

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

Salah satu penyebab *Cardiovascular Diseases* (CVDs) ialah akumulasi gumpalan fibrin di pembuluh darah yang menginduksi terjadinya trombus. Fibrin merupakan komponen protein terbesar di dalam gumpalan darah yang terbentuk dari fibrinogen melalui proteolisis oleh trombin. Trombus adalah gumpalan darah abnormal di dalam pembuluh darah yang bisa terlepas dari dinding pembuluh darah dan bergerak bebas kemudian bersarang di sistem kardiovaskular yang disebut emboli. Hal ini bisa menyebabkan serangan jantung karena menghalangi aliran darah (Chandrasekaran *et al.*, 2015). Salah satu enzim yang dapat mendegradasi trombus adalah enzim fibrinolitik.

Enzim fibrinolitik yang termasuk dalam protease serin dicirikan oleh adanya kelompok serin di sisi aktif enzim. Protease adalah sekelompok enzim, yang berfungsi sebagai katalitik untuk menghidrolisis ikatan peptida dari protein dan memecahnya menjadi peptida atau asam amino bebas. Berdasarkan tempat kerjanya, protease dibagi menjadi dua kelompok yaitu endopeptidase dan eksopeptidase sedangkan berdasarkan perbedaan kelompok fungsional dan keberadaannya di sisi aktif enzim protease dibagi menjadi lima jenis yaitu protease sistein, serin, treonin, metalloprotease, dan aspartat. Dalam kondisi fisiologi yang normal, deposisi fibrin dihidrolisis oleh plasmin sebagai protease dalam proses pelarutan benang-benang fibrin yang disebut fibrinolisis untuk menghindari terjadinya trombosis (Kotb, 2012; Sharma, Chhavi Osmolovskiy dan Singh, 2021).

Proses mekanisme kimia pembentukan fibrin yaitu hidrolisis ikatan peptida pada sisi karbonil arginin, fenilalanin, tirosin, atau triptofan pada protein fibrin yang telah mengalami denaturasi. Fibrinogen, protein prekursor fibrin, terbentuk dari dua *triple* heliks yang disatukan di ujung terminal N nya. Ikatan disulfida menghubungkan peptida α dan β sedangkan peptida γ dihubungkan satu sama lain. Daerah terminal dari peptida α dan β mengandung residu glutamat dan aspartat yang bermuatan negatif sehingga saling tolak menolak. Daerah yang bermuatan negatif tersebut dipotong atau diputus oleh trombin (protease serin) sehingga

terbentuk monomer fibrin yang kemudian akan menggumpal dan membentuk bekuan fibrin yang lunak (Lieberman dan Peet, 2018).

Sedangkan untuk mekanisme kimia degradasi fibrin oleh enzim fibrinolitik diawali dengan protein substrat berikatan dengan sisi aktif enzim yaitu serin-195, histidin-57, dan aspartat-105, selanjutnya histidin bertindak sebagai katalisator basa dan mengaktifkan oksigen pada serin untuk serangan nukleofilik pada karbon karbonil, kemudian terbentuk zat antara oksianion tetrahedral yang distabilkan oleh ikatan hidrogen, selanjutnya terjadi pemutusan ikatan peptida sehingga terbentuknya zat antara asil-enzim, lalu adanya H_2O yang terbentuk akan menyerang karbon karbonil, maka terbentuk zat antara oksianion tetrahedral yang kedua, kemudian terjadi pemutusan ikatan kovalen-asil enzim oleh histidin yang berperan sebagai katalisator asam, dan akhirnya enzim melepaskan substratnya untuk menjadi *fibrin degradation products* (FDPs) dan enzim kembali ke kondisi semula (Lieberman *et al.*, 2013).

Enzim fibrinolitik juga termasuk agen trombolitik (Syahbanu *et al.*, 2020). Namun, agen trombolitik seperti *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) dan Urokinase (UK), streptokinase, alteplase, dan reteplase masih memiliki banyak kekurangan, seperti kebutuhan dosis terapeutik yang besar, harga yang mahal, waktu paruh plasma pendek, dan efek samping yang tidak diinginkan seperti pendarahan pada saluran pencernaan dan timbul alergi. Oleh karena itu, banyak peneliti mulai mencari sumber enzim fibrinolitik yang lebih murah dan lebih aman (Akhtar *et al.*, 2017; Altaf *et al.*, 2021; Khobragade *et al.*, 2018).

