

## Pengaruh Konsentrasi Molase Terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Felita ANGGRAENI<sup>1)</sup>, ISNAENI<sup>1)</sup>, Achmad Toto POERNOMO<sup>\*1)</sup>

<sup>1)</sup>Departemen Kimia Farmasi

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

<sup>\*)</sup> Corresponding Author, Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286, e-mail : achmad.toto.p@gmail.com

### ABSTRAK

Molasse adalah salah satu sumber karbon paling murah dan mudah diperoleh sebagai limbah industri pabrik gula yang kaya nutrisi dan mineral. Molase mengandung gula 62% dari total gula, sehingga memiliki potensi yang memadai untuk media pertumbuhan mikroba. Peran molase sebagai media nutrisi untuk produksi enzim fibrinolitik telah diteliti. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 digunakan sebagai penghasil enzim fibrinolitik menggunakan molase sebagai substrat atau salah satu komponen medium pertumbuhan dan fermentasi. Molase dapat ditambahkan ke media fermentasi pada berbagai konsentrasi (0,1%, 0,25%, 0,5% dan 2%). Enzim fibrinolitik sebagai produk fermentasi diuji dengan metode *plat* fibrin. Pertumbuhan maksimum *Bacillus subtilis* ATCC 6633 diamati 30 jam setelah inkubasi pada *thermo-shaker* 90 rpm dan suhu 28°C. Hasil studi menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 mampu menghasilkan enzim fibrinolitik dengan nilai indeks fibrinolitik  $2,30 \pm 0,20$  mm. Molase dapat digunakan sebagai media pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 untuk produksi enzim fibrinolitik dengan konsentrasi optimum 0,1% tanpa sumber karbon lain dengan aktivitas sebesar  $0,3254 \pm 0,0392$  Unit.mL<sup>-1</sup>.menit<sup>-1</sup>

Kata kunci: molase, enzim fibrinolitik, *Bacillus subtilis* ATCC 6633

### ABSTRACT

Molasse is one of the cheapest carbon sources and is easily obtained as a sugar mill industrial waste. Which is rich in nutrients and minerals. Molasses contains 62% sugar from total sugar, so it has sufficient potential for microbial growth media. The role of molasses as a nutritional medium for the production of fibrinolytic enzymes has been studied. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is used as a producer of fibrinolytic enzymes using molasses as a substrate or one of the components of the growth and fermentation medium. Molasses is added to fermentation media at various concentrations (0,1%, 0,25%, 0,5% and 2%). The fibrinolytic enzyme as a fermentation product was tested using the fibrin plate method. The maximum growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was observed 30 hours after incubation in the thermo-shaker 90 rpm and temperature of 28°C. The results obtained showed that *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was able to produce fibrinolytic enzymes with a fibrinolytic index value of  $2,30 \pm 0,20$  mm. Molasses can be used as a medium for growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for the production of fibrinolytic enzymes with an optimum concentration of 0,1% without other carbon sources with activity of  $0,3254 \pm 0,0392$  Unit.mL<sup>-1</sup>.menit<sup>-1</sup>

Keywords: molasse, fibrinolytic enzyme, *Bacillus subtilis* ATCC 6633

### PENDAHULUAN

Enzim telah menjadi elemen penting di bidang industri. Berkembang pesatnya teknologi dan adanya kebutuhan terus-menerus menjadikan produksi enzim sangat dibutuhkan dalam jumlah yang lebih besar, dengan kualitas yang lebih tinggi dan dengan biaya yang lebih rendah, salah satunya produk enzim di bidang kesehatan. Sumber enzim fibrinolitik banyak berasal dari mikroorganisme, yang memiliki beberapa keuntungan, antara lain mikroorganisme dapat mengeluarkan enzim secara langsung dalam proses fermentasi, selain itu dapat diproduksi dalam waktu singkat, mudah dikontrol, dan pertumbuhannya cepat. Salah satu contoh bakteri penghasil enzim fibrinolitik adalah *Bacillus subtilis* (Dijl and Hecker, 2013)

Enzim fibrinolitik termasuk dalam protease serin atau metaloprotease yang mampu mendegradasi trombus, sehingga enzim ini berpotensi sebagai

nutrisi dan diaplikasikan pada *neutraceutical*, karena penggunaannya efektif dapat mencegah penyakit kardiovaskular (Kotb, 2012). Dalam menghasilkan produk enzim, komponen media fermentasi harus mengandung semua elemen yang dibutuhkan oleh mikroorganisme dalam proses fermentasi, terutama sumber karbon dan nitrogen, terutama untuk pertumbuhan mikroorganisme dan memaksimalkan pembentukan produk (Grata, Nabrdalik and Latala, 2008).

