

IDENTIFIKASI 16S rRNA DAN UJI ZIMOGRAFI BAKTERI ASAL PANTAI PAPUMA PENGHASIL ENZIM FIBRINOLITIK SEBAGAI ANTI ATHEROTHROMBOSIS

¹Pananjung, A.S,¹Novanda asri I, ²M Mirza Nuryady,¹Evi Umayah Ulfa*

¹ Fakultas Farmasi, ²Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Jember
Email: eviulva@gmail.com

Abstract

Atherotrombosis is a disease caused by a blood clot (thrombus) in a blood vessel, and it can be the leading cause of death in the world. Atherotrombosis disease can be overcome with thrombolytic agents, one of which is a fibrinolytic enzyme but it has a expensive price, so we need to looking for a new fibrinolytic agent in this case the bacteria, from Papuma coastal. This research is a follow-up from past research, to identify the bacteria from papuma by using 16S rRNA, and to know the Enzyme activated by using Zymografi. The result of this research is, the bacteria identification by 16S rRNA is similar with Microbacterium testaceum with similarity percentage is about 97%. This bacteria is positive fibrinolytic bacteria it can showed by the result of Zymografi test, there is a one white band on zymografi gel, and because the protein marker on zymografi gel is unseen, so we just used the qualitative observation.

Keywords: Atherotrombosis, fibrinolytic, 16s rRNA, Bacteria Identification, Zimografi.

1. PENDAHULUAN

Atherotrombosis adalah penyakit yang disebabkan oleh terjadinya pembekuan darah (trombus) pada pembuluh darah sehingga menyebabkan terjadinya oklusi. Penyakit ini merupakan penyebab kematian utama di dunia. Penyakit atherotrombosis ini dapat diatasi dengan agen trombolitik, salah satunya adalah enzim fibrinolitik. Mekanisme kerja enzim fibrinolitik yaitu menghidrolisis fibrin yang menyebabkan bekuan darah (Escobar *et al.*, 2002). Enzim fibrinolitik yang digunakan saat ini memiliki harga yang mahal (Arunachalam dan Aiswarya, 2011). Agen fibrinolitik umumnya merupakan bakteri, sehingga dilakukan eksplorasi bakteri perairan yang memiliki aktivitas fibrinolitik dari pantai papuma Jember.

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yaitu, untuk mengidentifikasi isolat bakteri penghasil enzim fibrinolitik dengan menggunakan analisis rangkaian

PCR 16S rRNA dan juga untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies bakteri. Keunggulan PCR dalam hal kecepatan, spesifisitas dan sensitifitasnya dalam mendeteksi suatu mikroorganisme, menjadikan teknik ini sebagai 'method of choice' (Koesharyani *et al.*, 2003).

Untuk mengetahui berat molekul dari enzim yang berpotensi sebagai fibrinolitik di analisis dengan uji zymografi. Zimografi adalah teknik elektroforesis untuk menetapkan aktivitas enzim secara insitu. Metode zimografi bersifat mudah, sensitif, dan kualitatif dalam menganalisa aktivitas enzim (Leber & Balkwill 1997). Sementara itu, elektroforesis dengan teknik zimografi juga bertujuan mendeteksi aktivitas enzim proteolitik secara langsung.

2. METODE

Penelitian ini dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Farmasi, Laboratorium mikrobiologi dan biomol Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, laboratorium mikrobiologi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, dan Laboratorium Biosains Politeknik Negeri Jember. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan februari - juli 2014.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah Media Nutrient Broth, Bacto agar, PBS, skim milk, Agarose, TEMED, APS, Buffer Sampel, Buffer loading, Primer 27F, 907R, 533F, dan 1492R, EtBr, Lisozim, TBE, Taq Polimerase, PCR Master mix, Akrilamid, membran dialisis, dan Amonium sulfat.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri steril, jarum inokulasi, lampu Bunsen, labu Erlenmeyer, gelas objek, gelas penutup, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet, mikropipet dan tip, 1 set alat isolasi dna genom, PCR, Running elektroforesis, SDS PAGE, sentrifuse, LAF, magnetic stirrer, 1 set alat zymografi.

