

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular merupakan gangguan fungsi normal jantung dan pembuluh darah yang meliputi penyakit jantung koroner, hipertensi, dan stroke (WHO, 2017). Salah satu faktor risiko penyakit kardiovaskular adalah terjadinya trombosis. Trombosis adalah adanya akumulasi gumpalan fibrin atau trombus di pembuluh darah (Chandrasekaran *et al.*, 2015). Dalam keadaan normal, untuk menghindari terjadinya trombosis, trombus dihidrolisis oleh plasmin. Namun, dalam kondisi yang tidak seimbang atau abnormal, trombus tidak terhidrolisis sehingga terjadilah trombosis (Kotb, 2013). Sehingga, untuk mencegah terjadinya trombosis, agen trombolitik dapat digunakan untuk melarutkan bekuan darah (Umesh *et al.*, 2014). Selain agen trombolitik, enzim fibrinolitik juga dapat digunakan sebagai pendegradasi trombus.

Enzim fibrinolitik merupakan protease serin yang masuk ke dalam agen trombolitik. Protease serin merupakan hasil residu serin dari proses hidrolisis protein dengan triad katalitik yaitu histidin, aspartat dan serin yang merupakan asam amino. Enzim fibrinolitik disebut agen trombolitik karena mampu mendegradasi gumpalan fibrin atau trombus (Syahbanu, Kezia, *et al.*, 2020). Berdasarkan mekanismenya, agen trombolitik dapat dibedakan menjadi dua jenis. Mekanisme pertama, berperan dalam mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin untuk mendegradasi fibrin atau disebut aktivator plasminogen, seperti *tissue-type plasminogen activator* (t-PA), streptokinase (SK), dan urokinase (UK). Mekanisme kedua yaitu fibrin secara langsung didegradasi oleh enzim fibrinolitik mirip plasmin, sehingga trombus dapat larut dengan cepat (Peng, Yang and Zhang, 2005). Walaupun pengobatan menggunakan t-PA masih populer sampai saat ini, namun spesifisitas fibrinnya yang rendah dan timbul efek samping pendarahan (Narasimhan, Chandrasekaran and Rajesh, 2015), membuat perlu adanya pengganti yang lebih aman untuk digunakan, sehingga banyak dilakukan penelitian yang bertujuan untuk meningkatkan efikasi dan spesifisitas dari terapi fibrinolitik (Kotb, 2013).

Agen trombolitik dapat dihasilkan dari berbagai sumber seperti mikroorganisme, hewan, maupun tanaman. Penemuan agen trombolitik pada mikroorganisme sukses dilakukan dari tahun ke tahun, terutama pada mikroorganisme hasil fermentasi makanan

seperti nattokinase (NK) pada *Bacillus natto*, Subtilisin DFE pada *Bacillus amyloliquefaciens*, maupun DC-4, QK-1 dan QK-2 pada *Bacillus subtilis* QK02 (Peng, Yang and Zhang, 2005). Pada hewan dilaporkan adanya enzim fibrinolitik di usus ikan Tambaqui (*C. macropomum*), udang *Litopenaeus vannamei* (Oliveira *et al.*, 2019), dan bisa dari ular *Agkistrodon acutus* (Liang *et al.*, 2005). Sedangkan untuk tanaman, agen trombolitik ditemukan pada kulit batang dan biji asam jawa (*Tamarindus indica*) (Biswas *et al.*, 2017), daun *Lophopetalum javanicum* (Ferdous, Azam and Hossain, 2014), daun *Coriandrum sativum* (Shahriar *et al.*, 2013) dan pada daun *Cassia siamea* L (Vani *et al.*, 2019).