Pada penelitian ini sumber karbon yang digunakan dalam proses pertumbuhan dan produksi enzim fibrinolitik ialah molase, karena memiliki kandungan gula sebanyak 62% (sukrosa 32%, fruktosa 16%, glukosa 14%) dan kandungan *non-* gula sebanyak 10%, serta mineral sebanyak 8% yang cukup potensial untuk pertumbuhan mikroba (Hubert, 2006, Pangesti and Pangestuti, 2012). Selanjutnya dilakukan pengujian pengaruh konsentrasi media molase pada

berbagai konsentrasi terhadap aktivitas fibrinolitik, sehingga dapat diketahui konsentrasi optimum molase dapat memberikan aktivitas fibrinolitik yang maksimal.

## 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* (Memmert), *vortex* Genie (Wilten), tabung *appendorf*, *sengkelit* (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 Enzim Proteolitik

Penapisan enzim proteolitik dilakukan pada media skim milk agar, dibuat dengan cara membuat larutan 15% (b/v) susu skim, yang dilarutkan dalam 40,0 mL air suling. Kemudian disterilkan dengan cara pasteurisasi di atas hotplate 80°C selama ± 30 menit. Dibuat larutan agar 2% (b/v), dilarutkan dalam 60,0 mL air suling, selanjutnya diotoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan agar steril dimasukkan ke dalam larutan susu di atas hotplate 80°C, diaduk selama ± 30 menit sampai homogen. Kemudian, diambil 20,0 mL larutan skim milk agar dan dituangkan merata ke dalam cawan petri dan diamkan sampai memadat (modifikasi metode (Vijayaraghavan, Gnana and Vincent, 2013). Pada media skim milk agar yang sudah siap, dibuat 2 sumur pada setiap cawan petri. Suspensi bakteri diukur transmittan 25% dengan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 580 nm. Dimasukkan sebanyak 50 µL suspensi mikroba ke dalam sumur dan sumur lainnya berisi *dapar fosfat* pH 7,8 sebagai kontrol negatif. Kemudian cawan petri dimasukkan inkubator suhu 37 °C selama 24 jam. Bakteri yang menghasilkan enzim proteolitik akan memberikan zona jernih di sekitar lubang. Diukur diameter zona jernih dengan jangka sorong (Modifikasi metode Rovati et al. 2010).

### Penapisan enzim fibrinolitik

Penapisan enzim fibrinolitik menggunakan metode fibrin plate, dibuat dengan cara 0,3% b/v fibrin dilarutkan di dalam 40,0 mL *dapar fosfat* 0,2 M pH 7,8. Sebanyak 2% (b/v) agar dilarutkan dalam 60,0 mL air suling. Kedua larutan tersebut diotoklaf pada suhu 121°C selama ± 30 menit. Kedua larutan steril dicampur homogen dan ditambah 400 µL metilen blue agar zona

jernih terlihat dengan jelas. Dalam keadaan masih panas, tuangkan media fibrin plate sebanyak 20,0 mL ke dalam cawan petri. Media didiamkan sampai memadat (Modifikasi metode Astrup and Mullertz 1952). Pada media fibrin plate yang sudah siap, dibuat 3 sumur pada setiap plate dimana masing-masing sumur diinokulasikan 50 µL suspensi bakteri transmittan 25%, 0,2 M *dapar fosfat* pH 7,8 sebagai kontrol negatif, dan standar natto sebagai kontrol positif. Kemudian cawan petri dimasukkan inkubator pada suhu 37 °C selama 48 jam. Bakteri yang menghasilkan enzim fibrinolitik akan memberikan zona jernih di sekitar lubang. Diukur diameter zona jernih dengan jangka sorong (modifikasi Pandee et al. 2008).