Isolasi genom

Isolasi genom dilakukan dengan metode lisis alkali dengan enzim lysozim. Koloni tunggal dari media LB padat ditumbuhkan pada media LB cair dan diinkubasi pada shaker ± 16 jam pada suhu ruang (± 37°C). Kultur cair yang diambil 1000 µl dan dimasukkan dalam eppendorf dan disentrifus selama 5 menit, 4°C pada 13.000 rpm kemudian diambil peletnya. Perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 350µl buffer STE kemudian disentrifugasi selama 5 menit, 4°C, pada 5000rpm. Pelet ditambahkan dengan 25µl enzim lysozim kemudian divortex dan inkubasi pada 37 °C selama 1jam. Ditambahkan 200µl buffer lisis dan 100µl PCI lalu resuspensi dan sentrifugasi pada 13.000rpm, 4°C selama 10 menit. Lapisan atas yang diperoleh ditampung dalam eppendorf baru dan dicatat volumenya. Supernatan ditambahkan Na Asetat

sebanyak 0,1 kali volume yang diperoleh dan Etanol 2 kali volume. Resuspensi dan inkubasi pada -20 selama 2jam.Sentrifugasi pada 13.000rpm, 4 °C selama 10 menit.Selanjutnya ditambahkan dengan 500µl etanol 70%. Resuspensi dengan cara membolak-balik kemudian sentrifugasi 13.000rpm, 4 °C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan dikeringkan lalu ditambahkan 50µl buffer TE.

Kualitas DNA genom dapat dilihat melalui elektroforesis.

PCR DNA pengkode 16S rRNA

Isolat bakteri yang terlihat pita DNA genomnya diamplifikasi dengan menggunakan primer DNA pengkode 16s rRNA yaitu 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'), 533F (5' GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3') dan 907R (5' CCG TCA ATT CMTTTG AGT TT 3'), 1492R (5' GGT TACCTT GTT ACG ACT T 3') (Lane,1991). PCR dilakukan dengan mereaksikan 15 µl aquabidest steril, 25 µl 2x PCR Master mix (Qiagen Kit), 1,25µl forward primer (10 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl),1,25 µl reverse primer (10 pmol/µl, konsentrasi akhir 0,25 pmol/µl) dan 2 µl ekstrak DNA.Suhu denaturasi 98°C dalam 5menit dan 95 °C dalam 35 detik ; annealing dengan suhu 55°C selama 35 detik dan elongasi pada suhu 72°C dalam 90 detik. Total siklus 35 kali.

Purifikasi DNA Hasil PCR

Purifikasi hasil PCR dilakukan melalui pemotongan gel agarose yang mengandung pita DNA hasil PCR. Pemotongan gel ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dimasukkan dalam eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan 200 µl buffer NT. Sampel diinkubasi selama 5-10 menit pada 50°C kemudian divortex dengan kuat. Sampel dimasukkan dalam kolom NucleoSpin Extract II yang sebelumnya telah ditempatkan pada tabung koleksi (2ml) kemudian sentrifugasi. Kemudian µl buffer NT3 (buffer pencuci) ditambahkan ke dalam kolom NucleoSpin Extract II dan disentrifugasi pada 11.000 x g selama 1 menit sampai semua buffer pindah ke tabung koleksi.

Analisis data sekuen DNA pengkode 16S rRNA

BLAST NCBI

Penentuan urutan DNA murni (sekuensing) dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil purifikasi dari produk ke Laboratorium Biomolekuler Fakultas Sainstek UIN Malang. Bioedit software (Tom HALL , Ibis Therapeutics) digunakan untuk analisis data kasar hasil sekuensing dan selanjutnya data yang telah diolah di dicocokkan dengan data di gene bank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> yang akan menunjukkan kekerabatan spesies tersebut secara genetic (*Phylogenetic Tree*).