Agen trombolitik yang ditemukan pada tanaman membuktikan bahwa tanaman dapat digunakan untuk tujuan terapeutik. Manfaat kesehatan yang didapat dari tumbuhan bisa beragam tergantung senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Banyaknya kandungan senyawa bioaktif pada tiap tumbuhan, akan menghasilkan aktivitas fisiologi yang berbeda pada tubuh manusia (Moin *et al.*, 2016). Untuk menghasilkan efek terapeutik, beberapa tumbuhan obat memerlukan biotransformasi oleh bakteri agar aktif secara biologis, sehingga memicu dilakukannya fermentasi. Fermentasi merupakan proses penguraian yang dapat dilakukan menggunakan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur sehingga menginduksi rusaknya dinding sel tumbuhan. Fermentasi dianggap menjadi salah satu cara yang dapat digunakan untuk meningkatkan khasiat dan mengurangi efek samping dari tumbuhan obat. Khususnya untuk meningkatkan efek antioksidan, meminimalkan risiko hepatotoksisitas, dan meningkatkan aktivitas antiinflamasi (Hussain *et al.*, 2016). Pada penelitian sebelumnya oleh Ng, C. C. (2011), dilakukan fermentasi tumbuhan *Anoectochilus formosanus* dengan *Lactobacillus acidophilus*, menghasilkan peningkatan kandungan fenol total sehingga aktivitas antioksidan meningkat (Ng *et al.*, 2011). Penelitian lain oleh Sheih, I. C. (2011), dilaporkan bahwa fermentasi *Radix astragali* (RA), obat tradisional Tiongkok dari akar *Astragalus membranaceus* yang dimediasi oleh *Aspergillus* spp. meningkatkan kandungan fenolik RA secara signifikan (Sheih *et al.*, 2011). Aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik hasil fermentasi teh *Centella asiatica* juga pernah diteliti dan terbukti lebih optimal (Ariffin *et al.*, 2011).

Centella asiatica merupakan tanaman obat tradisional dari famili Apiaceae yang biasa dikenal dengan nama Pegagan. Tanaman ini dikenal masyarakat karena berbagai manfaat senyawa kimia yang dikandungnya antara lain sebagai penyembuh luka, membantu memperbaiki gangguan neurodegenerative, meningkatkan daya ingat (Roy

and Bharadvaja, 2019), sebagai antioksidan, anti-inflamasi, dan melancarkan peredaran darah otak. Pegagan memiliki kandungan kimiawi yang penting dalam aplikasi pengobatan seperti asam asiatikosida, asam madekosida, asiatikosida, dan madekasosida (Seevaratnam *et al.*, 2012). Kandungan senyawa fenolik yang berlimpah dilaporkan terkandung dalam *Centella asiatica*, seperti quercetin, catechin, epicatechin, rutin, dan luteolin. Dalam penelitian CU (2020), menyebutkan bahwa daun *Centella asiatica* mengandung Karbohidrat sebesar $43.81 \pm 0.70\%$ dan Protein sebesar $8.35 \pm 1.28\%$ (CU *et al.*, 2020), keduanya berperan penting dalam memenuhi nutrisi mikroorganisme selama proses fermentasi (Kampen, 2014). Manfaat pegagan telah menjadi perhatian bagi pengembangan farmakologi modern, antara lain sebagai anti spasmodik dan antipiretik, anti-stress, kosmetik, dapat menekan sistem saraf pusat dan merupakan sumber antioksidan yang baik (Ariffin *et al.*, 2011). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan Hossain (2018) daun *Centella asiatica* juga memiliki aktivitas trombolitik dengan persentase clot lysis paling besar 50.53% dari fraksi petroleum eter terlut, jika dibandingkan dengan standar streptokinase 63,74% didapatkan indeks trombolitik sebesar 79,18% (Hossain *et al.*, 2018). Berdasarkan besar manfaatnya dalam bidang kesehatan dan potensi agen trombolitik yang dimiliki daun *Centella asiatica*. Diharapkan hasil fermentasi dari tumbuhan ini dapat menghasilkan aktivitas trombolitik yang lebih besar dibandingkan penelitian sebelumnya.

Semakin berkembangnya pengetahuan mengenai manfaat kesehatan dari penggunaan probiotik pada fermentasi produk, membuat penggunaan obat herbal hasil fermentasi semakin meningkat (Hussain *et al.*, 2016). Fermentasi dapat digunakan untuk meningkatkan sifat organoleptik, memperpanjang waktu simpan, dan meningkatkan bioavailabilitas dari tanaman (Nkhata *et al.*, 2018). Proses fermentasi membutuhkan kondisi yang optimum dari media, suhu fermentasi, pH media, dan waktu inkubasi (Hussain *et al.*, 2016). Metode fermentasi yang paling banyak digunakan sampai saat ini adalah fermentasi menggunakan mikroorganisme. Dengan fermentasi, mikroorganisme dapat bermanfaat bagi manusia dalam banyak aspek (Nelofer *et al.*, 2018). Bakteri probiotik merupakan contoh mikroorganisme yang dapat memberikan efek kesehatan apabila dikonsumsi dalam jumlah yang sesuai (Zhao *et al.*, 2019).

Penggunaan probiotik dalam peningkatan kesehatan individu sudah banyak dibuktikan, terutama penggunaan bakteri asam laktat dan *Bifidobacter* dalam proses fermentasi. Manfaat dari probiotik antara lain, produksi immunoglobulin yang dapat meningkatkan system imun, mengobati masalah akibat gangguan usus seperti *irritable*

bowel syndrome (IBS), kolitis *Clostridium difficile*, dan diare akibat antibiotik (Antony, 2018). Ada berbagai macam mikroorganisme probiotik bermanfaat bagi tumbuhan dan diantaranya dapat menghasilkan enzim fibrinolitik. Seperti *Leuconostoc mesenteroides*, probiotik ini terbukti mengaktifkan senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh wortel (Jung and Lee, 2009). Kemudian *Bacillus* sp. yang merupakan probiotik penghasil enzim fibrinolitik paling utama (Kotb, 2013). Probiotik lain yang juga menunjukkan adanya enzim fibrinolitik yaitu *Saccharomyces cerevisiae* (Jang *et al.*, 2011), *Lactococcus lactis*, dan *Vagococcus fluvialis* (Thokchom and Joshi, 2014). Selain itu, *Acetobacter* sp. FP1 hasil isolasi ekstrak daun pinus juga dapat dikarakterisasi aktivitas fibrinolitiknya dengan media Nutrien agar yang mengandung pepton (sebagai sumber nitrogen), ekstrak daging sapi (sebagai sumber karbohidrat, vitamin, dan garam) dan agar (Park *et al.*, 2012).

Acetobacter merupakan spesies bakteri penghasil asam asetat yang berperan penting dalam fermentasi buah dan sayur (Zhao *et al.*, 2019). *Acetobacter aceti*, salah satu spesies *Acetobacter*, belum pernah dilaporkan sebagai mikroba patogen karena tidak memproduksi toksin maupun virus yang dapat membahayakan manusia atau hewan. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri penyebab perubahan warna kecoklatan pada buah seperti apel, pir, dan jeruk (Kowser, Aziz and Uddin, 2015). Pada penelitian yang dilakukan oleh Krusong (2014), *Acetobacter aceti* dapat digunakan untuk konversi alkohol menjadi asam asetat pada arak beras (Krusong and Tantratian, 2014). Peningkatan produksi asam asetat dari apel manalagi (*Malus sylvestris* mill) juga ditunjukkan dari hasil fermentasi campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* (Rosada, 2018). Oleh karena itu, dipilihlah *Acetobacter aceti* untuk diteliti lebih lanjut enzim fibrinolitik dan kemampuannya dalam meningkatkan aktivitas trombolitik dari tanaman obat.

