

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular terjadi karena adanya pembekuan darah, dimana fibrin sebagai komponen penting yang dibentuk oleh trombus dalam fibrinogen terakumulasi pada pembuluh darah, sehingga dapat meningkatkan terjadinya trombosis. (Rajaselvam *et al.*, 2021). Trombosis merupakan hemostasis atau bekuan darah pada tempat yang bukan semestinya, jika trombosis terjadi pada arteri akan menimbulkan arteri trombosis yang dapat menyebabkan stroke iskemik dan infark miokard. (Chaudhary *et al.*, 2015).

Untuk mendegradasi trombus yang ada pada pembuluh darah, dibutuhkan enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik merupakan protease yang mampu mendegradasi trombus yang ada pada pembuluh darah. Dalam enzim fibrinolitik dikenal adanya triad asam amino, yang terdiri dari serin, histidin, dan aspartate. Salah satu asam amino yang terdapat dalam triad adalah serin. Mekanisme kerja secara kimia yang terjadi pada enzim fibrinolitik yaitu bermula dari fibrin yang berikatan secara nonkovalen menggunakan rantai samping kantong hidrofobik yang ada pada sisi aktif. H⁺ ditransfer dari serin ke histidin membuat keadaan transisi tetrahedral menggunakan enzim fibrinolitik. H⁺ ditransfer ke fragmen terminal-C dari fibrin yang dilepaskan melalui pemutusan ikatan C-N (peptida). Rantai peptida terminal-N terikat melalui ikatan asil ke serin. Molekul H₂O mentransfer protonnya ke histidin-57 serta -OH-nya ke fragmen substrat yang tersisa (fibrin yang tadi terputus). Kemudian keadaan transisi fibrinolitik terbentuk lagi. Fragmen peptida kedua dilepaskan: ikatan asil terputus, proton ditransfer dari histidin balik ke serin, serta enzim balik ke keadaan awalnya (Philipps-Wiemann, 2018). Kemudian fibrin yang ada, akan dipecah oleh plasmin membentuk fibrin degradation product (FDP) (Peet, 2018)

Selain itu, di dalam enzim fibrinolitik terdapat urokinase, streptokinase, dan jaringan activator plasminogen hasil dari rekayasa genetika. (Kotb, 2012). Berdasarkan mekanisme kerja enzim fibrinolitik untuk mendegradasi fibrin dikelompokkan menjadi dua, yang pertama yaitu protein plasmin, dimana serat-serat fibrin yang tidak dapat larut, dilarutkan oleh plasmin (Kim *et al.*, 2015). Kedua yaitu aktivator jaringan plasminogen (t-PA) dan urokinase, yang bekerja dengan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin

aktif guna mendegradasi fibrin. Namun activator plasminogen ini memiliki kekurangan yaitu harga yang relatif mahal dan efek samping seperti perdarahan pada gangguan pencernaan apabila diberikan melalui sediaan oral. (Kotb, 2012) reaksi alergi dan resistensi (Kim *et al.*, 2015)

Adanya efek samping yang ditimbulkan dari pemanfaatan aktivator plasminogen dan urokinase menjadi alasan pencarian enzim fibrinolitik yang tidak banyak menimbulkan efek samping dan harganya yang relatif terjangkau. Berbagai macam sumber potensial dapat berasal dari hewan seperti, serangga, cacing, selain itu dapat berasal pula dari fermentasi produk makanan, seperti Korean chungkook-jang, Douchi dan Natto (Feng *et al.*, 2017). Makanan-makanan tersebut dapat diketahui mengandung enzim fibrinolitik atau tidak dengan pengujian metode pelat fibrin atau *fibrin plate*. Metode *fibrin plate* digunakan dalam analisis kuantitatif aktivitas dari enzim fibrinolitik. (Ping Xiao *et al.*, 2014)

Pada penelitian yang dilakukan oleh Ping Xiao di tahun 2014, ditemukan adanya *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme (BSFE) yang terdapat pada fermentasi kacang arab dengan menggunakan probiotik *Bacillus subtilis*. Nattokinase (NK) digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini. Adanya BSFE menyebabkan terjadinya pembentukan zona jernih dan ukuran zona jernih lebih besar dari jumlah NK yang sama pada konsentrasi apa pun. Setelah inkubasi 6 jam, area zona jernih yang dibentuk oleh BSFE diamati kira-kira 1,5 kali lipat lebih besar dari jumlah NK yang sama. Karena luas zona jernih berbanding lurus dengan aktivitas, dapat dikatakan bahwa BSFE mempunyai aktivitas fibrinolitik yang lebih kuat daripada NK (Ping Xiao *et al.*, 2014). Adanya aktivitas enzim fibrinolitik yang besar menunjukkan bahwa fermentasi kacang arab atau *Cicer arietinum* L. berpotensi menghasilkan agen trombolitik.