### Pembuatan starter

*Slant* agar biakan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang positif memberikan zona jernih pada uji fibrin plate diperbanyak dengan menumbuhkannya di media nutrient agar, kemudian diinkubasi selama 24jam, selanjutnya dilakukan pengenceran dengan 10,0 mL NaCl 0,9 %, kemudian di-vortex sampai bakteri terlepas dari medianya. Diencerkan hingga didapatkan transmittan 25 % dengan NaCl 0,9%. Sebanyak 20,0 mL suspensi bakteri transmittan 25% dimasukkan ke dalam nutrient broth 200,0 mL. Labu Erlenmeyer diletakkan dalam shaker inkubator kecepatan 90 rpm selama 24 jam pada suhu 30°C.

### Kurva pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan dan produksi enzim fibrinolitik dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dilakukan pada media molase broth dengan lima macam konsentrasi, yaitu 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%; dan 2% (b/v). Suspensi starter diambil 15,0 mL untuk dicampurkan ke dalam masing-masing 150,0 mL molase pada Erlenmeyer, kemudian diinkubasi dengan shaker inkubator kecepatan 90 rpm selama selama 30 jam pada suhu 30°C. Setiap interval 3 jam diambil sebanyak ± 5,0 mL suspensi, divortex, selanjutnya 2,0 mL digunakan untuk menentukan optical density (OD) pada panjang gelombang 580 nm dan 3,0 mL untuk uji aktivitas enzim fibrinolitik. Dibuat kurva pertumbuhan dengan x sebagai waktu inkubasi dalam jam dan y sebagai absorbansi (modifikasi metode Raut et al. 2012).

### Uji aktivitas enzim fibrinolitik

Ke dalam setiap tabung *venoject* dimasukkan sebanyak 1000 µL 0,05 M *dapar fosfat* pH 7,8 dan ditambahkan 1000 µL fibrin 3% (b/v). Untuk tabung sampel ditambahkan 1000 µL larutan enzim, sedangkan blanko diisi dengan 1000 µL 0,05M *dapar fosfat* pH 7,8. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 1000 µL TCA 5% (b/v) dalam 100,0 mL air suling. Setelah penambahan TCA, tabung diinkubasi selama 10 menit pada suhu 28°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu ruang selama 15 menit. Supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum tirosin 274 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan dimasukkan dalam

persamaan garis regresi standar tirosin untuk menentukan unit aktivitas enzim yang terkandung dalam sampel. Uji aktivitas enzim fibrinolitik diukur dengan metode modifikasi Nascimento et al. 2015)

#### Pembuatan kurva baku tirosin

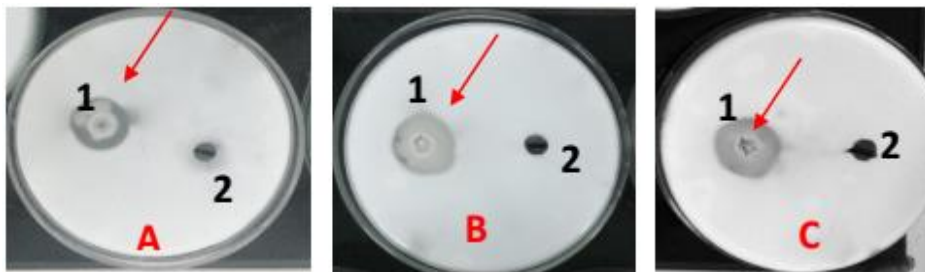
Dibuat larutan baku induk tirosin 500,0 ppm dengan menimbang seksama 50,0 mg tirosin dilarutkan dengan HCl 0,1 M dalam beaker glass dan dipindahkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Setelah dilakukan ultrasonikasi selama  $\pm 5$  menit untuk menyempurnakan kelarutan, ditambahkan pelarut HCl 0,1 M hingga tepat tanda dan dikocok sampai homogen. 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. Diukur serapan tiap-tiap standar baku kerja pada panjang gelombang maksimum tirosin, sebagai blanko digunakan larutan HCl 0,1 M. Kurva baku standar tirosin menunjukkan korelasi

konsentrasi standar tirosin (ppm) sebagai sumbu X dan nilai absorbansi sebagai sumbu Y.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