Enzim fibrinolitik dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Namun, terdapat kelemahan jika menggunakan hewan dan tumbuhan sebagai sumber enzim fibrinolitik. Kelemahan jika menggunakan hewan yaitu dalam penanganan dan pemeliharannya yang cukup rumit sedangkan jika menggunakan tumbuhan, dibutuhkan waktu yang relatif lama, perawatan yang rutin dan khusus serta kondisi produksi tergantung dengan musim (Lestari *et al.*, 2020). Oleh karena itu, para peneliti sedang mencari sumber enzim fibrinolitik lainnya yaitu dengan menggunakan mikroorganisme.

Protease fibrinolitik dari mikroorganisme merupakan salah satu pilihan yang baik untuk meningkatkan efikasi dan spesifisitas fibrinolitik. Penggunaan mikroba memiliki keuntungan yang lebih tinggi dibandingkan dengan tumbuhan dan hewan antara lain kemudahan untuk menumbuhkan sel mikroba, dapat mengatur kondisi

dan mengimplementasikan rekayasa genetika sehingga pertumbuhan dan skala produksi dapat berlangsung relatif cepat karena tidak tergantung musim. (Khobragade *et al.*, 2018; Lestari *et al.*, 2020; Mehdi *et al.*, 2018).

Mikroba penghasil enzim fibrinolitik diantaranya berasal dari bakteri seperti *Staphylococcus aureus* yang menghasilkan staphylokinase (Noori dan Aziz, 2020), *Bacillus subtilis* D21-8 (Pan *et al.*, 2019), jamur dari genus *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, dan *Mucor* (Altaf *et al.*, 2021), dan alga seperti *Chlorella vulgaris* (Páblo Eugênio da Costa e *et al.*, 2017), *Arthospira platensis* (Barros *et al.*, 2020), dan lain-lain.

Sel-sel mikroba membutuhkan suatu substrat untuk tumbuh, melakukan biosintesis, dan berkembangbiak yang disebut media. Oleh karena itu, terdapat syarat yang perlu dipenuhi oleh media yang baik untuk kehidupannya diantaranya yaitu media yang mengandung semua unsur hara yang dibutuhkan oleh mikroba terutama karbon karena membutuhkan jumlah besar dan nitrogen, mempunyai karakteristik sifat fisikokimia yang sesuai, serta harus dalam kondisi steril. Terdapat dua kelompok besar media yaitu *defined media* dan *complex media*. Tumbuhan merupakan salah satu contoh dari *complex media* (Madigan *et al.*, 2021).

Helianthus annuus L. menjadi salah satu pilihan *complex media* terbaik untuk kehidupan mikroba. *Helianthus annuus* L. terutama bagian biji dan bunganya paling banyak dikonsumsi oleh masyarakat dunia. Produksi minyak dari biji *Helianthus annuus* L. menduduki posisi ketiga di dunia setelah kedelai dan kacang tanah. Produktivitas kedelai sebagai bahan baku tempe terus menurun dari tahun ke tahun sehingga impor kedelai di Indonesia terus meningkat (Pujiwati *et al.*, 2022), hal ini menjadi alasan untuk mulai mencari alternatif lain untuk pembuatan tempe. Biji *Helianthus annuus* L. memiliki persentase karbon sebanyak 44,23% dan persentase nitrogen sebanyak 0,41% dengan kandungan lain yang bermanfaat, rendah faktor alergi, dan senyawa beracun. Biji *Helianthus annuus* L. kaya akan minyak, protein, asam amino, polifenol, vitamin, dan mineral. Kandungan protein pada biji *Helianthus annuus* L. hingga 20%. *Helianthus annuus* L. menjadi sumber protein nabati yang penting serta mudah untuk dijumpai dibandingkan kedelai (Grasso *et al.*, 2020; Karefyllakis *et al.*, 2019; Perea Moreno, 2018). Biji *Helianthus annuus* L. memiliki total aktivitas dari *crude* protease sebesar 3153,40 U (Mehdi *et al.*, 2018).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Winarti (2020), biji *Helianthus annuus* L. dapat difermentasi menjadi tempe yang dapat dikonsumsi dan disukai oleh konsumen (Winarti dan Wicaksono, Luqman, 2020). Berdasarkan banyaknya kandungan yang bermanfaat dan adanya potensi enzim fibrinolitik pada biji *Helianthus annuus* L., diharapkan fermentasi dari biji *Helianthus annuus* L. yang termasuk pada *Fermentation Herbal Medicine* (FHM) bisa memberikan hasil yang lebih optimal terkait enzim fibrinolitik.