Cicer arietinum atau yang dikenal sebagai kacang arab biasanya digunakan sebagai antioksidan, antijamur, antigen, mengurangi risiko penyakit degenerative, penyakit kardiovaskular, dan antiinflamasi (Kou *et al.*, 2013). *Cicer arietinum* mengandung senyawa-senyawa penting, seperti asam amino esensial, asam lemak, tocopherol, sterol, tocotrienol, riboflavin, pyridoxine, β -carotene, dan isoflavon. Senyawa isoflavon ini dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskular. (Jukanti *et al.*, 2012). Kandungan lainnya yaitu peptida bioaktif yang bermanfaat untuk gejala kardiovaskular, menurunkan kolesterol, dan sebagai ACE inhibitor (Kou *et al.*, 2013). Selain itu, *Cicer arietinum* mengandung sekitar 55-60% karbohidrat, 18-29% protein, 4-7% lemak, dan 5-

8% serat tumbuhan (Boukid, 2021 dan Savic *et al.*, 2018), dengan adanya kandungan protein yang cukup besar diyakini mampu meningkatkan produksi agen trombolitik oleh proses fermentasi yang ada pada tanaman tersebut.

Tanaman dengan kandungan protein yang tinggi mampu menumbuhkan mikroorganisme yang menghasilkan agen trombolitik karena protein ini adalah sumber karbon dan nitrogen untuk mikroorganisme tersebut. Dalam proses mendapatkan hasil agen trombolitik yang maksimal, mikroorganisme dikembangkan pada media yang mengandung karbon dan nitrogen yang cukup untuk memberikan nutrisi pada mikroorganisme tersebut, yaitu dengan menggunakan proses fermentasi (Raju *et al.*, 2014).

Fermentasi merupakan perombakan senyawa organik yang dilakukan oleh mikroorganisme melibatkan enzim yang dihasilkannya sebagai biokatalis dalam keadaan media yang dikontrol (Hussain *et al.*, 2016). Pada penggolongan fermentasi berdasarkan teknologinya dibagi menjadi dua, yaitu fermentasi cair dan fermentasi padat. Dari kedua jenis fermentasi tersebut yang paling ekonomis untuk digunakan yaitu fermentasi padat. Fermentasi padat adalah fermentasi yang terjadi dalam keadaan matriks yang padat dengan adanya air atau bahkan hampir tidak ada air, namun dalam pertumbuhan dan aktivitas substrat juga perlu kelembaban. Penelitian bahkan menemukan bahwa fermentasi padat mempunyai banyak keuntungan daripada fermentasi cair, yaitu harga produksi yang lebih murah, produktivitas dan stabilitas produk lebih baik dibandingkan dengan fermentasi cair. Fermentasi padat biasanya digunakan untuk membuat enzim, antibiotik, asam organik, dan lain lain. (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2017). Dalam proses fermentasi padat, digunakan jamur sebagai probiotik karena reproduksi tinggi dan mudah tumbuh di media manapun (Srivastava *et al.*, 2019). Contoh fermentasi dengan memanfaatkan fermentasi padat yaitu makanan tradisional asal Indonesia, tempe. Tempe mengandung probiotik yang sangat bagus untuk tubuh manusia, terutama pada organ pencernaan (Redi Aryanta, 2020).

Menurut International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP), probiotik diartikan sebagai organisme berukuran sangat kecil yang akan menghasilkan manfaat jika jumlah yang diberikan cukup (Sanders *et al.*, 2018). Beberapa jenis mikroorganisme yang biasa digunakan untuk probiotik antara lain *Lactobacillus* dan *Bacillus*. (Zamanizadeh *et al.*, 2021). Selain itu jamur penghasil probiotik juga sering digunakan untuk membuat makanan, seperti *Rhizopus* dan *Aspergillus*. Dari beberapa

jenis mikroorganisme dan jamur yang telah disebutkan diatas, terdapat mikroorganisme yang dapat menghasilkan protease yang diharapkan sebagai agen trombolitik, salah satunya yaitu jenis jamur *Aspergillus*. Beberapa jenis *Aspergillus* yang umum digunakan dalam pemanfaatan pangan fungsional yaitu *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus niger* (de Souza *et al.*, 2015). Berdasarkan ketiga jenis *Aspergillus* diatas, *Aspergillus niger* berpotensi untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