##### Penapisan enzim proteolitik *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Penapisan enzim proteolitik dilakukan dengan media susu skim yang mengandung kasein, protein susu yang memberikan warna putih pada susu. Enzim proteolitik akan menghidrolisis kasein menjadi peptida dan asam amino, sehingga terbentuk zona jernih di sekitar lubang yang berisi suspensi bakteri. Dari hasil penapisan aktivitas enzim proteolitik pada suhu inkubasi 37 °C selama 24 jam, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 positif menghasilkan protease ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar lubang berisi suspensi bakteri (Gambar 1). Hasil indeks proteolitik pada ketiga replikasi didapatkan hasil rata-rata  $2,80 \pm 0,1$  mm (Tabel 1).



**Gambar 1.** Hasil penapisan aktivitas enzim proteolitik dari suspensi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 transmittan 25% pada 15% b/v media skim milk agar yang berumur 24 jam, pada suhu inkubasi 37°C. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi (A,B, dan C) dengan lubang (1) yang berisi suspensi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 transmittan 25%, dan lubang (2) yang berisi dapar fosfat 0,2M pH 7,8 sebagai kontrol negatif.

**Tabel 1.** Pengukuran diameter zona jernih enzim proteolitik pada skim milk agar

No lubang	Replikasi	Diameter Zona Proteolitik (mm)	Diameter koloni bakteri (mm)	Indeks Proteolitik (mm)
1	A	20,4	8	2,9
	B	21,2	8	2,8
	C	21,6	8	2,7
			Rata-Rata $\pm$ SD	2,8 $\pm$ 0,1
2	A-C	-	-	-

#### Penapisan enzim fibrinolitik

Uji fibrin plate adalah langkah kualitatif aktivitas enzim fibrin dengan adanya zona jernih di sekitarnya suspensi bakteri. Zona jernih terjadi karena adanya degradasi fibrin oleh enzim fibrinolitik. Pada penelitian ini uji fibrin plate dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Penambahan pewarna metilen blue bertujuan untuk memperjelas zona jernih yang terbentuk di sekitar pencadang (sumuran). Dari Hasil pengamatan (Gambar 2 dan Tabel 2) dapat diketahui bahwa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 menghasilkan enzim fibrinolitik, demikian juga natokinase yang diuji pada petri yang sama, sedangkan larutan dapat fosfat sebagai kontrol negatif tidak menghasilkan respon.

#### Pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Untuk memperoleh kurva pertumbuhan, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ditumbuhkan pada media pertumbuhan molase dengan berbagai konsentrasi yaitu 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%; dan 2% yang diinkubasi selama 36 jam pada suhu 28°C. Data yang diperoleh didasarkan pada kekeruhan media pertumbuhan dari waktu ke waktu dan diukur menggunakan spektrofotometer visible pada panjang gelombang 580 nm. Pengukuran OD berarti menyatakan pengukuran kekeruhan cairan media yang mengandung sel bakteri dimana semakin besar nilai OD maka semakin besar sel bakteri dan menunjukkan adanya pertumbuhan. Optical density ini tidak spesifik untuk menyatakan jumlah sel yang hidup saja, tetapi juga sel bakteri yang

telah mati dan tersuspensi dalam media juga terukur. Pertumbuhan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada kelima konsentrasi media molase memiliki kecenderungan pertumbuhan yang hampir sama (Gambar 3). Fase lag terjadi pada 6 jam pertama, kemudian diikuti pertumbuhan sel untuk konsentrasi molase 0,1% - 2%.