Dibandingkan dengan biji yang tidak difermentasi, bioaktivitas yang terkandung dalam biji seperti fenolat alami, asam amino, monakolin K, GABA, vitamin, dan peptida akan meningkat apabila dilakukan fermentasi. Kandungan tersebut dapat memberikan aktivitas sebagai anti depresan, hepatoprotektif, antikanker, laksatif, neuroprotektif, antioksidan, dan antihipertensi. Sehingga fermentasi biji yang dapat dikonsumsi merupakan sumber bahan alami yang bermanfaat dan direkomendasikan sebagai pangan fungsional yang dapat dikonsumsi setiap hari serta dapat mencegah berbagai penyakit kronis (Gan *et al.*, 2017). Pada penelitian yang dilakukan oleh Melo, 2020, fermentasi biji coklat (*Theobroma cacao* L.) yang dilakukan selama 48 jam menghasilkan aktivitas antioksidan dan senyawa bioaktif yang tinggi dan bermanfaat untuk produksi pangan atau coklat fungsional (Melo *et al.*, 2021).

Fermentasi didefinisikan sebagai proses pemecahan molekul organik menjadi molekul yang lebih sederhana yang dilakukan oleh mikroorganisme (Sharma *et al.*, 2020). Dari pemecahan molekul organik ini akan didapatkan suatu energi yang diperoleh dari proses katabolisme (Van Campenhout, 2021). Penggunaan teknik fermentasi memiliki banyak manfaat, seperti meningkatkan sifat fisikokimia beserta nilai gizi makanan (Pi *et al.*, 2021). Untuk mencapai hasil yang sempurna, proses fermentasi memerlukan optimasi kondisi proses fermentasi seperti jenis media, suhu fermentasi, pH media, pelarut yang digunakan, dan waktu inkubasi (Hussain *et al.*, 2016).

Salah satu teknik fermentasi yang banyak digunakan karena memiliki keuntungan yang tinggi dari sektor industri dan ekonomi adalah SSF (*Solid-state fermentation*). Pada teknik SSF digunakan konsentrasi produk yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan metode SmF (*Submerged Fermentation*) sehingga memungkinkan produk sampingan beserta produk residu sebagai substrat untuk

digunakan kembali dengan hasil yang tinggi dan pemulihan produk yang lebih mudah (Escaramboni *et al.*, 2021).

Metode SSF banyak digunakan untuk memproduksi protease dan amilase oleh jamur dari genus *Rhizopus* dan *Aspergillus* (Escaramboni *et al.*, 2021). Pada penelitian ini digunakan salah satu jenis *Rhizopus sp.* yaitu *Rhizopus oligosporus* untuk proses fermentasi. *Rhizopus oligosporus* merupakan jamur yang digunakan untuk meningkatkan kualitas makanan dan kesehatan manusia. *Rhizopus oligosporus* menghasilkan protease ekstraseluler yang berkontribusi pada hidrolisis protein dan pelepasan asam amino bebas (Polanowska *et al.*, 2020). Selain itu, *Rhizopus oligosporus* menghasilkan lipase, alfa-amilase, glutaminase, alpha-galactosidase, dan selulase (Annisa *et al.*, 2020). Waktu inkubasi memengaruhi metabolit dan aktivitas yang dihasilkan dari proses fermentasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Poernomo *et al.*, 2017, waktu inkubasi fermentasi tempe kedelai hitam dengan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 selama 72 jam menghasilkan aktivitas fibrinolitik dan trombolitik yang relatif tinggi (Poernomo *et al.*, 2017).

Rhizopus oligosporus merupakan jamur yang paling sering digunakan pada fermentasi tempe di Indonesia (Huang *et al.*, 2019). Pada penelitian yang dilakukan oleh Nurholipah, 2021, dibandingkan dengan *R. oryzae*, *R. oligosporus* tumbuh dengan lebat dan cepat pada inokulum tempe (Nurholipah, 2021). Selanjutnya, pada penelitian yang dilakukan oleh Poernomo *et.al.*, 2015, tempe dari kedelai hitam yang difermentasi oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 menunjukkan adanya aktivitas enzim fibrinolitik yang dilihat dari terbentuknya zona jernih pada cawan petri (Poernomo *et al.*, 2015).

