

BAB I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Penyebab utama penyakit kardiovaskular adalah trombosis intravaskular akibat dari akumulasi bekuan darah dalam pembuluh darah. Salah satu komponen protein utama pembekuan darah adalah fibrin, fibrin berasal dari fibrinogen dan trombin (Thokchom and Joshi, 2014). Fibrin dapat menumpuk didalam pembuluh darah pada keadaan tidak seimbang atau tidak sehat seperti pada kondisi stress, kelebihan berat badan dan pola makan tinggi lemak dalam jangka waktu tertentu sehingga mengakibatkan trombosis. Trombosis adalah terjadinya penumpukan yang disebut trombus, trombus dapat didegradasi oleh enzim fibrinolitik (Deng *et al.*, 2018; Kotb, 2012). Mekanisme kerja fibrinolitik yaitu mengaktifkan plasminogen menjadi serin protease plasmin oleh aktivator jaringan plasminogen (tPA) dan aktivator plasminogen urokinesa (uPA) serta mendegradasi fibrin sehingga dapat melarutkan trombus (Altaf *et al.*, 2021).

Enzim fibrinolitik yang menggunakan sisi aktif serin protease untuk membentuk ikatan kovalen perantara selama proteolisis fibrin. Mekanisme kimia enzim fibrinolitik dalam mendegradasi fibrin adalah menghidrolisis ikatan peptida dari gugus karbonil hidrofobik seperti karbonil tirosin, fenilalanin, dan triptofan pada saat protein terdenaturasi. Setelah menghidrolisis ikatan peptida, proton H akan menjadi gugus pergi sehingga terjadi pembelahan ikatan dan ikatan tersebut disebut ikatan scissile. Proton dari serin dipisahkan oleh histidin sehingga histidin merupakan katalisator basa umum. Histidin juga berfungsi sebagai asam umum karena proton dari histidin yang menstabilkan nitrogen amida pada ikatan peptida. Selanjutnya muatan negatif dari aspartat menstabilkan histidin yang terprotonasi. Sehingga pada proses diatas disebut triad katalitik serin (S), aspartat (D) dan histidin (H). Setelah terjadi pemutusan ikatan peptida (katalisis kovalen), sisi aktif serin membentuk ikatan kovalen dengan karbon gugus karbonil. Selanjutnya ikatan kovalen dihidrolisis, maka enzim melepaskan substratnya untuk menjadi *Fibrin Degradation Product* (FDP) dan enzim fibrinolitik kembali ke stadium semula (Lieberman and Marks, 2008).

Agen fibrinolitik seperti urokinase, streptokinase, dan aktivator plasminogen jaringan (tPA) menghasilkan efek samping yang tidak diinginkan seperti hemoragik, retrombosis dan muntah (Shaker Hassan *et al.*, 2011; Sharkova *et al.*, 2015). Isolasi enzim fibrinolitik yang memiliki keamanan berasal dari sumber alam seperti polychaete, bakteri, jamur dan alga (Barros *et al.*, 2020). Selain itu, enzim fibrinolitik juga berasal dari mikroorganisme, tumbuhan, hewan dan produk fermentasi. Salah satu sumber enzim fibrinolitik yang paling penting yaitu mikroorganisme terutama pada golongan *Bacillus sp.* Sifat dari mikroorganisme dalam mendegradasi fibrin memiliki potensi yang besar untuk menyembuhkan trombosis karena tingginya kecepatan mikroorganisme dalam mendegradasi fibrin (Altaf *et al.*, 2021). Enzim fibrinolitik dari makanan fermentasi yang menggunakan mikroorganisme antara lain yaitu natto, tempe, kecap ikan, douchi dan jamur medis (Deng *et al.*, 2018). Selain mikroorganisme sebagai penghasil enzim fibrinolitik, tanaman juga dapat menghasilkan enzim fibrinolitik (da Silva *et al.*, 2020).

Tanaman merupakan salah satu sumber protease yang sering digunakan (da Silva *et al.*, 2020). Bagian tanaman yang sering digunakan sebagai obat herbal yaitu daun, biji, ranting, batang, kulit kayu, kayu, getah, buah, bunga, akar serta rimpang (Boddupally and Sushma, 2018; Hussain *et al.*, 2016). Pada tanaman *Brownea grandiceps*, *Paris bashanensis* dan *Scoparia dulcis L* (Sapu Manis) dilaporkan dapat memberikan aktivitas fibrinolitik (Ebrahimi *et al.*, 2020). Selain itu, pada penelitian sebelumnya tanaman *Ocimum sanctum*, *Curcuma longa*, *Azadirachta indica* dan *Anacardium occidentale* telah dibuktikan dengan *clot lysis* memiliki aktivitas fibrinolitik. Nilai *clot lysis* yang didapatkan secara berurutan yaitu $30,01 \pm 6,168\%$; $32,94 \pm 3,663\%$; $27,47 \pm 6,94 \%$ dan $33,97 \pm 2,926\%$ dengan kontrol positif Streptokinase $86,2 \pm 10,7\%$ (Khan *et al.*, 2011).