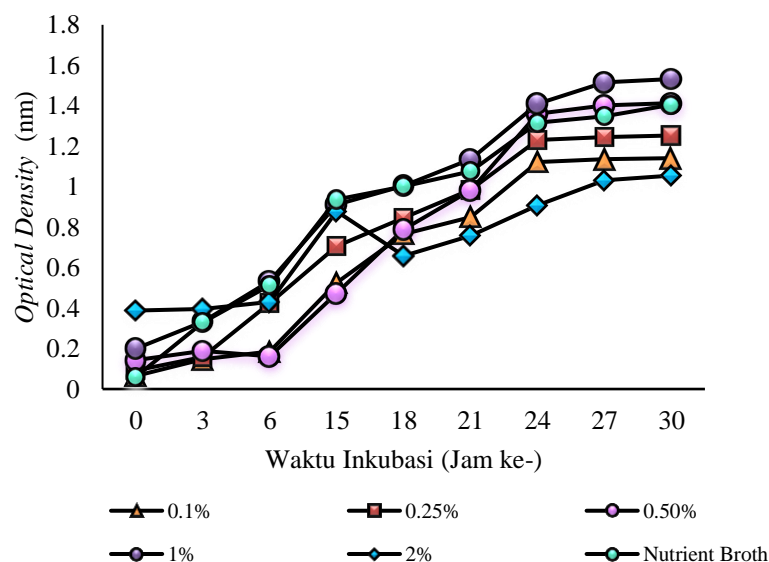
Semakin tinggi konsentrasi molase maka semakin tinggi juga biomassa sel yang dinyatakan sebagai OD, akan tetapi pada konsentrasi molase 2% terjadinya penurunan biomassa sel, yang dapat disebabkan oleh pengaruh tekanan osmosis pada media tersebut.



**Gambar 2.** Zona jernih yang dihasilkan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media fibrin plate. Lubang no 1: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Lubang no 2: Nattokinase (Kontrol positif), Lubang no 3 : Dapar fosfat 0,2M pH 7,8 (kontrol negatif)

**Tabel 2.** Diameter zona jernih enzim fibrinolitik pada *fibrin plate*. Lubang no 1: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Lubang no 2: Nattokinase (Kontrol positif), Lubang no 3 : Dapar fosfat 0,2M pH 7,8 (kontrol negatif )

No lubang	Replikasi	Diameter Zona Fibrinolitik (mm)	Diameter koloni bakteri(mm)	Indeks Fibrinolitik (mm)
1	A	17,0	8	2,1
	B	20,2	8	2,5
	C	18,3	8	2,3
			Rata-Rata ± SD	2,3 ± 0,2
2	A-C	20,7	8	2,6
3	A-C	-	-	-



**Gambar 3.** Hasil optical density *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media nutrient broth dan media molase berbagai kosentrasi dengan interval waktu pengambilan sampel sampai jam ke-36. Data tersaji diatas sebagai rerata pada tiga replikasi.

### Hasil pengamatan aktivitas enzim fibrinolitik *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Aktivitas enzim fibrinolitik maksimum diperoleh pada kondisi fermentasi yang optimum. Aktivitas enzim fibrinolitik ditentukan dari kemampuan enzim yang dapat memecah peptida fibrin (protein) menjadi asam amino-asam amino seperti fenilalanin, glisin, triptofan, arginin dan tirosin (Kotb, 2012). Analisis data untuk memperoleh aktivitas enzim fibrinolitik dihitung dengan mensubstitusikan nilai absorbansi ke dalam persamaan regresi linier kurva baku tirosin, sehingga didapatkan kadar tirosin sampel dalam  $\mu\text{g/mL}$  yang kemudian dimasukkan ke dalam rumus aktivitas enzim

(Unit/mL.menit), seperti yang tersaji pada Table 4. (Zu *et al.*, 2010).

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

[Ts] : Konsentrasi tirosin sampel dalam ( $\mu\text{g/ml}$ ) 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 ( $181,2 \mu\text{g} / \mu\text{mol}$ )

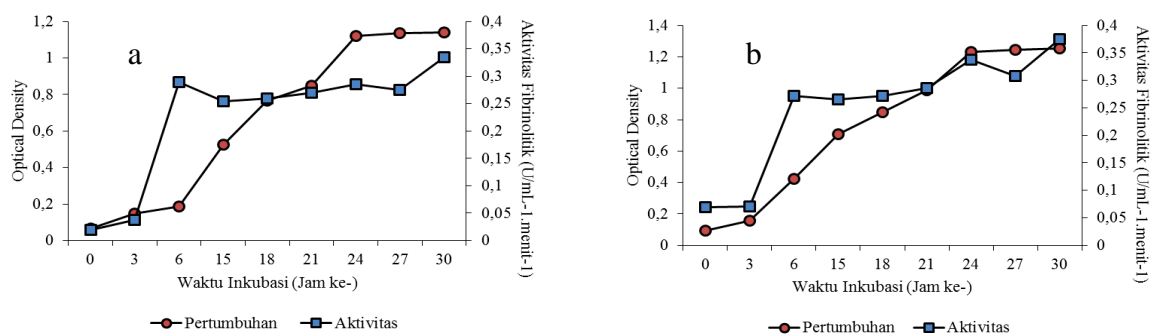
Aktifitas Fibrinolitik : U/ml.

**Tabel 4.** Hasil pengamatan aktivitas enzim fibrinolitik *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada media nutrient broth dan media molase berbagai konsentrasi

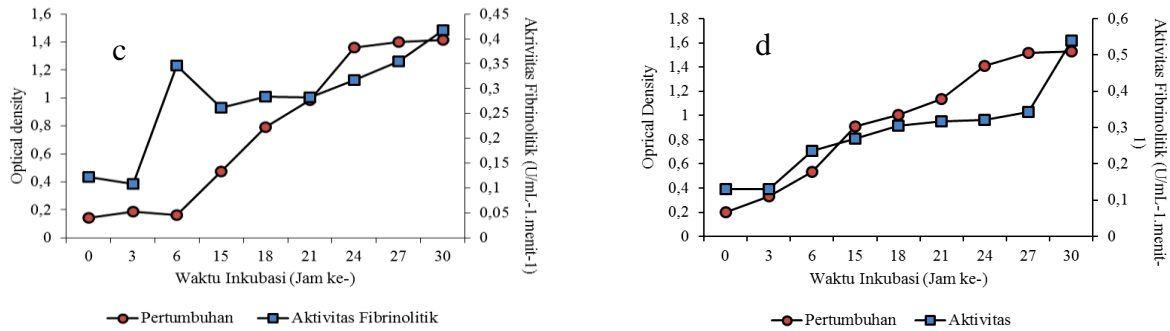
Waktu Inkubasi (jam ke-)	Aktivitas Enzim Fibrinolitik (Unit.mL <sup>-1</sup> .menit <sup>-1</sup> )				
	Molase 0,1 %	Molase 0,25 %	Molase 0,5 %	Molase 1 %	Molase 2 %
0	0,0202	0,0604	0,1051	0,1321	0,1518
3	0,0392	0,0719	0,1091	0,1424	0,3624
6	0,2950	0,2637	0,3291	0,2363	0,3726
15	0,2564	0,2757	0,2637	0,2668	0,3734
18	0,2612	0,2390	0,2993	0,3071	0,3750
21	0,2734	0,2805	0,3246	0,3211	0,3494
24	0,2844	0,2711	0,3296	0,3501	0,2076
27	0,2816	0,2908	0,3657	0,3456	0,3714
30	0,3254	0,3581	0,4034	0,4357	0,4110
33	0,1939	0,2185	0,2849	0,3564	0,3254
36	0,2174	0,1722	0,2901	0,3488	0,2852

Dari hasil diatas kemudian dibuat kurva pertumbuhan dan aktivitas enzim fibrinolitik *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dari kelima konsentrasi diatas dan diplotkan, untuk memperoleh waktu aktivitas enzim tertinggi dan dapat

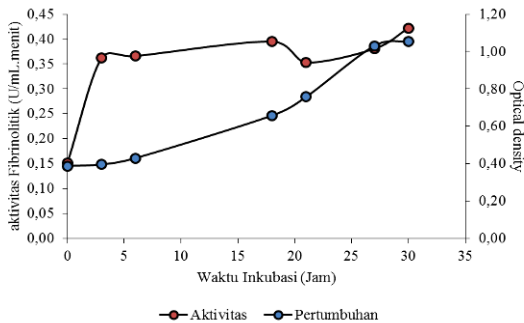
dilihat pada gambar 4 – 6, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada kelima konsentrasi media molase memiliki aktivitas enzim fibrinolitik terbesar pada jam ke-30.