Penentuan aktivitas enzim dan bobot molekul (BM) dengan zimografi

Analisis zimografi dilakukan untuk mengetahui band protein manakah yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis substrat. Sebelum analisis zimografi dilakukan produksi enzim dan presipitasi enzim menggunakan amonium sulfat.

Produksi ekstrak kasar protein dari isolat bakteri asal pantai papuma jember dilakukan pada waktu mendekati puncak fase logaritmik yaitu jam ke-36. Ekstrak protein kasar hasil dari produksi selama waktu 36 jam, dipresipitasi dengan Amonium Sulfat menggunakan konsentrasi 80%.

Larutan enzim yang dihasilkan dari proses sentrifugasi dengan ammonium sulfat masih mengandung garam, sehingga perlu dimurnikan lebih lanjut. Proses pemurnian selanjutnya adalah dialisis. Dialisis dilakukan untuk menghilangkan molekul-molekul yang berukuran kecil dari enzim (dalam hal ini adalah ammonium sulfat). Enzim yang telah diendapkan, dilarutkan dengan larutan buffer fosfat 50 mM pH 7.4. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan dan disuspensikan dengan buffer yang sama, didialisis selama semalam pada kondisi dingin.

Dialisat yang diperoleh selanjutnya di tentukan aktivitasnya dengan zimografi. Penentuan aktivitas enzim dan BM enzim dilakukan menggunakan metode zimografi. Mekanismenya sama seperti SDS-PAGE hanya saja pada gel pemisah ditambahkan suatu substrat yaitu kasein, yang akan berpolimerisasi dengan akrilamida. Komposisi gel elektroforesis yaitu dengan gel penahan sebesar 4% dan gel pemisah 10%. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel, sampel dicampur dengan bufer sampel (rasio 1:4). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt dan 50 A selama 1,5 jam. Setelah pemisahan elektroforesis, enzim direnatirasi kembali dalam larutan Tween 20 2,5% v/v sambil digoyangkan selama satu jam. Digesti dilakukan dalam buffer fosfat 50Mm pH 8.0 pada suhu 60°C, 30 menit.Selanjutnya gel diwarnai dengan larutan pewarna 10 menit dan dilunturkan dengan larutan peluntur berulang kali hingga didapatkan pita enzim proteolitik berwarna putih dengan latar gel biru.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini memiliki aktivitas proteolitik dan aktivitas fibrinolitik yang diuji menggunakan metode *fibrin plate assay* dan diperoleh dari Pantai Papuma Jember. Kemampuan dalam menghidrolisis protein dan fibrin mengindikasikan bahwa isolat bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim fibrinolitik. Kemampuan menghasilkan fibrinolitik ini dapat dimanfaatkan dalam pencarian agen fibrinolitik dari mikroorganisme asal perairan Indonesia. Karena pentingnya isolat

tersebut sebagai agen fibrinolitik maka isolat tersebut perlu dikarakterisasi lebih lanjut. Karakterisasi disini adalah mengidentifikasi isolat dengan memanfaatkan sekuen 16S rRNA sebagai kunci identifikasi dan uji Zymografi untuk menguji aktivitas isolate bakteri.

Isolasi DNA genom

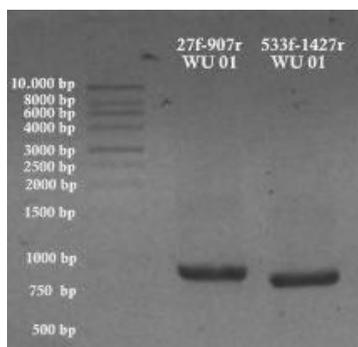
isolasi DNA genom sebagai templat dengan menggunakan metode lisis alkali yaitu menggunakan enzyme lysozyme. Prinsip metode ini yaitu isolasi DNA genom dilakukan dengan cara melisis sel dengan *enzyme lysozyme* diharapkan sel akan pecah dan DNA genom keluar dari sel. Hasil isolasi DNA genom yang ditunjukkan pada gambar 5.1 memperlihatkan adanya satu pita DNA yang menunjukkan adanya DNA genom hasil isolasi.



