



## Effect of pH, Temperature, and Metal Activator on The Activity of Fibrinolytic Enzymes Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Ts 6.4

Pengaruh pH, Suhu, dan Aktivator Logam Terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik yang dihasilkan *Pseudomonas Aeruginosa* Ts 6.4

Siti Halima Hanum<sup>1)</sup>, Achmad Toto Poernomo<sup>1)\*</sup>, Sudjarwo Sudjarwo<sup>1)</sup>, Shofiatur Rosyidah<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pharmaceutical Science, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

\*Corresponding author

E-mail: [achmad-t-p@ff.unair.ac.id](mailto:achmad-t-p@ff.unair.ac.id)

Article History:

Received: February 17, 2022; Revised: April 1, 2022; Accepted: May 22, 2022; Online: June 30, 2022

### ABSTRACT

Fibrinolytic enzymes were found in several microorganisms, including *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4, which was isolated from sea cucumbers (*Paracaudina australis*). Sea cucumbers possessed many pharmacological activities, such as antithrombotic and antihyperlipidemic effects. In addition, fibrinolytic enzymes had been identified in *Stichopus japonicus*, one of the sea cucumber species. The activity of fibrinolytic enzymes was influenced by pH, temperature, activators, inhibitors, and the concentration of enzyme-substrate. This study aimed to determine the pH and optimum temperature of fibrinolytic enzyme activity of *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4. The optimum pH was achieved at pH 5-6, while the optimum temperature was reached at 50°C. The effect of the addition of metal activators CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and CoCl<sub>2</sub> on the activity of fibrinolytic enzymes was also studied. The results showed that the fibrinolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 was affected by Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Co<sup>2+</sup>.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4, Fibrinolytic Enzyme Activity, pH, Temperature, Metal activator

### ABSTRAK

Enzim fibrinolitik ditemukan pada beberapa mikroorganisme, termasuk *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 yang diisolasi dari teripang (*Paracaudina australis*). Teripang memiliki banyak aktivitas farmakologis seperti antitrombotik dan antihyperlipidemi. Selain itu, *Stichopus japonicus* salah satu spesies teripang terbukti mengandung enzim fibrinolitik. Aktivitas enzim fibrinolitik dipengaruhi oleh pH, suhu, aktivator, inhibitor, dan konsentrasi enzim-substrat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pH dan suhu optimum aktivitas enzim fibrinolitik dari *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4. pH optimum dicapai pada pH 5 - 6, sedangkan suhu optimum dicapai pada 50°C. Efek dari penambahan aktivator logam CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> pada aktivitas enzim fibrinolitik juga telah diteliti. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas fibrinolitik *Pseudomonas aeruginosa* TS 6. dipengaruhi oleh Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, dan Co<sup>2+</sup>.

Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4, Aktivitas enzim fibrinolitik, pH, Suhu, Aktivator logam

### PENDAHULUAN

Enzim fibrinolitik merupakan salah satu enzim golongan protease yang dapat digunakan untuk memecah bekuan fibrin. Enzim protease dibagi menjadi empat family yakni protease serin, protease aspartat, protease serin, dan metalloprotease (Kotb, 2012). Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain suhu, pH, dan aktivator. pH berpengaruh terhadap kecepatan aktivitas enzim dalam mengkatalisis suatu reaksi. Hal ini disebabkan konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi struktur dimensi enzim dan aktivitasnya. Bila konsentrasi ion hidrogen berubah dari konsentrasi optimal, aktivitas enzimatik secara progresif hilang sampai pada akhirnya

menjadi tidak fungsional. pH merupakan faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim. Enzim dapat berbentuk ion positif, ion negatif, atau zwitter ion. Aktivitas masing-masing berada pada daerah stabilitas pH optimal. Sebagian besar enzim intrasel memiliki aktivasi optimal pada pH 5,0-9,0. Perubahan ionisasi juga dapat dialami oleh substrat atau kompleks enzim-substrat, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Noviyanti et al., 2013)

Suhu juga memiliki peran penting untuk menunjang aktivitas optimal dari enzim. Apabila suhu semakin dinaikkan pada satu titik enzim akan menjadi tidak stabil dan mulai mengalami denaturasi. Apabila digambarkan pada suatu kurva adanya denaturasi dapat dilihat dari

Cite this as Hanum, S. H., Poernomo, A. T., Sudjarwo, S., and Rosidah, S. (2022) 'Effect of pH, Temperature, and Metal Activator on The Activity of Fibrinolytic Enzymes Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Ts 6.4', *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 9(1), pp. 9-12. DOI: 10.20473/bikfar.v9i1.40890



Copyright: ©2022 by the authors. Submitted for possible open-access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA) license

kurva yang mulai menurun, biasanya kurva yang dihasilkan merupakan puncak asimetris hal ini disebabkan karena pada saat kenaikan suhu kurva menaik relatif lambat, namun pada saat terjadi denaturasi kurva akan menurun secara signifikan. Dari penjabaran tersebut dapat disimpulkan bahwa pada suhu rendah reaksi kimia akan berjalan lambat namun pada suhu tinggi secara umum reaksi kimia berjalan cepat. Dengan demikian apabila enzim bekerja pada suhu optimum kecepatan reaksi enzimatik adalah maksimum. Namun bila enzim bekerja pada suhu melewati suhu optimumnya dapat menyebabkan terjadinya denaturasi enzim sehingga menurunkan kecepatan reaksi (Dennison, 2002; Wuryanti, 2004).

Ion logam umumnya berperan sebagai aktivator atau inhibitor enzim yang mempengaruhi kerja enzim pada sisi aktif katalitiknya. Biasanya enzim hanya akan aktif jika ada kofaktor (Sajuthi et al., 2010). Logam tersebut membantu reaksi katalitik dengan cara mengikat substrat pada sisi pemotongan selain berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat, beberapa logam juga dapat mengikat enzim secara langsung untuk menstabilkan konformasi aktifnya atau menginduksi formasi sisi pengikatan atau sisi aktif suatu enzim. Mekanisme ion logam dapat memperbesar aktivitas enzim yaitu dengan menjadi bagian integral dari sisi aktif, merubah konstanta kesetimbangan dari reaksi enzimatik, merubah muatan listrik, mengusir ion inhibitor, dan menukar ion yang kurang efektif pada sisi aktif enzim atau substrat (Baehaki and Budiman, 2011). Untuk memaksimalkan aktivitas enzim, maka penting untuk diketahui, pH, suhu optimum serta aktivator yang dapat memberikan aktivitas optimal. Oleh sebab itu, pada penelitian ini, akan dilakukan karakterisasi dari *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 sebagai bakteri penghasil enzim fibrinolitik.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan

*Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 hasil isolasi dari teripang, nutrient broth®, nutrient agar®, skim milk agar, fibrin bovine blood Simagchem®, aquadest, NaCl, agarose, methylene blue, buffer phosphate, Nattokinase, divalent metals as acivators (CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ZnCl<sub>2</sub>, dan CoCl<sub>2</sub>. (Sigma)).

### Uji Aktivitas Proteolitik

Aktivitas proteolitik diukur dalam media agar susu Skim. Media SMA mengandung 10 mg bubuk susu skim dan 1,5 gram agar yang dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Tujuh sumur yang dibuat di pelat SMA menggunakan tabung kapiler. Sekitar 20 µL suspensi bakteri ditempatkan di setiap sumur dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Zona jelas hidrolisis skim telah muncul dari sampel yang memproduksi protease. Diameter zona bening diamati dan diukur.

### Uji Aktivitas Fibrinolitik

Aktivitas fibrinolitik diukur dengan metode plat fibrin. Pelat fibrin terdiri dari 0,3 g fibrin dan 2 g agar dalam 100 mL dapar fosfat (pH 7,8). Tiga sumur dibuat pada pelat fibrin menggunakan tabung kapiler. Sekitar 20 µL larutan enzim ditempatkan di setiap sumur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas fibrinolitik diamati dengan mengukur zona transparan.

Zona transparan menunjukkan degradasi fibrin. Semua percobaan dilakukan tiga kali (dimodifikasi dari Ashipala dan He, 2008).

### Uji Aktivitas Enzim terhadap Pengaruh pH dan Suhu

Optimasi pH sedang dilakukan dengan mempertahankan pH menggunakan buffer fosfat 0,1 M (5,0-8,0). Larutan enzim dicampur dengan phosphate buffer. Tiga sumur dibuat pada pelat fibrin menggunakan tabung kapiler. Sekitar 20 µL larutan enzim ditempatkan di setiap sumur dan diinkubasi pada berbagai suhu (40-80°C) selama 24 jam.

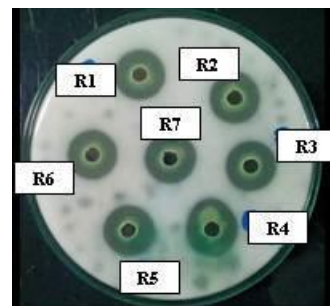
### Uji Aktivitas Enzim terhadap Pengaruh Aktivator Logam

Pengaruh aktivator logam dilakukan dengan mencampur larutan enzim dan larutan logam 0,05 M. Larutan ditempatkan dalam media fibrin dan diinkubasi pada suhu optimum selama 24 jam. Aktivator logam yang digunakan adalah CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> ZnCl<sub>2</sub>, dan CoCl<sub>2</sub>.

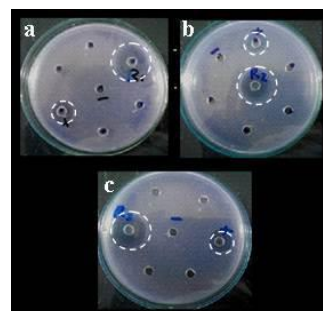
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil Uji Aktivitas Proteolitik

Hasil yang didapat menunjukkan hasil positif karena terbentuk zona jernih disekitar sumur sehingga enzim fibrinolitik yang dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 dapat dinyatakan memiliki enzim proteolitik. Indeks proteolitik diperoleh dari perbandingan diameter zona jernih dengan diameter sumur. Dari hasil perhitungan zona jernih didapatkan hasil rata – rata indeks fibrinolitik



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas Enzim Proteolitik pada Media (SMA) 10%



Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik pada Media Fibrin Plate (a) Rep. ke-1; (b) Rep. ke-2; (c) Rep. ke-3

*Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 sebesar  $2,47 \pm 0,04$ .

### Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik

Zona jernih yang terbentuk disekitar sumuran menunjukkan adanya aktivitas enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4. Indeks fibrinolitik didapatkan dengan membandingkan diameter zona jernih yang dihasilkan dengan diameter sumur yang

**Tabel 1.** Hasil Pengukuran Diameter Zona Jernih pada Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Item	Rata-rata
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TS 6.	3,47±0,04
Nattokinase (kontrol positif)	2,82±0,01

dibentuk seperti yang tertera (Tabel 1).

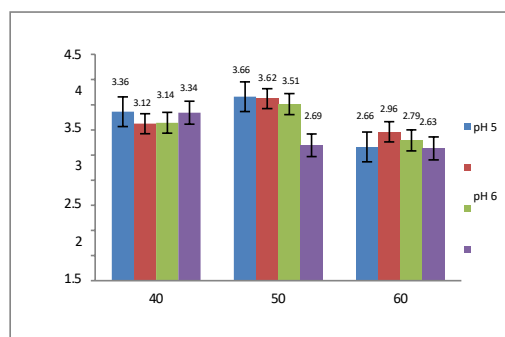
Dari hasil uji fibrinolitik menggunakan metode fibrin plate dengan penampak noda methylene blue didapatkan bahwa enzim fibrinolitik *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 memiliki aktivitas fibrinolitik lebih besar dari pada kontrol positif yakni nattokinase. Hal ini dapat dilihat dari rata-rata indeks fibrinolitik dimana *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 memiliki rata-rata sebesar 3,47±0,04 dan nattokinase memiliki rata-rata lebih kecil yakni 2,82±0,01. Enzim fibrinolitik *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 memiliki aktivitas untuk mendegrasi substrat fibrin 1,2 kali lebih besar dari pada nattokinase.

### Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik terhadap Pengaruh pH dan Suhu

Suhu dan variasi pH digunakan untuk menentukan suhu optimum adalah enzim fibrinolitik dalam kisaran

**Tabel 2.** Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik

pH	Suhu		
	40	50	60
Rata-rata Indeks Fibrinolitik ± SD			
5,0	3,36±0,09	3,66±0,12	2,68±0,03
6,0	3,12±0,00	3,62±0,06	2,96±0,08
7,0	3,14±0,06	3,51±0,01	2,79±0,02
8,0	3,34±0,11	3,69±0,02	2,63±0,01



**Gambar 2.** Diagram Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Fibrinolitik

40°C hingga 80°C dan pH 5 ke-8.

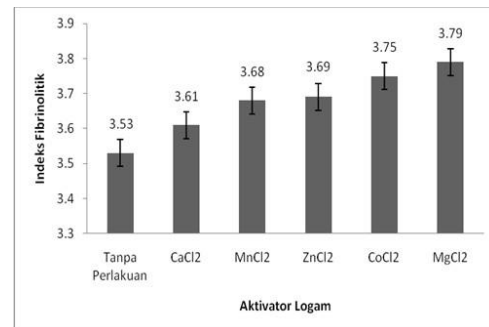
Pada hasil di atas dapat dilihat bahwa pada suhu 40°C dan 50°C, aktivitas tertinggi diperoleh pada pH 5 dengan rerata masing-masing 3,36 dan 3,66 (Tabel 2). Sedangkan pada suhu 60°C, aktivitas enzim fibrinolitik tertinggi dicapai pada pH 6,0 dengan rata-rata 2,96. Namun dari ketiga suhu (40°C; 50°C; dan 60°C) tersebut, suhu optimal untuk aktivitas enzim fibrinolitik dicapai pada suhu 50°C. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2 bahwa pada pH 5,0; 6,0; dan 7,0 terjadi peningkatan

aktivitas fibrinolitik sejalan dengan kenaikan suhu. Pada suhu 60°C dan 70°C tidak menghasilkan enzim fibrinolitik (Gambar 2).

Hasil ini juga didukung dengan analisa statistik menggunakan program SPSS two way ANOVA, di mana hasil mean difference untuk pH 5,0; 6,0; dan 7,0 adalah yang terbesar. Namun saat diuji dengan homogenous subset, pH 5,0; 6,0; dan 8,0 berada dalam satu kolom dan pH 7,0 dan 8,0 juga berada dalam satu kolom. Untuk suhu optimal juga ditunjukkan dengan nilai mean difference terbesar pada suhu 50°C, selain itu pada uji *homogenous subset*, suhu 50°C berada pada kolom yang berbeda dengan suhu 40°C dan 60°C. Dari pemaparan di atas, dapat ditarik kesimpulan bahwa aktivitas enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 optimal pada suhu 50°C dan pada pH 5,0 – 6,0.

### Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik terhadap Pengaruh Aktivator Logam

Enzim fibrinolitik dalam aktivitas mereka membutuhkan kofaktor tambahan. Sebagian besar enzim membutuhkan non-protein co-factor untuk katalisis. Kofaktor biasanya sebagai elemen jejak dengan konsentrasi kecil dapat meningkatkan aktivitas. Dalam penelitian ini, semua ion logam berasal dari klorida, bukan yang lain. Hal ini dihindari bahwa ionisasi selalu seragam dalam garam yang sama. Dalam pelaksanaan kation ditambahkan ke larutan enzim sehingga mendapat konsentrasi yang sama 0,05 M pada saat aktivitas enzim aktivitas fibrinolitik.



**Gambar 3.** Diagram Pengaruh Aktivator Logam pada Suhu Optimal terhadap Aktivitas Enzim Fibrinolitik

Pada hasil dapat dilihat bahwa aktivitas enzim fibrinolitik meningkat dengan adanya penambahan ion logam. Penambahan ion logam Ca<sup>2+</sup> terjadi peningkatan indeks fibrinolitik sebesar 1,02 kali, dimana pada kontrol memiliki indeks fibrinolitik 3,53 dan setelah penambahan ion Ca<sup>2+</sup> indeks fibrinolitik menjadi 3,61. Pada penambahan ion Mn<sup>2+</sup> dan Zn<sup>2+</sup> terjadi peningkatan indeks fibrinolitik sebesar 1,05 kali yakni masing – masing dari 3,53 menjadi 3,68 dan 3,69. Penambahan ion logam Mg<sup>2+</sup> dan Co<sup>2+</sup> juga memiliki hasil sama yakni terjadi peningkatan indeks fibrinolitik pada sebesar 1,08 kali dimana masing-masing memiliki nilai indeks fibrinolitik sebesar 3,79 dan 3,75 (Gambar 3).

Hasil ini juga didukung dengan analisa stastistika menggunakan program SPSS one way ANOVA dimana hasil means different terbesar adalah pada aktivator logam MgCl<sub>2</sub> dengan nilai 0,25. Pada uji homogenous subset menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna pada penambahan ion Mg<sup>2+</sup> dan Co<sup>2+</sup> yang memiliki nilai subset tertinggi, sehingga pada penambahan ion

logam Mg<sup>2+</sup> maupun Co<sup>2+</sup> menghasilkan aktivitas enzim fibrinolitik yang sama.

#### KESIMPULAN

Pada penelitian kali ini didapatkan perbedaan hasil pengaruh pH, suhu, dan penambahan aktivator logam terhadap aktivitas enzim fibrinolitik yang dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa* TS 6.4. Aktivitas Enzim fibrinolitik *pseudomonas aeruginosa* TS 6.4 optimum pada suhu 50°C pada pH 5 – 6, dan meningkat pada penambahan ion Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, dan Co<sup>2+</sup>. Peningkatan tertinggi didapat pada penambahan ion logam Mg<sup>2+</sup> dan Co<sup>2+</sup> karena aktivitas enzim dipengaruhi oleh logam, maka enzim digolongkan dalam kelompok metalloprotease.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Baehaki, A. and Budiman, A. (2011) 'Isolasi dan karakterisasi protease dari bakteri tanah rawa Indralaya, Sumatera Selatan' *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, XXII(1), pp.37-42.
- Dennison, C. (2013) *A Guide to Protein Isolation*, Springer Science & Business Media.
- Ekowati, J. and Diyah, N.W. (2013). 'Aktivitas antinosiseptif dan uji in silico terhadap cyclooxygenase dari asam p-metoksisinamat dan asam m-metoksisinamat' *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 2(1), pp.32-39.
- Kotb, E. (2012) *Briefs in Microbiology*, Springer Science & Business Media.
- Noviyanti, T., Ardiningsih, P. and Rahmalia, W. (2013) 'Pengaruh temperatur terhadap aktivitas enzim protease dari daun sansakng (*Pycnarrhena cauliflora* Diels)' *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1(1), pp.1-6.
- Sajuthi, D., Suparto, I., Yanti and Praira, W. (2010). 'Purifikasi dan pencirian enzim protease fibrinolitik dari ekstrak jamur merang', *Makara Sains*, 14(2), pp.145-150.
- Wuryanti (2004) 'Isolasi dan penentuan aktivitas spesifik enzim bromelin dari nanas (*Ananas comosus* L.)', *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, pp.83-87.