Aktivitas enzim fibrinolitik dapat diukur dengan berbagai macam metode, diantaranya yang paling umum adalah dengan uji in vitro yaitu *whole blood clot lysis test* dan *fibrin plate*. Proses pembekuan darah dan fibrinolisis dipengaruhi oleh adanya komponen sel darah, tepatnya pada sel darah merah yang dapat mempengaruhi waktu lisis dengan membatasi ruang fibrin dimana plasmin dapat masuk ke dalamnya (Ilich *et al.*, 2017; Pinantoan *et al.*, 2021). Uji *whole blood clot lysis test* dilakukan pada darah uji dan hasil dari uji *whole blood clot lysis test* didapatkan dari perhitungan persentase degradasi bekuan darah (*clot lysis*) (Ilich *et al.*, 2017).

Metode *fibrin plate* yaitu dengan mengukur diameter dari zona yang jernih pada cawan petri. Media metode *fibrin plate* dibuat dengan mencampurkan

fibrinogen, NaCl, dan *agarose*, yang kemudian akan dibuat sumur didalamnya. Kemudian dimasukkan larutan protein dari ekstrak enzim dengan perbandingan tertentu. Terbentuknya zona jernih disekitar sumur menunjukkan adanya pemecahan protein yang oleh enzim fibrinolitik. Aktivitas fibrinolitik yang didapatkan perlu dibandingkan dengan kurva standar yang didapat dari aktivitas fibrinolitik enzim pada konsentrasi yang berbeda. Selain itu, aktivitas fibrinolitik juga ditunjukkan dengan indeks fibrinolitik yaitu hasil bagi antara diameter zona jernih dengan diameter koloni mikroorganisme (Ilich *et al.*, 2017; Lestari *et al.*, 2020; Pinantoan *et al.*, 2021).

Untuk mengetahui perubahan yang terjadi akibat proses fermentasi selain peningkatan aktivitas proteolitik, fibrinolitik, dan trombolitik, uji SDS-PAGE yang merupakan singkatan dari *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* yaitu metode uji elektroforesis dengan prinsip pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya (Hidayat *et al.*, 2018) dan uji proksimat yang merupakan uji untuk mengetahui kadar air, abu, karbohidrat, protein, dan lemak dilakukan pada penelitian ini. Kedua uji tersebut dilakukan untuk melihat adanya perubahan berat molekul protein dan kandungan lainnya akibat proses fermentasi.

Penelitian ini dibuat untuk mengetahui aktivitas in-vitro enzim fibrinolitik biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi penemuan baru terkait sumber enzim fibrinolitik dari makanan fermentasi sehingga nantinya bisa dimanfaatkan dengan optimal dalam hal meningkatkan kualitas kesehatan masyarakat terutama dalam pengobatan CVDs.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dapat meningkatkan aktivitas enzim fibrinolitik dibandingkan dengan biji *Helianthus annuus* L. tanpa fermentasi dan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA)?
2. Apakah waktu fermentasi dapat mempengaruhi aktivitas enzim fibrinolitik pada hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010?

3. Berapa lama waktu fermentasi optimum yang dapat menghasilkan produksi enzim fibrinolitik maksimum pada hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010?
4. Berapa indeks proteolitik, indeks fibrinolitik, dan indeks trombolitik yang didapatkan dari hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010?

1.3 Tujuan

1. Membuktikan adanya peningkatan aktivitas enzim fibrinolitik pada fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dibandingkan dengan biji *Helianthus annuus* L. tanpa fermentasi dan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA).
2. Membuktikan adanya pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas enzim fibrinolitik pada fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010.
3. Memperoleh lama waktu fermentasi optimum yang dapat menghasilkan aktivitas enzim fibrinolitik maksimum dari hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010.
4. Memperoleh indeks proteolitik, indeks fibrinolitik, dan indeks trombolitik dari hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Perkembangan Ilmu Pengetahuan

Melalui penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber data ilmiah mengenai aktivitas enzim fibrinolitik dari hasil fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010.

1.4.2 Bagi Institusi

Melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah sumber pustaka untuk mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya pada bidang farmasi dan dapat mengharumkan nama baik institusi.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Melalui penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan masyarakat terkait produk fermentasi dari biji *Helianthus annuus* L. sebagai salah satu alternatif pengobatan CVDs.