Gambar 1.1 Isolasi DNA Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai Papuma Jember

PCR DNA pengkode 16s rRNA

DNA genom hasil isolasi digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA. Primer yang digunakan untuk amplifikasi ada dua pasang yaitu 27 f (5' AGA GTT TGA TCM TGG GTC AG 3') dan 907 r (5' CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT 3') serta pasangan primer yang kedua yaitu 533 f (5' GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3') dan 1427r (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Konfirmasi hasil PCR 16S rRNA menggunakan buffer TBE 1X , 1% gel agarosa. Hasil 16S rRNA ditunjukkan pada gambar 1.2



Gambar 1.2 Elektroforegram PCR 16S rRNA Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai Papuma Jember

Hasil PCR dengan menggunakan primer 1 dan 2 pada kondisi denaturasi 98°C dalam 5menit dan 95 °C dalam 35 detik ; annealing dengan suhu 55°C selama 35 detik dan elongasi pada suhu 72°C dalam 90 detik. menunjukkan bahwa DNA pengkode 16S rRNA berhasil di amplifikasi dengan produk PCR berkisar 900 pb. Hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA terlihat jelas dan tidak ada mixing bands (pita yang tercampur), selanjutnya dilakukan pemurnian produk hasil PCR.

Purifikasi DNA Hasil PCR

Purifikasi DNA hasil PCR menggunakan PCR clean – up Gel Extraction Nucleospin® Extract II. Tahapan purifikasi dilakukan sesuai dengan prosedur yang terdapat dalam metode. Purifikasi bertujuan memurnikan produk PCR yang diperoleh dari pengotor yang mungkin ada pada produk PCR. Hasil purifikasi kemudian diuji dengan elektroforesis gel agarosa. Purifikasi hasil PCR 16S rRNA ditunjukkan pada gambar 1.3



Gambar 1.3 Elektroforegram Hasil Purifikasi PCR 16S rRNA Isolat Bakteri Asal Perairan Pantai Papuma

Analisis data sekuen DNA pengkode 16s rRNA BLAST NCBI

Hasil analisis urutan DNA melalui program pelacakan database *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *National Center for Biotechnology Information*, National Institute for Health, USA (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) menunjukkan sekuen DNA pengkode 16S rRNA isolat bakteri memiliki kesamaan tertinggi dengan sekuen DNA pengkode 16S rRNA dari *Microbakterium testacum*, sekuen 16S rRNA isolate bakteri menunjukkan nilai total pasangan nasa (*total score*) 460, nilai kesamaan pasangan basa (*max score*) 230, presentase analisis keseluruhan (*query coverage*) 97% (Gambar 1.4).

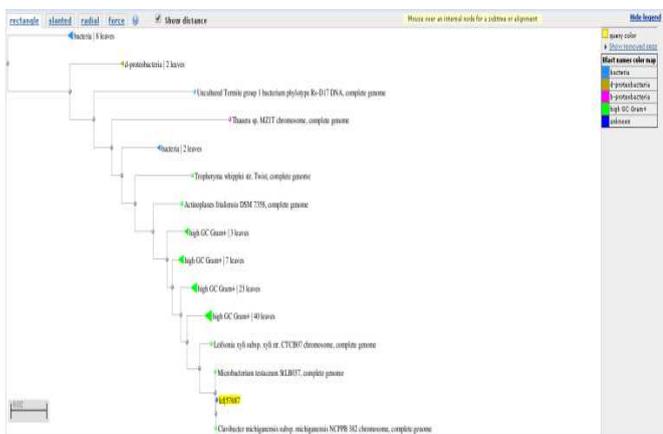
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

