

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS TROMBOLITIK IN-VITRO HASIL
FERMENTASI BUNGKIL KEDELAI (*Soybean meal*) OLEH
Aspergillus oryzae FNCC 6004**



ELVIA MEI NADILASARI

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN ILMU KEFARMASIAN
SURABAYA
2022**

Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS TROMBOLITIK IN-VITRO HASIL
FERMENTASI BUNGKIL KEDELAI (*Soybean meal*) OLEH
Aspergillus oryzae FNCC 6004**

SKRIPSI

**Dibuat Untuk Memenuhi
Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**

2022

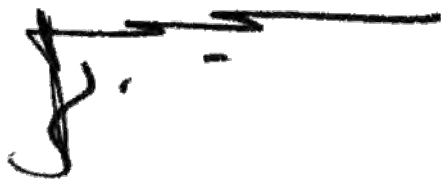
Oleh :

Elvia Mei Nadilasari

051811133074

**Skripsi ini telah disetujui
Agustus 2022 oleh :**

Pembimbing Utama



Dr. apt. A. Toto Poernomo, M.Si.

NIP.195909181987101001

Pembimbing Serta



Apt. Kholis Amalia N., S.Farm., M.Sc.

NIP.198611252010122006

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Elvia Mei Nadilasari

NIM : 051811133074

adalah mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Naskah Tugas Akhir / Skripsi yang saya tulis dengan judul :

Uji Aktivitas Trombolitik In-Vitro Hasil Fermentasi Bungkil Kedelai (*Soybean Meal*) Oleh *Aspergillus Oryzae* FNCC 6004

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa isi Naskah Skripsi ini merupakan hasil plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 28 Juli 2022

Yang Membuat Pernyataan,



Elvia Mei Nadilasari

NIM. 051811133074

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Elvia Mei Nadilasari

NIM : 051811133074

Menyatakan bahwa demi kepentingan perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui abstrak Skripsi yang saya dengan judul :

Uji Aktivitas Trombolitik In-Vitro Hasil Fermentasi Bungkil Kedelai (*Soybean Meal*) Oleh *Aspergillus Oryzae* FNCC 6004

Untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik, sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 28 Juli 2022

Yang Membuat Pernyataan,



Elvia Mei Nadilasari

NIM. 051811133074

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kehadiran Allah SWT. karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Trombolitik In-Vitro Hasil Fermentasi Bungkil Kedelai (*Soybean Meal*) Oleh *Aspergillus Oryzae* FNCC 6004”** yang disusun sebagai salah satu syarat kelulusan dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

Pada saat penyelesaian skripsi ini, penulis mendapatkan banyak bantuan dari berbagai pihak, sehingga izinkan penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak, selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Apt. Umi Athiyah, MS selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga periode 2015 – 2020 dan Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M.Kes., Ph.D., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga periode 2020 – 2025.
3. Dr. Apt. Juni Ekowati, M.Si. selaku ketua Departemen Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan penulis untuk melaksanakan skripsi di Departemen Ilmu Kefarmasian.
4. Dr. Apt. Achmad Toto Poernomo selaku Dosen pembimbing utama dan Apt. Kholis Amalia Nofianti, S. Farm., M.Sc. Selaku Dosen pembimbing serta atas bimbingan, saran dan masukan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Dr. rer.nat. H. Mochammad Yuwono, Ms., Apt., selaku dosen wali yang telah memberikan perhatian, saran dan nasihat selama penulis menempuh kuliah.
6. Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas ilmu yang telah diberikan selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan sarjana Farmasi.
7. Pak Bakir selaku laboran Laboratorium Analisis Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesabaran dan bantuan yang telah diberikan selama penulis melaksanakan penelitian.
8. Skripsi ini saya persembahkan untuk orang tua saya, Alm. Samidi dan Lasirah serta kakak saya, Prayitno dan Nistyowati. Terima kasih atas ridho, doa, nasihat dan motivasi sehingga penulis dapat terus berjuang dalam menempuh pendidikan Sarjana Farmasi.

9. Dimas Irfan Putra Firman Pamungkas yang telah memberi dukungan, saran serta motivasi selama penulis menjalani pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
10. Niken Ayu Setyaningrum, Firsty Ananda Ayu Berliana dan Sholihatul Ayatullah selaku teman seperbimbingan yang selalu ada, selalu membantu, saling mendukung dan memberi motivasi serta bersedia mendengarkan keluh kesah selama penulis menyusun skripsi.
11. Teman – teman “Taxo” (Niken, Alda, Firsty, Niah, Mavita, Annisa, Dyan, Rio) yang telah saling berbagi ilmu, saling mendukung dan memberi motivasi selama penulis menjalani pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
12. Semua pihak yang telah mendukung dan membantu kelancaran penyusunan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan naskah skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna. Sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran dari para pembaca agar skripsi ini dapat menjadi lebih baik. Penulis berharap bahwa penelitian ini dapat membawa manfaat yang besar bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam pengembangan pengobatan alternatif penyakit kardiovaskular.

Surabaya, 28 Juli 2022



Elvia Mei Nadilasari

RINGKASAN

**UJI AKTIVITAS TROMBOLITIK IN-VITRO HASIL FERMENTASI BUNGKIL
KEDELAI (*Soybean Meal*) OLEH *Aspergillus Oryzae* FNCC 6004****Elvia Mei Nadilasari**

Enzim fibrinolitik merupakan protease yang dapat mengaktivasi plasminogen dan merubahnya menjadi plasmin yang dapat menghidrolisis fibrin. Fibrin merupakan komponen utama protein yang membentuk trombus atau gumpalan darah. Salah satu faktor dari CVDs adalah terjadinya trombosis yang merupakan adanya akumulasi gumpalan fibrin atau trombus di pembuluh darah arteri (Chandrasekaran *et al.*, 2015). Dalam kondisi normal, fibrin dihidrolisis oleh plasmin dalam proses pelarutan benang-benang fibrin yang disebut fibrinolisis. Namun dalam kondisi tidak normal, trombus tidak terhidrolisis sehingga terjadi bekuan trombus yang disebut trombosis (Kotb, 2013). Untuk mencegah terjadinya trombosis, dapat digunakan agen trombolitik untuk melarutkan bekuan darah (Umesh *et al.*, 2014).

Sumber agen trombolitik dapat berasal dari tanaman seperti kedelai ataupun ampas/limbah pembuatan minyak kedelai (bungkil kedelai). Sumber agen trombolitik lainnya berasal dari mikroorganisme seperti *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 yang dapat menghasilkan protease ekstraseluler selama fase eksponensial maupun pada fase stationer (Akhtar, Hoq dan Mazid, 2017). Kedua sumber agen trombolitik tersebut dikombinasikan dengan cara fermentasi. Fermentasi merupakan cara untuk mendapatkan metabolit primer dan sekunder dari tanaman melalui proses biotransformasi dan biokatalis senyawa oleh mikroorganisme (Singh, 2017). Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti media yang digunakan, pH, suhu serta lamanya waktu fermentasi (Bordoloi dan Ganguly, 2014; Abbasiliasi *et al.*, 2017). Pada saat faktor – faktor tersebut berada pada kondisi yang optimum, maka kerja dan hasil metabolit yang dihasilkan enzim akan maksimal.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu fermentasi yang optimum dalam menghasilkan aktivitas trombolitik yang maksimum dari hasil fermentasi bungkil kedelai oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi senyawa pada bungkil kedelai yang berperan dalam aktivitas trombolitik.

Penelitian ini diawali dengan melakukan peremajaan pada *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 koleksi *Food and Nutrition Culture Collection* Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada pada media nutrient agar miring. Kemudian dilakukan pembuatan suspensi spora *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dan melakukan penyiapan media fermentasi menggunakan bungkil kedelai yang didapatkan dari Toko Pakan Ternak Tulungagung dan dilakukan determinasi di laboratorium biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Selanjutnya dilakukan proses fermentasi dengan variasi waktu 0, 24, 48, 72, 96 dan 120 jam pada suhu $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tahap selanjutnya adalah melakukan uji pendahuluan yang terdiri dari uji aktivitas proteolitik dengan media susu skim agar dan uji aktivitas fibrinolitik dengan media fibrin plate. Kedua uji tersebut bertujuan untuk melihat apakah enzim yang terdapat pada jamur, substrat serta hasil fermentasi dapat mendegradasi protein yang terdapat pada susu skim dan fibrin dalam plate. Dari hasil pengujian didapatkan bahwa inokulum *Aspergillus oryzae* FNCC 6004, ekstrak bungkil kedelai dan hasil fermentasi memiliki hasil positif yang menunjukkan adanya aktivitas proteolitik dan fibrinolitik.

Kemudian dilakukan uji aktivitas trombolitik untuk mengetahui apakah enzim yang terdapat pada jamur, ekstrak serta hasil fermentasi dapat melisis trombus atau gumpalan darah. Trombus yang digunakan berasal dari darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diambil secara intrakardial.

. Dari hasil pengujian didapatkan aktivitas trombolitik yang maksimum terdapat pada hasil fermentasi selama 96 jam. Hasil tersebut disebabkan karena pada waktu 96 jam jamur berada pada fase stationer sehingga pertumbuhan meningkat dan terjadi peningkatan produk metabolit primer berupa protease yang dapat memecah protein pada bungkil kedelai menjadi asam amino yang berperan dalam aktivitas trombolitik. Diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mengetahui pengaruh pertumbuhan bungkil kedelai yang berperan dalam menghasilkan aktivitas trombolitik sehingga hasil dari penelitian ini dapat disempurnakan dan menjadi alternatif untuk pengobatan penyakit kardiovaskular.

ABSTRACT

IN-VITRO THROMBOLITIC ACTIVITY TEST OF SOYBEAN MEAL
FERMENTATION BY *Aspergillus Oryzae* FNCC 6004

Elvia Mei Nadilasari

Background : Thrombolytic agents are fibrinolytic enzymes that can be used as therapy for cardiovascular disease. Thrombolytic agents can be found from macroorganism such as soybean meal dan from microorganism such as *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. Both sources of these thrombolytic agents can be combined by fermentation. Fermentation can be influenced by factors of fermentation time dan temperature. **Objective :** This study aimed to determine the optimum fermentation time to produce maximum thrombolytic activity of the fermented product soybean meal by *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. **Methods :** Fermentation was carried out with variations in incubation time 0, 24, 48, 72, 96 and 120 hours at a temperature 30 ± 1 °C. Meanwhile, the thrombolytic activity was tested by *clot lysis* using blood of white mouse (*Rattus novergicus*) was incubated at 37 ± 1 °C for 15, 30, 45, and 60 minutes with a positive control of nattokinase. **Results :** The maximum thrombolytic activity was found in the fermented product for 96 hours with a thrombolytic index of 135.98 ± 3.5 . This result was greater than thrombolytic index of *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 (94.76 ± 3.07) dan soybean meal (85.93 ± 2.01). **Conclusion :** The optimum time for soybean meal fermentation by *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 which can produce maximum thrombolytic activity is 96 hours.

Keywords : Thrombolytic, Soybean meal, *Aspergillus oryzae* FNCC 6004, Fermentation, Time

DAFTAR ISI

Lembar Pengesahan	II
Surat Pernyataan Bebas Plagiasi	III
Surat Persetujuan Untuk Dipublikasikan di Media <i>on line</i>	IV
KATA PENGANTAR	V
RINGKASAN	VII
ABSTRACT	X
DAFTAR ISI	XI
DAFTAR TABEL	XIV
DAFTAR GAMBAR	XV
DAFTAR LAMPIRAN	XVI
BAB I PENDAHULUAN	17
1.1 Latar Belakang	17
1.2 Rumusan Masalah	20
1.3 Tujuan Penelitian	20
1.4 Manfaat Penelitian	21
1.4.1 Bagi Ilmu Pengetahuan	21
1.4.2 Bagi Institusi	21
1.4.3 Bagi Masyarakat	21
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	22
2.1 Tinjauan Tentang Penyakit Kardiovaskular	22
2.1.1 Mekanisme Pembentukan Trombus	22
2.2 Tinjauan Umum Tentang Agen Trombolitik	24
2.2.1 Protease	25
2.2.2 Penggolongan Agen Trombolitik	28
2.2.3 Metode Perhitungan Aktivitas trombolitik dengan <i>Clot lysis</i>	29
2.3 Tinjauan Tentang Enzim Fibrinolitik	30
2.3.1 Faktor - Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim	31
2.3.2 Uji In Vitro Enzim Fibrinolitik	33
2.3.3 Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode Fibrin Plate	33
2.4 Tinjauan Tentang Tanaman	34
2.4.1 Tanaman Penghasil Agen Trombolitik	34
2.4.2 Tinjauan Tentang <i>Soybean meal</i>	34

2.5 Tinjauan Tentang Jamur	35
2.5.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Jamur	36
2.5.2 Tinjauan Jamur Penghasil Enzim Fibrinolitik	38
2.5.3 Tinjauan Tentang <i>Aspergillus oryzae</i>	39
2.6 Tinjauan Tentang Fermentasi	40
2.6.1 Tinjauan Tentang Fermentasi Padat (SSF)	41
2.6.2 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Proses Fermentasi	41
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	43
3.1 Uraian Kerangka Konseptual	43
3.2 Hipotesis	44
3.3 Bagan kerangka konseptual	45
BAB IV METODE PENELITIAN	46
4.1 Rancangan Penelitian	46
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.3 Variabel Penelitian	46
4.3.1 Klasifikasi Variabel	46
4.3.2 Definisi Operasional Variabel	46
4.4 Alat dan Bahan Penelitian	47
4.4.1 Alat	47
4.4.2 Bahan	47
4.5 Tahapan Penelitian	48
4.5.1 Preparasi Media	48
4.5.2 Peremajaan Kultur Jamur <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004	49
4.5.3 Pembuatan Inokulum (Suspensi Spora <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004)	49
4.5.4 Fermentasi Bungkil Kedelai dengan <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004	50
4.5.5 Pembuatan <i>Crude Enzyme</i> dan <i>Crude Extract</i>	50
4.5.6 Uji Aktivitas Proteolitik dengan <i>Skim Milk Agar</i>	50
4.5.7 Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Fibrin Plate	50
4.5.8 Uji Aktivitas Trombolitik dengan <i>Clot Lysis</i>	51
4.6 Uji Statistik	51
4.7 Kerangka Operasional	52
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	53
5.1. Peremajaan <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004	53
5.2. Pembuatan Suspensi Spora <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004	53

5.3. Uji proteolitik pada Media Susu Skim Agar	54
5.4. Uji Fibrinolitik pada Media Fibrin Plate Agar	56
5.5 Uji Clot lysis	57
5.6 Uji Penentuan Kadar Protein	59
5.7 Uji Profil Protein Menggunakan Elektroforesis	59
5.8 Uji Dengan Alat Bantu Statistik	60
5.8.1 Uji Normalitas Shapiro-Wilk Tes	60
5.8.2 Uji Homogenitas	60
5.8.3 One Way Anova Test	60
5.8.4 Post Hoc Multiple Comparison (Tukey HSD)	60
5.8.5 Homogeneous Subsets (Duncan) Pada Subset Alpha = 0,05	60
5.8.6 Paired Sample T test	61
5.9 Kesimpulan Statistik	61
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	62
6.1 Kesimpulan	62
6.2 Saran	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN	71

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Daftar protease terapeutik yang disetujui FDA	26
Tabel II.2 Penggolongan Agen Trombolitik Berdasarkan Perkembangan Generasi	28
Tabel II.3 Tanaman Penghasil Agen Trombolitik	34
Tabel II.4 Karakteristik utama dan contoh berbagai subdivisi kingdom fungi	36
Tabel II.5 Tinjauan Jamur Penghasil Enzim Fibrinolitik	38
Tabel II.6 Tinjauan Tentang <i>Aspergillus oryzae</i>	40
Tabel II.7 Produksi enzim dengan menggunakan metode fermentasi padat (SSF) ..	41
Tabel V.1 Hasil Uji Proteolitik	55
Tabel V.2 Hasil Uji Fibrinolitik	57
Tabel V.3 Hasil Uji <i>Clot Lysis</i>	58
Tabel Lampiran.1 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik	72
Tabel Lampiran.2 Hasil Uji Fibrinolitik	75
Tabel Lampiran.3 Hasil Uji Aktivitas Trombolitik	78

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme Pembentukan Trombus	24
Gambar 2.2 Mekanisme Fibrinolisis	25
Gambar 2.3 Perbandingan mekanisme kerja proteolisis	26
Gambar 2.4 Mekanisme Protease Serin Terhadap Substrat	27
Gambar 2.5 Mekanisme degradasi trombus	30
Gambar 2.6 Pengaruh pH pada laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim.	32
Gambar 2.7 Biji kedelai (<i>Glycine max</i> L.) dan Bungkil kedelai (Soybean meal)	35
Gambar 5.1 Hasil peremajaan <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 pada media <i>potato dextrose agar</i> (PDA) setelah 72 Jam diinkubasi pada suhu $37\pm 1^{\circ}\text{C}$	53
Gambar 5.2 Suspensi <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 setelah diukur transmitan 25% dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580nm	54
Gambar 5.3 Contoh hasil pengamatan aktivitas proteolitik pada hasil fermentasi bungkil kedelai oleh <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 selama 96 jam (C5) pada suhu $30\pm 1^{\circ}\text{C}$	54
Gambar 5.4 Contoh hasil pengamatan aktivitas fibrinolitik pada hasil fermentasi bungkil kedelai oleh <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 selama 96 jam pada suhu $30\pm 1^{\circ}\text{C}$	56
Gambar 5.5 Contoh hasil uji aktivitas trombolitik pada hasil fermentasi bungkil kedelai oleh <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 dengan metode clot lysis, dengan k+ yaitu nattokinase dan k- yaitu NaCl 0,9%.	58
Gambar 5.6 Hasil Uji Elektroforesis sampel bungkil kedelai sebelum fermentasi dan sampel bungkil kedelai setelah fermentasi selama 96 jam	59
Gambar 5.7 Nilai % clot lysis hasil fermentasi bungkil kedelai oleh <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004 pada berbagai variasi waktu fermentasi	61

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik	71
Lampiran 2 Hasil Uji Aktivitas Fibrinolitik	74
Lampiran 3 Hasil Uji Aktivitas Trombolitik	77
Lampiran 4 Hasil Uji Statistik	80
Lampiran 5 Sertifikat <i>Aspergillus oryzae</i> FNCC 6004	84
Lampiran 6 Determinasi bungkil kedelai	85