

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

*Cardiovaskular Disease* (CVDs) merupakan penyakit nomor satu yang menyebabkan kematian secara global. Salah satu penyebab CVDs adalah adanya ketidakseimbangan pada sistem hemostasis yang dapat menyebabkan hiperkoagulasi sehingga akan memicu terjadinya trombosis, yaitu kondisi dimana terbentuknya trombus pada pembuluh darah (York, 2013; Sun and Kroll, 2018). Trombus adalah suatu bekuan darah yang terdiri atas fibrin, trombin dan platelet (Fuentes *et al.*, 2014). Komponen utama dari bekuan darah adalah fibrin yang terbentuk melalui proses proteolisis oleh trombin (Akhtar, Hoq and Mazid, 2017). Pada kondisi normal tubuh manusia, bekuan fibrin akan dihidrolisis oleh plasmin menjadi produk degradasi fibrin untuk mencegah trombosis pada pembuluh darah. Namun pada kondisi patofisiologis yang tidak seimbang, proses hidrolisis ini tidak terjadi sehingga menyebabkan terjadinya trombosis (Kotb, 2013). Kondisi trombosis dapat diatasi dengan pemberian sediaan enzim fibrinolitik.

Sediaan enzim fibrinolitik merupakan agen trombolitik dan merupakan protease yang dapat mengkatalisis degradasi fibrin dengan cara mengubah proenzim plasminogen menjadi enzim aktif plasmin atau secara langsung mendegradasi fibrin sehingga trombus akan melarut (Kotb, 2013; Raju and Divakar, 2014). Sediaan enzim fibrinolitik yang biasa digunakan dalam pengobatan CVDs adalah urokinase, streptokinase dan t-PA (*tissue plasminogen activator*). Penggunaan klinis sediaan enzim fibrinolitik tersebut dinilai kurang efektif karena memiliki keterbatasan diantaranya spesifisitas fibrin yang rendah, waktu paruh kerja pendek, dan dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan seperti perdarahan pada gastrointestinal dan timbulnya reaksi alergi (Afifah *et al.*, 2014). Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif agen trombolitik dari sumber lain yang lebih aman dan lebih efektif (Raju and Divakar, 2014).

Agen trombolitik dapat bersumber dari mikroorganisme, hewan, maupun tanaman. Mikroorganisme utamanya bakteri merupakan penghasil enzim fibrinolitik yang paling besar (Kotb, 2012). Pengembangan enzim fibrinolitik dari sumber bakteri banyak

mendapat perhatian karena keragaman biokimia dan fisiologis bakteri dapat meningkatkan spesifisitas target dari protease fibrinolitik. Selain itu, bakteri mudah dikembangbiakkan dan dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan sumber agen trombolitik lain (Bajaj *et al.*, 2014). Penelitian-penelitian mengenai identifikasi bakteri penghasil enzim fibrinolitik sudah banyak dilakukan. Sebagai contoh penemuan enzim fibrinolitik nattokinase (NK) yang dihasilkan oleh *Bacillus natto* dan enzim fibrinolitik subtilisin DFE serta subtilisin DJ-4 yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquifaciens* (Peng, Yang and Zhang, 2005).

Agen trombolitik dari sumber bakteri juga dapat diperoleh dari strain *Acetobacter tropicalis*. *Acetobacter tropicalis* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat termotoleran karena dapat berkembang biak dengan baik hingga suhu 40°C sehingga banyak ditemukan pada daerah tropis seperti Indonesia (Lisdiyanti *et al.*, 2000; Matsutani *et al.*, 2011). *Acetobacter tropicalis* pada fase pertumbuhannya dapat menghasilkan protease yang dapat menghidrolisis ikatan peptida pada protein (Newell *et al.*, 2014). Penelitian oleh Park *et al* tahun 2012 melaporkan bahwa isolasi *Acetobacter* sp. FP1 dari hasil fermentasi pohon pinus (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) menunjukkan kemiripan dengan *Acetobacter tropicalis* NRIC 0312 berdasarkan data genotipe dan fenotipenya. Bakteri tersebut dilaporkan memiliki aktivitas fibrinolitik yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih sebesar 18 mm pada *fibrin plate*. Selain itu, pada pengujian efek protease inhibitor terhadap aktivitas fibrinolitik *Acetobacter* sp. FP1 menunjukkan hasil penghambatan protease serin sebesar 20% dan protease logam sebesar 40%. *Acetobacter* sp. FP1 teridentifikasi menunjukkan aktivitas fibrinolitiknya setelah dilakukan inkubasi pada media bakteri asam asetat selama 2 hari (Park *et al.*, 2012).