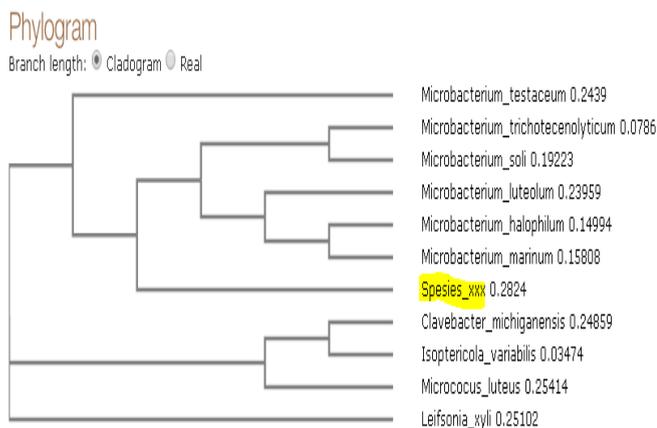
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Microbacterium testaceum SL6307, complete genome	290	460	20%	2e-57	97%	NC_015125.1
Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NC_2799_382, chromosome, complete genome	226	452	20%	3e-56	97%	NC_009490.1

Gambar 1.4 Hasil BLAST bakteri yang memiliki kemiripan tertinggi dengan isolate bakteri E-Fibrin berdasarkan urutan sekuen 16S rRNA

Rekonstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan dengan menggunakan program BLAST ditunjukkan pada gambar 1.5.



Gambar 1.5 Pohon filogenetik yang menunjukkan hubungan kekerabatan isolate bakteri dengan bakteri yang terdapat di Gene Bank.



Gambar 1.6 Pohon filogeni yang menunjukkan hubungan kekerabatan isolate dengan spesies *microbacterium* lainnya

Hasil rekonstruksi belum dapat menunjukkan kemiripan dari segi morfologi dan karakteristik biokimia sehingga dilakukan analisis pohon filogeni

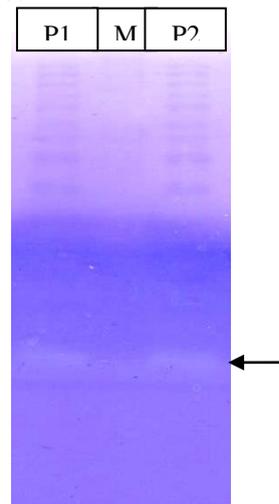
dengan menyamakan beberapa spesies dari genus *Microbacterium*.

Dibandingkan dengan 6 spesies *Microbacterium* lainnya, isolate bakteri ini memang dikelompokkan dalam satu cabang filogeni yang sama dengan spesies bakteri dari genus *Microbacterium* yang lainnya. Hasil ini perlu dilakukan pengulangan sekuensing minimal tiga kali untuk meminimalisir terjadinya kesalahan pembacaan urutan basa nukleotida dari sekuen DNA pengkode 16S rRNA yang diteliti. Juga perlu dilakukan pengujian fenotiping, dan biokimia untuk dapat mendukung hasil diatas.

Penentuan aktivitas enzim

Penentuan aktivitas enzim dan berat molekul protein kasar dari bakteri asal pantai papuma jember dilakukan dengan cara analisis zimografi. Analisis zimografi merupakan salah satu teknik elektroforesis yang bertujuan untuk mendeteksi aktivitas enzim proteolitik secara langsung. Gel yang digunakan adalah gel poliakrilamida yang dikombinasikan dengan suatu detergen sodium dodesil sulfat (SDS). Metode ini digunakan untuk memisahkan dan meneliti jumlah dan ukuran (berat molekul) rantai protein dan rantai subunit protein. Pada zimografi, gel pemisah ditambah dengan substrat protein, yang dalam hal ini adalah casein. Substrat tersebut akan berpolimerisasi dengan akrilamida.