Penelitian mengenai *Aspergillus niger* sebagai penghasil enzim protease pernah dilakukan oleh Putri Ramadhani beserta timnya pada tahun 2015 dengan menggunakan jamur *Aspergillus niger* PAM18A yang ditumbuhkan dalam medium CDA (Czapex Dox Agar) + 5mL NaCl 0,85% + Tween 80 0,01%. Hasil dari produksi enzim proteasenya bisa dilihat dari aktivitas hidrolisis kasein menjadi asam amino. Pada kondisi media yang memiliki pH 8 dan waktu inkubasi 5 hari menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* menghasilkan aktivitas enzim protease paling tinggi yaitu 0,930 U/mL dan kadar protein 0,268 mg/ml. (Putri Ramadhani *et al.*, 2015). Setelah diketahui bahwa *Aspergillus niger* ini menghasilkan protease yang tinggi, seorang peneliti yaitu Osmolovskiy dan timnya melakukan penelitian mengenai *Aspergillus* sp. Pada penelitian tersebut *Aspergillus niger* terbukti dapat menghasilkan enzim fibrinolitik, dibuktikan dengan hasil diameter dari zona jernih pada uji *fibrin plate* paling tinggi diantara spesies jamur *Aspergillus* lainnya, yaitu sebesar 60 mm dengan diameter koloni sebesar 59 mm (Osmolovskiy *et al.*, 2018).

Selain itu, terdapat penelitian yang dilakukan oleh Shamim Shamsi pada tahun 2016 mengenai jamur yang dapat tumbuh di fermentasi *Cicer arietinum* L. Hasil penelitian membuktikan bahwa terdapat 9 spesies jamur yang dapat tumbuh di *Cicer arietinum* L., antara lain *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Curvularia lunata*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer* dan *Trichoderma viride*. Penelitian tersebut menyatakan bahwa *Aspergillus niger* memiliki prevalensi pertumbuhan yang meningkat pada penyimpanan selama 2 bulan. (Shamsi *et al.*, 2016).

Sehingga dapat dihipotesiskan bahwa *Aspergillus niger* bisa digunakan untuk proses fermentasi padat sebagai penghasil enzim fibrinolitik yang termasuk agen trombolitik. Untuk mengetahui aktivitas trombolitik dilakukan penelitian dengan menggunakan metode *clot lysis*.

Metode *clot lysis* digunakan secara umum untuk penelitian fisiologi sistem fibrinolitik dan untuk pengujian dan standarisasi dari enzim. Prinsip *clot lysis* yaitu bekuan darah, yang terdiri dari fibrin akan terdegradasi bila terkena enzim fibrinolitik. Saat bekuan mulai lisis, sel darah merah dilepaskan dari fibrin dan jumlah lisis yang dikeluarkan dalam waktu tertentu dapat ditentukan dengan mengukur jumlah sel dilepaskan. (Kotb, 2013)

Berdasarkan latar belakang yang telah dijabarkan, maka dilakukanlah penelitian ini untuk dapat membuktikan adanya aktivitas agen trombolitik dari hasil fermentasi padat dari *Cicer arietinum* oleh *Aspergillus niger*. Diharapkan dengan adanya penelitian ini dapat diketahui adanya aktivitas trombolitik sehingga dalam pembuatannya bisa dikondisikan dan berguna untuk pangan fungsional.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) oleh *Aspergillus niger* FNCC 6018 menghasilkan agen trombolitik?
2. Apakah waktu fermentasi padat dapat mempengaruhi aktivitas agen trombolitik pada fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) oleh *Aspergillus niger* FNCC 6018?
3. Apakah hasil *clot lysis* yang didapatkan dari fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) oleh *Aspergillus niger* FNCC 6018 lebih besar dari sebelum dilakukan fermentasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa *Aspergillus niger* FNCC 6018 memiliki aktivitas agen trombolitik pada fermentasi kacang arab (*Cicer arietinum* L.)
2. Membuktikan adanya pengaruh waktu fermentasi padat terhadap aktivitas agen trombolitik pada fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) oleh *Aspergillus niger* FNCC 6018
3. Membuktikan hasil *clot lysis* yang dihasilkan dari fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) dengan *Aspergillus niger* FNCC 6018 lebih besar dari sebelum dilakukan fermentasi

1.4 Manfaat Penelitian

Bagi Ilmu Pengetahuan

Penelitian diharapkan menjadi informasi mengenai aktivitas trombolitik dari fermentasi padat kacang arab (*Cicer arietinum* L.) oleh *Aspergillus niger* sebagai terapi alternative untuk penyakit kardiovaskular

1.4.1

Bagi Institusi

Penelitian diharapkan mampu menambah sumber pustaka yang digunakan dalam pengembangan ilmu pengetahuan, terutama pada bidang farmasi dan dapat

1.4.2

menghasilkan produk pangan fungsional yang memiliki nilai ekonomi yang berguna untuk masyarakat, serta dapat meningkatkan nama baik institusi

Bagi Masyarakat

1.4.3

Penelitian diharapkan menambah pengetahuan dikalangan masyarakat mengenai produk pangan fungsional yang dapat menjadi pertimbangan terapi untuk pengobatan pada penyakit kardiovaskular