Selain dari bakteri, agen trombolitik juga dapat diperoleh dari tanaman. Obat-obatan yang berasal dari tanaman mengalami perkembangan pesat dalam sejarah pengobatan manusia. Tanaman mengandung banyak senyawa aktif biologis dengan berbagai macam struktur yang dapat dimanfaatkan dalam tujuan terapeutik (Hussain *et al.*, 2016). Beberapa senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman menunjukkan aktivitas dalam melarutkan gumpalan darah sehingga dapat dipertimbangkan sebagai pelengkap atau pengganti agen trombolitik (Fuentes *et al.*, 2014). Indonesia merupakan salah satu negara penghasil tanaman obat yang potensial. Penelitian mengenai potensi agen trombolitik pada tanaman asli Indonesia telah banyak dilaporkan diantaranya *Tamarindus indica*, *Ocimum sanctum* L., *Zanthoxylum budrunga*, *Curcuma longa* L.,

*Camellia sinensis*, *Allium sativum*, *Ananas comosus* dan *Lycopersicum esculentum* (Khan *et al.*, 2011; Al-Mamun *et al.*, 2012; Evangelista *et al.*, 2012; Sherwani *et al.*, 2013; Varadharajan, Shanmugam and Ramaswamy, 2015; Biswas *et al.*, 2017).

Tanaman lain dari Indonesia yang banyak dimanfaatkan dalam dunia kesehatan salah satunya adalah *Centella asiatica* atau dikenal dengan nama lokal pegagan. *Centella asiatica* telah diteliti memiliki berbagai macam bioaktivitas seperti antioksidan, antifungal, antifilarial dan antitumor. Kandungan senyawa bioaktif asam madekasat, asam asiatat, madekasosida dan asiatikosida pada *Centella asiatica* berperan penting dalam aktivitas farmakologinya (Zahara, 2014). Selain itu, adanya kandungan flavonoid pada *Centella asiatica* bermanfaat untuk mengurangi resiko CVDs dan berpotensi sebagai antitrombotik (Madhusudhan, Neeraja and Devi, 2014). Saat ini, *Centella asiatica* menjadi salah satu perhatian dalam mengembangkan alternatif pengobatan CVDs karena memiliki kemampuan dalam melarutkan trombus dan telah dibuktikan oleh beberapa penelitian (Rishikesh, Ghosh and Rahman, 2013; Hossain *et al.*, 2018; Karim *et al.*, 2018). *Centella asiatica* dapat melarutkan gumpalan trombus dengan persentase *clot lysis* sebesar 50,53% dan jika dibandingkan dengan standar streptokinase dengan persentase *clot lysis* 63,74% menghasilkan indeks trombolitik sebesar 79,28 (Rishikesh, Ghosh and Rahman, 2013). Penelitian lain oleh Biswas *et al* tahun 2017 melaporkan *Tamarindus indica* memiliki indeks trombolitik sebesar 41,36 (Biswas *et al.*, 2017). Jika dibandingkan dengan *Tamarindus indica* indeks trombolitik pada *Centella asiatica* memiliki nilai yang jauh lebih besar.

