardiovas Surg.*, 43: 891-894.
- Inayatul, W. O., Muchlissin, S. I., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., & Ethica, S. N. (2018). Isolasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Protease *Pseudomonas Stutzeri* ISTD4 dari Tempe Gembus Pasca Fermentasi 1 Hari. In *Prosiding Seminar Nasional & Internasional* (Vol. 1, No. 1).
- Ji, H., Wang, L., Bi, H., Sun, L., Cai, B., Wang, Y., ... & Du, Z. (2008). Mechanisms of lumbrokinase in protection of cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*, 590(1-3), 281-289.
- Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S Longo D and Jameson JL. 2004. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th Edition. Publisher: McGraw-Hill Professional, pp. 1367-1377.
- Kementerian Kesehatan RI (2017) 'Penyakit Jantung Penyebab Kematian Tertinggi, Kemenkes Ingatkan Cerdik', Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. doi: 351.077 Ind r.
- Kowalak, J.P. Dkk. 2011. *Buku Ajar Patofisiologi*. Jakarta: EGC
- Majid, A. 2007. *Penyakit Jantung Koroner: Patofisiologi, Pencegahan dan Pengobatan Terkini*. Dalam: USU e-Repository ©2008 Universitas Sumatera Utara <http://library.usu.ac.id/download/fk/PJK.pdf> diakses pada hari selasa, 27 juni 2023
- Marleni, L. dan Alhabib, A. (2018). Faktor Risiko Penyakit Jantung Koroner di RSI SITI Khadijah Palembang. *Jurnal Kesehatan*. doi: 10.26630/jk.v8i3.663
- Maqsood, M., Mushtaq, Z., Rasheed, T., Nisa, Z. U., & Sher, F. (2021). Thrombolytic and cytotoxic activity of different bioactive extracts of *E. coli*. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 3, 100080.
- Milner, M., dan Makise, K. 2002. Natto and Its Active A Potent and Safe Thrombolytic Agent. *Alternative and Complementary Therapies*. 8(3):157-164. <https://doi.org/10.1089/107628002760091001>

- Munger, M. A., & Hawkins, D. W. (2004). Atherothrombosis: epidemiology, pathophysiology, and prevention. *Journal of the American Pharmacists Association*, 44(2), S5-S13.
- N.R. Colledge, B.R. Walker & B.H. Ralston, eds. *Davidson's Principle and Practice of Medicine*. 21st ed. Edinburgh: Elsevier. pp.577-98.
- Oemiyati, R. and Rustika, R. (2015) 'Faktor Risiko Penyakit Jantung Koroner (PJK) pada Perempuan', *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*. doi: 10.22435/hsr.v18i1.4277.47-55.
- Pan, R., Zhang, Z.J., & He, R.Q. 2009. Review Article: *Earthworm protease*. *App Environ. Soil Sci.*, 2010: 1-13.
- Sekhar, G.R. et al., (2017). A Review on Thrombolytic Therapy used in Myocardial Infarction (Streptokinase vs Tenecteplase). *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 45(2), pp.29-32.
- SINAGA, K. (2021). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah Cair Rumah Potong Hewan (Rph).
- Singgih, L. M., & Kariana, M. (2008). Peningkatan Produktifitas dan Kinerja Lingkungan Dengan Pendekatan Green Productivity Pada Rumah Pemotongan Ayam XX. Jurusan Teknik Industri, Fakultas Telnologi Industri, 1–11.
- Thomas, K.N. & Christoph, B., (2015). Thrombolytic Agents And Their Role In Clinical Medicine. *BMJ*
- Viles-Gonzalez, J. F., Fuster, V., & Badimon, J. J. (2004). Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *European heart journal*, 25(14), 1197-1207.
- Vivek, L., (2017). Fibrinolytic Drug Therapy in the Management of Intravascular Thrombosis, Especially Acute Myocardial Infarction - A Review. *J of Pharmacol & Clin Res*, 2(4), pp.001-05.
- Yusufa, M. (2013). Identifikasi dan studi aktivitas protease *Bacillus* sp asal limbah cair rumah potong ayam tradisional sebagai kandidat penghasil biodeterjen (Doctoral dissertation, Universitas Brawijaya).