**Gambar 4.** Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Fibrinolitik pada konsentrasi molase 0,1% (a) dan 0,25% (b)



Gambar 5. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Fibrinolitik pada konsentrasi molase 0,5% (c) dan 1,0% (d)



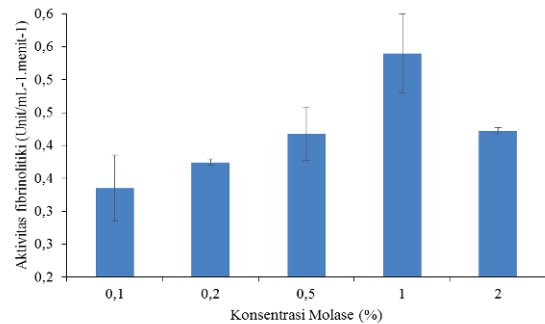
Gambar 6. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Fibrinolitik pada konsentrasi molase 2%

Fibrinolitik merupakan protease, termasuk metabolit primer yang biasanya dihasilkan pada saat fase pertumbuhan bakteri atau fase log, tetapi pada penelitian ini terjadi pada fase stasioner. Hal ini menunjukkan, bahwa pada fase log dan fase stationer, bakteri sudah tumbuh berkembang dan dapat mempertahankan hidup dengan cara menghidrolisis protein menjadi asam amino untuk menghasilkan beberapa enzim proteolitik termasuk fibrinolitik. Peningkatan aktivitas enzim disebabkan oleh pengaruh media yang berfungsi sebagai sumber karbon (karbohidrat) dan sumber nitrogen (protein) untuk pertumbuhan dan produksi enzim fibrinolitik. Semakin tinggi konsentrasi media yang digunakan, maka aktivitas enzim yang dihasilkan akan semakin besar, tetapi dengan konsentrasi yang terlalu tinggi bakteri juga tidak dapat menghasilkan metabolit atau enzim yang maksimal, karena media sumber karbon yang tersedia akan dimanfaatkan untuk produksi biomassa.

**Pengaruh konsentrasi molase terhadap aktivitas enzim fibrinolitik**

Dari hasil rata-rata masing-masing kelima konsentrasi dan aktivitas enzim fibrinolitik dibuat diagram batang untuk melihat hasil plot dari pengaruh konsentrasi molase terhadap aktivitas enzim fibrinolitik. Aktivitas tertinggi terjadi pada jam ke-

30 (Gambar 7) dan semakin tinggi konsentrasi molase, semakin tinggi pula aktivitas enzim yang dihasilkan.



Gambar 7. Profil pengaruh konsentrasi molase terhadap aktivitas enzim fibrinolitik

**Analisis Data**

Metode analisis statistik dilakukan dengan uji anova one way, untuk mengetahui perbedaan bermakna antara konsentrasi molase 0,1%; 0,25%; 0,5%; 1%; dan 2% dengan aktivitas enzim fibrinolitik. Berdasarkan perhitungan anova one way, diperoleh harga F hitung = 3,187 yang berarti lebih kecil dari pada F table pada taraf kemaknaan 0,05. Didapatkan nilai significant = 0,062 yang berarti lebih dari  $\alpha = 0,05$ . Nilai F hitung < F Table dan sig >  $\alpha$ , menandakan bahwa dari hasil uji statistika anova one way aktivitas enzim fibrinolitik pada kelima konsentrasi molase tidak memiliki perbedaan yang bermakna dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang diproduksi memiliki aktivitas enzim fibrinolitik optimum pada konsentrasi molase 0,1% sebagai karbon tunggal dengan aktivitas enzim fibrinolitik sebesar  $0,3254 \pm 0,0392$  Unit.mL-1.menit-1 pada suhu 28°C dengan waktu inkubasi 30 jam. Penelitian ini didukung dari hasil penelitian sebelumnya, yaitu menurut Qureshi et al. (2011), *Bacillus subtilis* EFRL 01 yang diproduksi menghasilkan protease maksimum dengan konsentrasi molase yang digunakan sebesar 1% sebagai sumber karbon tunggal. Selain itu, menurut hasil penelitian lain, didapatkan data bahwa molase sebagai media pertumbuhan *Bacillus subtilis* KO memberikan

pertumbuhan optimum pada 0,608-0,78 g/100 mL media broth dengan konsentrasi molase sebesar 10% w/v pada 24 jam dan suhu 45°C (Younis *et al.*, 2010).

### 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<sup>-1</sup>.menit<sup>-1</sup>.

### DAFTAR PUSTAKA

- Astrup, T. and Mullertz, S. (1952) 'The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 40(2), pp. 346–51. doi: 10.1016/0003-9861(52)90121-5.
- Dijl, J. M. Van and Hecker, M. (2013) 'Bacillus subtilis : from soil bacterium to super- secreting cell factory', *Microbial Cell Factories*, 12(3), pp. 1–6.
- Grata, K., Nabrdalik, M. and Latala, A. (2008) 'Effect Of Different Carbon Sources On Amylolytic Activity Of Bacillus spp . Isolated From Natural Environment', 2(2), pp. 2–5.
- Hardjono, S., Siswodihardjo, S., Pramono, P. and Darmanto, W. (2016) 'Quantitative structure-cytotoxic activity relationship 1-(benzoyloxy) urea and its derivative', *Current drug discovery technologies*. Bentham Science Publishers, 13(2), pp. 101–108.
- Hubert, O. (2006) *The molasses*. Berlin: Biotechnologie-Kempe GmbH.
- 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.
- Nascimento, T. P., Sales, A. E., Porto, C. S., Marcos, R., Brandão, P., Maria, G., Takaki, C., Antônio, J., Teixeira, C., Porto, T. S., Lúcia, A. and Porto, F. (2015) 'Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from Mucor subullissimus UCP 1262 in Solid-State Fermentation', *Advances in Enzyme Research*, 3(September), pp. 81–91. doi: 10.4236/aer.2015.33009.
- 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.
- Pandee, P., H-Kittikul, A., Dissara, Y., Ohsugi, M., Dissara, Y., Masahiro, O., Dissara, Y., Ohsugi, M., Dissara, Y., Masahiro, O. and Dissara, Y. (2008) 'Production and properties of a fibrinolytic enzyme by Schizophyllum commune BL23', *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(4), pp. 447–453.
- Pangesti, N. W. I. and Pangestuti, A. (2012) 'Pengaruh penambahan molase pada produksi enzim xilanase oleh fungi Aspergillus niger dengan substrat jerami padi', *Bioteknologi Biotechnological Studies*, 9(2), pp. 41–48.
- Qureshi, A. S., Bhutto, M. A., Khushk, I. and Dahot, M. U. (2011) 'Optimization of cultural conditions for protease production by Bacillus subtilis EFRL 01', *African Journal of Biotechnology*, 10(26), pp. 5173–5181. doi: 10.5897/AJB09.1574.
- Raut, S., Sen, S. K., Kabir, N. A., Satpathy, S. and Raut, S. (2012) 'Isolation and characterization of protease producing bacteria from upper respiratory tract of wild chicken', 8(7), pp. 6–10.
- Rovati, J. I., Delgado, O. D., Figueroa, L. I. C. and Fariña, J. I. (2010) 'A novel source of fibrinolytic activity: Bionectria sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina)', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), pp. 55–62. doi: 10.1007/s11274-009-0142-z.
- Vijayaraghavan, P., Gnana, S. and Vincent, P. (2013) 'A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye', *Journal of Biochemical ...*, 4, pp. 628–630. Available at: <http://jbiochemtech.com/index.php/jbt/article/viewArticle/jbt419>.
- 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.
- Zu, X., Zhang, Z., Che, H., Zhang, G. and Li, J. (2010) 'Thrombolytic Activities of Nattokinase Extracted from Bacillus Subtilis Fermented Soybean Curd Residues', *International Journal of Biology*, 2(2), pp. 120–125. Available at: [www.ccsenet.org/ijb](http://www.ccsenet.org/ijb).