Berbagai komponen bioaktif pada tanaman telah banyak diisolasi dan diteliti aktivitas biologisnya. Namun sebagian komponen bioaktif tanaman membutuhkan proses biotransformasi dengan memanfaatkan mikroba agar menjadi senyawa yang memiliki aktivitas biologis. Salah satu metode yang dapat digunakan yaitu melalui proses fermentasi. Fermentasi adalah suatu proses penguraian oleh mikroorganisme untuk menghasilkan produk bioaktif baru. Proses fermentasi menyebabkan adanya modifikasi molekul pada komponen yang terkandung dalam tanaman sehingga dapat meningkatkan efek terapeutik dan mengurangi efek samping dalam penggunaan produk herbal (Hussain *et al.*, 2016). Dalam proses fermentasi, mikroorganisme dapat menghasilkan enzim yang berperan dalam menguraikan senyawa yang terkandung pada tanaman. Mikroorganisme juga dapat menggunakan kandungan senyawa pada tanaman sebagai substrat dan berinteraksi dengan metabolit sekunder pada tanaman untuk menghasilkan senyawa

bioaktif baru (Wu *et al.*, 2013). Pada proses fermentasi perlu memperhatikan beberapa faktor seperti kultur media mikroba, suhu fermentasi, pH media, jenis mikroba fermentasi dan waktu inkubasi (Hussain *et al.*, 2016).

Bakteri probiotik merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi proses fermentasi. Penggunaan bakteri probiotik pada proses fermentasi tanaman dapat meningkatkan aktivitas biologis suatu produk herbal (Hussain *et al.*, 2016). Bakteri probiotik adalah suatu bakteri yang dapat memberikan keuntungan bagi kesehatan apabila dikonsumsi dalam jumlah yang tepat (Yuniastuti, 2014). Bakteri probiotik yang banyak digunakan dalam proses fermentasi tanaman dan merupakan bakteri penghasil enzim fibrinolitik diantaranya *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* dan *Bacillus subtilis* (Jung and Lee, 2009; Thokchom and Joshi, 2014). Pada proses fermentasi, bakteri membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhannya sehingga penggunaan tanaman sebagai media fermentasi sangat bermanfaat karena kandungan karbohidrat, protein, vitamin dan mineralnya dapat menjadi sumber nutrisi bagi bakteri (Swain *et al.*, 2014). Selain itu, bakteri pada fase pertumbuhannya menghasilkan berbagai zat biologis seperti protease, amilase, selulase, esterase dan amidase yang berperan dalam proses biotransformasi pada saat fermentasi tanaman untuk menghasilkan suatu metabolit baru (Hussain *et al.*, 2016). Penelitian oleh Jeong, Rhee dan Kim tahun 2017 melaporkan hasil fermentasi serbuk ginseng oleh *Bacillus subtilis* menunjukkan peningkatan aktivitas fibrinolitik dengan persentase 85,0% sampai 100,0%. Peningkatan aktivitas fibrinolitik disebabkan oleh biotransformasi struktur ginsenosida karena ada proses penguraian gugus gula dari ginsenosida dengan struktur glikosida. Selain itu ginseng juga mengandung komponen-komponen yang sesuai sebagai media fermentasi (Jeong, Rhee and Kim, 2017). Penelitian lain oleh Agrebi *et al* tahun 2010 menggunakan serbuk umbi *Mirabilis jalapa* sebagai media fermentasi dalam menghasilkan enzim fibrinolitik karena menyediakan sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan *Bacillus amyloliquefaciens* An6 (Agrebi *et al.*, 2010).

Bakteri probiotik lain yang dapat dimanfaatkan dalam proses fermentasi dan merupakan penghasil enzim fibrinolitik yaitu *Acetobacter tropicalis* (Park *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2019). *Acetobacter tropicalis* bukan termasuk bakteri patogen sehingga aman digunakan dalam proses fermentasi (Saichana *et al.*, 2015). Bakteri tersebut merupakan bakteri asam asetat dan telah banyak digunakan dalam proses pembuatan cuka yang bermanfaat bagi kesehatan (Silhavy and Mandl, 2006). Penelitian oleh Lee, Jang dan Park