Clot lysis merupakan parameter dari uji aktivitas fibrinolisis. Prinsip dari *clot lysis* yaitu melihat berapa banyak retraksi bekuan darah saat inkubasi sehingga kemampuan fibrinolisis bahan yang diuji dapat diketahui. *Clot lysis* dinyatakan dalam persentase (%) fibrinolisis yaitu kemampuan suatu bahan atau zat dalam melisiskan bekuan (Rohmah *et al.*, 2019). Selain menggunakan *clot lysis* juga bisa menggunakan *fibrin plate*, seperti pada penelitian oleh Rafiga yang menguji aktivitas fibrinolitik dari tempe sebagai makanan fermentasi menggunakan *fibrin plate* dengan hasil setiap *fibrin plate* menunjukkan positif (Rafiga and Poernomo, 2020).

Makanan fermentasi seperti tempe melibatkan beberapa mikroorganisme seperti jamur berfilamen, bakteri dan ragi. Adapun jamur berfilamen yang digunakan untuk fermentasi tempe yaitu *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus rhizopodiformis*, *Rhizopus chinensis*, *Mucor sp* dan *Rhizopus oryzae*. Mikroorganisme dalam menfermentasi tempe akan mengeluarkan enzim proteolitik sehingga protein diubah menjadi peptida. Beberapa jamur berfilamen telah terbukti memiliki protease dengan aktivitas enzim fibrinolitik seperti *Aspergillus ochraceus*, *Rhizopus chinensis*, *Lunatus cochliobolus*, *Fusarium sp.* dan *Penicillium chrysogenum* (Poernomo *et al.*, 2015; Tamam *et al.*, 2019). Pada penelitian sebelumnya *Rhizopus chinensis* telah dilaporkan memiliki aktivitas enzim fibrinolitik (Valério *et al.*, 2021). Selain itu, pada penelitian Poernomo tahun 2015 melaporkan bahwa tempe kedelai hitam yang difermentasi dengan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 yang difermentasi selama 43 jam dengan suhu $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ menghasilkan enzim fibrinolitik. Hasil dari crude enzyme kedelai hitam pada uji proteolitik yang dibandingkan dengan nattokinase yaitu 112,36% (1,12 kali lebih besar dari nattokinase) dan untuk aktivitas fibrinoliknya jika dibandingkan dengan kontrol positif yaitu nattokinase mendapatkan hasil 88,14% (0,88 kali lebih kecil dari nattokinase) (Poernomo *et al.*, 2015).

Tempe merupakan makanan tradisional Indonesia yang memiliki banyak manfaat dan berasal dari kedelai. Selain dari kedelai, tempe juga bisa berasal dari kacang – kacangan seperti kacang tanah, kacang merah, kacang hijau dan kacang tholo (Ayun, 2021; Poernomo *et al.*, 2015). Tanaman jenis polong–polongan seperti diatas memiliki sumber protein yang tinggi, serta terdapat lemak dan karbohidrat. Kualitas protein pada kacang–kacangan tergantung pada susunan asam aminonya, umumnya kacang–kacangan memiliki kelebihan asam amino esensial lisin (Jayanti, 2019). Salah satu contoh polong – polongan yaitu buncis (*Phaseolus vulgaris*), pada penelitian sebelumnya buncis dilaporkan memiliki aktivitas proteolitik sehingga memiliki potensi untuk produksi enzim fibrinolitik (Karmous *et al.*, 2012).

Buncis (*Phaseolus vulgaris*) merupakan salah satu tanaman polong–polongan yang memiliki nilai gizi tinggi yaitu kaya protein dan rendah lemak serta memiliki sifat fungsional. Kandungan utama dari buncis yaitu karbohidrat, vitamin, lektin, serat larut, asam fenolat, flavonoid, dan proanthocyanidins (Yang *et al.*, 2018). Adapun kandungan dari buncis yaitu protein sebesar 22,7%, karbohidrat sebanyak 57,7%, serat pangan sebesar 18,8%, lemak sebesar 1,0%, mineral sebesar 3,5%,

vitamin A, vitamin B1, vitamin B2, niasin serta memiliki kadar indeks glikemik yang rendah (Kusnandar *et al.*, 2020). Selain itu, buncis memiliki aktivitas biologis dari kandungannya seperti senyawa fenolik, peptida, tokoferol, asam amino, serat makanan, asam lemak tak jenuh, mineral (Ca 3%, Fe 0,4%, dan Zn 0,35%)(Los *et al.*, 2018). Pada penelitian sebelumnya dari *Phaseolus radiatus* yang dijadikan natto dan difermentasi menggunakan *Bacillus subtilis* menghasilkan aktivitas fibrinolitik yang sangat tinggi dengan menghasilkan 2 protease, salah satunya yaitu protease serin. Fermentasi menggunakan SSF (*Solid State Fermentation*) pada suhu 121 °C selama 1 jam (Chang *et al.*, 2012).

Fermentasi digambarkan dengan adanya proses biologi yaitu pemecahan substrat yang menghasilkan produk oleh mikroba. Selama proses fermentasi strain mikroorganisme dapat menggunakan bakteri, jamur dan campuran mikroorganisme. Proses fermentasi dianggap menguntungkan karena suhu saat proses fermentasi lebih rendah, tekanan yang rendah serta tidak menggunakan bahan–bahan kimia yang keras (Mears *et al.*, 2017). Sifat substrat yang difermentasi ditingkatkan oleh senyawa bioaktif dari fermentasi. Senyawa lain seperti karbon dioksida, etanol dan metabolit sekunder seperti faktor pertumbuhan dan enzim dilepaskan saat fermentasi berlangsung (Hussain *et al.*, 2016). Bakteri merupakan pilihan pertama untuk fermentasi cair. Pada jamur sering digunakan untuk fermentasi padat atau *Solid State Fermentation* (SSF) (Kotb, 2012).

Solid State Fermentation (SSF) atau fermentasi padat tidak melibatkan air atau penggunaan air yang minimal dalam proses fermentasinya oleh mikroorganisme. Fermentasi padat digambarkan pada permukaan padat yang dapat menyerap air, disitulah sebagian besar proses fermentasi oleh mikroba terjadi. Mikroorganisme pada fermentasi padat dilihat dari kemampuan substrat padat yang didegradasinya. Mikroorganisme yang digunakan biasanya jamur berfilamen karena memiliki kemampuan fisiologis yang netral dan pertumbuhan miseliumnya. Substrat pada fermentasi padat yang tinggi protein (nitrogen) terutama penting dalam fermentasi mikroba. Selain itu, dibutuhkan nutrisi lain seperti mineral, karbohidrat, karbon sehingga dapat memproduksi enzim seperti protease, lipase dan metabolit sekunder (Webb and Manan, 2017). Penelitian sebelumnya, buncis difermentasi padat oleh *Bacillus amyloliquefaciens* LSSE–62 yang dijadikan makanan natto menghasilkan enzim fibrinolitik. Selain itu, dilakukan juga uji radikal bebas DPPH

yang menunjukkan konsentrasi penghambat untuk fermentasi ekstrak buncis yaitu 4,79 (0,02 mg/mL) dan untuk ekstrak buncis yaitu 15,20 (0,35 mg/mL). Sehingga disimpulkan fermentasi dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Wei *et al.*, 2011).

Kondisi fermentasi seperti pH pada saat fermentasi, jumlah inokulum, kecepatan pengocokan, waktu fermentasi serta komposisi nutrisi pada media (sumber nitrogen, karbon dan garam anorganik) akan mempengaruhi hasil fermentasi. Selain itu, jumlah oksigen selama fermentasi, CO₂ yang terlarut akan mempengaruhi hasil fermentasi. Evaluasi waktu fermentasi dilakukan karena memiliki efek yang penting pada metabolit yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Ni *et al.*, 2021; Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Pada penelitian sebelumnya natto kacang merah difermentasi dengan *Bacillus subtilis* pada perbedaan waktu fermentasi 24, 48, 72 dan 96 jam untuk menguji aktivitas fibrinolitik pada fibrin *plate*. Semakin lama waktu fermentasi menghasilkan peningkatan aktivitas fibrinolitik, sehingga natto kacang merah pada 96 jam memiliki aktivitas fibrinolitik yang paling tinggi (Chang *et al.*, 2012). Pada *Rhizopus oligosporus* yang difermentasi pada media *Anacardium othonianum* Rizz dengan variasi waktu fermentasi 30 dan 32 jam. Pada fermentasi dengan waktu 32 jam memiliki aktivitas antioksidan dan kandungan protein yang lebih tinggi (Lima *et al.*, 2021).

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian kali ini yaitu proses optimasi waktu fermentasi biji Buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010. Penelitian ini untuk mengetahui produksi protease fibrinolitik yang dimiliki oleh Buncis (*Phaseolus vulgaris*) dan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 yang merupakan inovasi dari penelitian yang sudah ada. Sehingga dengan adanya penelitian ini dapat menjadi informasi mengenai enzim fibrinolitik untuk alternatif pengobatan penyakit kardiovaskular.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fermentasi biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dapat meningkatkan aktivitas fibrinolitik ?
2. Apakah waktu fermentasi dapat mempengaruhi peningkatan hasil produksi enzim fibrinolitik dari biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 ?
3. Apakah fermentasi biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dapat menghasilkan aktivitas enzim fibrinolitik yang linier dengan aktivitas trombolitik ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan bahwa fermentasi biji Buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dapat meningkatkan aktivitas fibrinolitik
2. Membuktikan waktu fermentasi dapat mempengaruhi peningkatan hasil produksi enzim fibrinolitik dari biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010
3. Membuktikan fermentasi biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) menggunakan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dapat menghasilkan aktivitas enzim fibrinolitik yang linier dengan aktivitas trombolitiknya

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

Penelitian ini bermanfaat sebagai salah satu alternatif pengobatan trombosis pada penyakit kardiovaskular menggunakan enzim fibrinolitik dari fermentasi biji buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010

1.4.2 Bagi Institusi dan Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini bermanfaat menambah pustaka ilmiah pada institusi dan sebagai sumber informasi, penemuan ilmiah dan pustaka ilmiah tentang enzim fibrinolitik dari fermentasi biji Buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010