Pemanfaatan kombinasi probiotik dan tanaman obat saat ini belum banyak dikembangkan, penelitian yang pernah dilakukan yaitu produksi komponen bioaktif dari ampas wortel menggunakan probiotik *Bacillus subtilis* HA dan *Leuconostoc mesenteroides* (Jung and Lee, 2009), efek DNA protektif ekstrak daun *Ginko biloba* terhadap stress oksidatif menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* (Marques *et al.*, 2011), dan fermentasi Gingseng dengan *Bacillus subtilis* untuk mengetahui aktivitas fibrinolitiknya (Jeong, Rhee and Kim, 2017). Di Indonesia sendiri belum banyak yang melakukan penelitian mengenai kombinasi tumbuhan dan probiotik, padahal fermentasi menggunakan probiotik dapat meningkatkan aktivitas dari tumbuhan, selain itu

metabolit sekunder dari keduanya dapat berinteraksi untuk menghasilkan senyawa baru yang bermanfaat (Hussain *et al.*, 2016), sehingga menarik untuk dilakukan penelitian kombinasi fermentasi daun *Centella asiatica* dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016 untuk diuji aktivitas trombolitiknya.

Dalam pengukuran aktivitas trombolitik, berbagai metode telah dikembangkan. Salah satu metode yang paling terjangkau dan dapat digunakan adalah dengan model *clot lysis* secara in-vitro. Metode lainnya yang dapat digunakan adalah dengan komputasi dan model matematika, namun metode tersebut rumit dan sangat mahal (Prasad *et al.*, 2006), sehingga pada penelitian kali ini digunakan metode *clot lysis* secara in-vitro. Metode *clot lysis* adalah metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas trombolitik dengan persen lisis bekuan darah sebagai parameter pengamatan. Dengan membentuk bekuan sel darah merah, kemudian bekuan dipapar dengan enzim fibrinolitik yang diuji (Kotb, 2013). Setelah lisis, dapat dihitung persentase *clot lysis*-nya. Untuk menghitung persentase *clot lysis*, berat bekuan darah yang sudah lisis dibagi dengan berat bekuan darah awal, kemudian dikali seratus persen (Hossain *et al.*, 2018). Maka akan didapatkan persen *clot lysis*nya. Kemudian aktivitasnya ditentukan menggunakan indeks trombolitik.

Berdasarkan uraian di atas, dibuatlah penelitian ini untuk mengetahui aktivitas trombolitik dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* menggunakan *Acetobacter aceti* FNCC 0016. FNCC atau *Food and Nutrition Culture Collection* merupakan salah satu divisi yang menyediakan kultur atau isolat mikroba di Universitas Gajah Mada dengan 0016 merupakan nomor strain yang tersedia. Diharapkan dari penelitian ini dapat diketahui adanya peningkatan aktivitas trombolitik sehingga dalam pembuatannya dapat dikondisikan dan dimanfaatkan secara maksimal.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah *Acetobacter aceti* FNCC 0016 dan daun *Centella asiatica* memiliki aktivitas enzim fibrinolitik?
2. Apakah proses fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016 menghasilkan peningkatan aktivitas trombolitik dibanding ekstrak daun *Centella asiatica* tanpa fermentasi?
3. Berapa indeks trombolitik yang didapatkan dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui adanya aktivitas enzim fibrinolitik pada *Acetobacter aceti* FNCC 0016 dan *Centella asiatica*.
2. Mengetahui ada atau tidaknya peningkatan aktivitas trombolitik dari fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016
3. Mengetahui indeks trombolitik yang dihasilkan dari fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi kepentingan pengembangan keilmuan, maka melalui penelitian ini dapat diperoleh data ilmiah bahwa daun *Centella asiatica* yang difermentasi dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016 memiliki aktivitas trombolitik dengan persentase *clot lysis* yang lebih besar dibandingkan ekstrak daun *Centella asiatica*, sehingga diharapkan dapat diaplikasikan lebih lanjut dan menjadi alternatif pengobatan agen trombolitik.
2. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat terkait produk herbal yang dapat dijadikan alternatif pengobatan kardiovaskular.