tahun 2016 menggunakan *Acetobacter tropicalis* untuk fermentasi *Allium cepa* L. dalam menghasilkan produk cuka bawang yang memiliki aktivitas antioksidan. Pemanfaatan *Acetobacter tropicalis* dalam proses fermentasi cuka bawang dinilai efektif karena dapat meningkatkan metabolit yang dihasilkan dengan waktu fermentasi yang lebih singkat (Lee, Jang and Park, 2016). Dalam proses fermentasi, dibutuhkan media yang sesuai untuk menumbuhkan bakteri sehingga metabolit yang dihasilkan akan maksimal. Dalam penelitian ini digunakan ekstrak daun *Centella asiatica* sebagai media fermentasi. Penelitian oleh Mertz *et al* tahun 2019 melaporkan bahwa daun *Centella asiatica* memiliki kandungan protein sebesar 21,9% dan karbohidrat sebesar 42,9% (Mertz *et al.*, 2019). Kandungan protein dan karbohidrat yang cukup besar pada daun *Centella asiatica* tersebut dapat digunakan sebagai sumber nitrogen dan karbon yang baik bagi pertumbuhan bakteri dan diharapkan dapat meningkatkan metabolit yang dihasilkan sehingga aktivitas trombolitik juga akan meningkat. Selain itu adanya aktivitas fibrinolitik pada *Acetobacter tropicalis* dan aktivitas trombolitik pada *Centella asiatica* diharapkan dapat meningkatkan kemampuannya dalam melarutkan trombus.

Dalam menentukan aktivitas trombolitik berbagai metode telah banyak dikembangkan untuk mengukur lisis bekuan darah. Salah satu metode yang banyak digunakan yaitu metode *clot lysis* (Prasad *et al.*, 2006). Metode *clot lysis* merupakan suatu metode untuk mengetahui kemampuan suatu bahan dalam melisiskan trombus dengan melihat banyak sedikitnya trombus yang terlisiskan selama waktu inkubasi yang telah ditentukan (Rohmah *et al.*, 2019). Kemampuan trombolitik diamati berdasarkan perbedaan berat trombus sebelum dan sesudah ditambahkan bahan uji kemudian dilakukan perhitungan untuk mendapatkan hasil persentase *clot lysis* dari suatu bahan (Prasad *et al.*, 2006). Persentase *clot lysis* yang diperoleh digunakan sebagai parameter untuk mengetahui aktivitas trombolitik suatu bahan.

Saat ini produk-produk kombinasi antara herbal dengan probiotik sudah mulai dikembangkan. Sebagai contoh fermentasi *virgin coconut oil* oleh *Lactobacillus plantarum* yang digunakan sebagai antibakteri dan fermentasi beras oleh *Monascus purpureus* menghasilkan monacolin K yang digunakan sebagai pelancar peredaran darah (Rahmadi *et al.*, 2013; Srianta, Widharna and Kardono, 2013). Walaupun sudah terdapat produk-produk kombinasi herbal dan probiotik, namun di Indonesia sendiri penelitian terkait hal tersebut masih jarang dilakukan dan penelitian terkait kombinasi agen trombolitik dari hasil fermentasi herbal oleh probiotik masih belum ada. Bahkan di luar

negeri penelitian mengenai kombinasi agen trombolitik dari tanaman dan probiotik juga masih jarang dilakukan. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk meneliti “Pengaruh proses fermentasi pada daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374 terhadap aktivitas trombolitik” sebagai langkah awal dalam pengembangan pengobatan alternatif CVDs yang lebih aman dan efektif.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah proses fermentasi pada daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374 dapat meningkatkan aktivitas trombolitik secara signifikan jika dibandingkan dengan ekstrak *Centella asiatica* yang tidak difermentasi?
2. Berapakah nilai indeks trombolitik dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ada atau tidaknya peningkatan aktivitas trombolitik yang signifikan setelah dilakukan proses fermentasi pada daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374.
2. Mengukur indeks trombolitik dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi kepentingan ilmu pengetahuan, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal mengenai aktivitas trombolitik dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter tropicalis* InaCC B374 sebagai dasar dalam pengembangan alternatif pengganti sediaan enzim fibrinolitik yang umum digunakan karena memiliki efek samping yang tidak diinginkan bagi tubuh.
2. Bagi masyarakat, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai produk herbal yang dapat digunakan sebagai alternatif dalam pengobatan penyakit kardiovaskular.