Hasil pengujian zimografi menunjukkan adanya satu pita bening yang terbentuk pada sampel protein enzim. Bobot molekul pita yang memiliki aktivitas peoteolitik belum dapat diketahui karena marka protein nampa. Hasil pengujian zimografi dapat dilihat pada gambar 1.7.



Gambar 1.7 Hasil zimografi protein ekstrak kasar dari isolate bakteri

Pita protein yang didapat dari hasil elektroforesis ini menunjukkan pita yang tipis, diduga karena konsentrasi protein sangat rendah. Konsentrasi protein berpengaruh pada ketebalan pita protein pada hasil

elektroforesis. Tebal tipisnya pita protein yang terbentuk pada hasil elektroforesis menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sesuai dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yaitu molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik. Molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Sudarmadji, 1996).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa DNA pengkode 16S rRNA isolat bakteri fibrinolitik asal pantai Papuma Jember berhasil diisolasi dan ditentukan urutan DNANYA. Hasil komparasi dengan data di gene bank spesies tersebut berkerabat dekat dengan spesies bakteri *Microbacterium testaceum* dengan tingkat kesamaan gennya 97%, dan dari hasil pohon filogenetik memang bakteri ini berkerabat dekat dengan beberapa spesies dari genus *Microbacterium*. Hasil Zimografi menunjukkan adanya pita putih pada gel yang mengindikasikan bakteri tersebut memproduksi enzim pendeградasi substrat (protein).

Proses identifikasi dengan menggunakan 16S rRNA harusnya dilakukan pengulangan sekuensing minimal tiga kali untuk meminimalisir terjadinya kesalahan pembacaan urutan basa nukleotida dari sekuen DNA pengkode 16S rRNA yang diteliti. Juga perlu dilakukan pengujian fenotiping, dan biokimia untuk dapat mendukung hasil diatas. Untuk pengujian zimografi hendaknya menggunakan marker yang spesifik untuk pengujian zimografi, sehingga setelah dilakukan pengujian dapat dilakukan pengamatan secara semi kuantitatif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis ucapkan terimakasih kepada pihak DIKTI (Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Indonesia) yang telah memberikan bantuan dana hibah terhadap penelitian ini. Pihak rektorat Universitas Jember, serta kepada dosen pembimbing PKM Evi Umayah Ulfa, M.Si., Apt. yang telah banyak membimbing dan memberi arahan dalam penelitian ini.

5. REFERENSI

Arunachalam, C., & Aiswarya, W. 2011. Microbial Fibrinolytic Enzymes- A Deity for Thrombolysis. *Advanced Biotech.*, 10 (9): 8-11.

Collen, D., & Lijnen, H. R. 1994. Staphylokinase a Fibrin-Specific Plasminogen Activator with Therapeutic Potential. *Blood*, 84 (3): 680-686.

Djaja, S., Suwandono, A & Soemantri,. 2003. Pola penyakit penyebab kematian di perkotaan dan pedesaan di Indonesia, Studi Mortalitas Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2001. *J Kedokteran Trisakti*. 22(2).

Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2001. *J Kedokteran Trisakti*. 22(2).

Meyrath, J. & Volavsec, U. 1975. *Production and Microbial Enzyme*, in *Food Processing* edited by Reed G. New York: Academic Press.

Meyrath, J. & Volavsec, U. 1975. *Production and Microbial Enzyme*, in *Food Processing* edited by Reed G. New York: Academic Press.

Setiawan, A. 2013. "Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember," Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Biologi FMIPA Universitas Jember.

Setiawan, A. 2013. "Skrining Agen Fibrinolitik Isolat Bakteri dari Perairan Pantai Papuma Kabupaten Jember," Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jember: Biologi FMIPA Universitas Jember.

World Health Organization. 2008. *The World Health Report 2008: Primary Health Care Now More Than Ever*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication

World Health Organization. 2008. *The World Health Report 2008: Primary Health Care Now More Than Ever*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication