

SKRIPSI

**PENENTUAN pH DAN SUHU OPTIMUM UNTUK
FERMENTASI BIJI *Helianthus annuus* L. OLEH *Rhizopus
oryzae* FNCC 6011 PADA PRODUKSI AGEN TROMBOLITIK**



MAHJATUL GHALIYAH

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA

DEPARTEMEN ILMU KEFARMASIAN

SURABAYA

2022

LEMBAR PENGESAHAN

**PENENTUAN pH DAN SUHU OPTIMUM UNTUK
FERMENTASI BIJI *Helianthus annuus* L. OLEH *Rhizopus*
oryzae FNCC 6011 PADA PRODUKSI AGEN TROMBOLITIK**

SKRIPSI

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

2022

Oleh:

**Mahjatul Ghaliyah
NIM: 051811133209**

**Skripsi ini telah disetujui
Pada tanggal 12 Agustus 2022 oleh:**

Pembimbing Utama



Dr. apt. Achmad Toto Poernomo, M.Si

NIP. 195909181987101001

Pembimbing Serta



Prof. Dr. apt. Bambang Tri Purwanto, M.Si

NIP. 195710061985031003

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Mahjatul Ghaliyah

NIM : 051811133209

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

Penentuan pH dan Suhu Optimum Untuk Fermentasi Biji *Helianthus annuus* L. Oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 Pada Produksi Agen Trombolitik

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, 12 Agustus 2022

.buat Pernyataan,



Mahjatul Ghaliyah

NIM. 051811133209

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Mahjatul Ghaliyah

NIM : 051811133209

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

Penentuan pH dan Suhu Optimum Untuk Fermentasi Biji *Helianthus annuus* L. Oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 Pada Produksi Agen Trombolitik

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, 12 Agustus 2022

buat Pernyataan,



Mahjatul Ghaliyah

NIM. 051811133209

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul “**Penentuan pH dan Suhu Optimum Untuk Fermentasi Biji *Helianthus annuus* L. Oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 Pada Produksi Agen Trombolitik**” ini dapat terselesaikan. Dalam penulisan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan, dorongan serta doa yang dipanjatkan secara tulus dan ikhlas oleh orang-orang terdekat, hingga akhirnya semua berjalan lancar. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. apt. Achmad Toto Poernomo, M.Si. selaku pembimbing utama dan Prof. Dr. apt. Bambang Tri Purwanto, M.Si. selaku pembimbing serta yang dengan tulus, ikhlas, dan sabar dalam memberikan bimbingan, saran, dan waktu dalam penyusunan skripsi.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, S.E., M.T., Ak. selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan Pendidikan Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
3. Prof. apt. Junaidi Khotib, S.Si., M. Kes., PhD. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas yang lengkap selama menempuh pendidikan program sarjana dan melakukan penelitian skripsi ini.
4. Dr. apt. Juni Ekowati, M.Si. selaku Ketua Departemen Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan bekerja di laboratorium sehingga mempermudah untuk menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Dr. apt. Amirudin Prawita, M.S. dan Prof. Dr. apt. Sudjarwo, M.S. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan kritik yang berguna untuk menyempurnakan skripsi ini.
6. Prof. Dr. apt. Bambang Tri Purwanto, M.Si. selaku dosen wali yang selalu mengarahkan, membimbing, dan memberikan motivasi selama menuntut ilmu di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
7. Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas ilmu yang diberikan selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan sarjana Farmasi.
8. Skripsi ini saya persembahkan untuk keluarga saya, terutama ibu saya Yulianti yang tiada henti selalu menyemangati dan mendoakan saya sehingga saya dapat

menyelesaikan skripsi ini. Ayah saya, alm Gupron bin muktadi, adik saya Ahmad Azharuddin Gopur, dan juga nenek saya.

9. Pak Bakir selaku laboran Lab Mikrobiologi yang banyak membantu dalam proses penyusunan skripsi ini.
10. Teman skripsi, Adinda Aulia Rosdiyanti dan Fursotul Farah, yang selalu membantu dan mendukung penulis selama proses penyusunan skripsi ini.
11. Teman “au ah” (Adinda, Nadhira, Dicky, Kyrana, Ludwina, Melissa, Nafita, Namira, Nia, dan Rio) yang selalu mendukung dan memberikan semangat selama proses penyusunan skripsi ini.
12. Teman-teman kelas A yang telah mendukung dan memberikan semangat selama menjaalani perkuliahan.
13. Sahabat penulis dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu kelancaran penelitian skripsi ini.

Akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dan berharap semoga skripsi ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi kepada semua pihak. Penulis hanyalah manusia biasa yang tidak luput dari kesalahan, begitu juga dalam proses penulisan skripsi ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik untuk memperbaiki kekurangan skripsi ini.

Surabaya, 12 Agustus 2022

Penulis

RINGKASAN

Penentuan pH dan Suhu Optimum Untuk Fermentasi Biji *Helianthus annuus* L. Oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 Pada Produksi Agen Trombolitik

Mahjatul Ghaliyah

Trombolitik adalah proses pemecahan gumpalan darah (trombus). Trombus dapat disebabkan karena adanya akumulasi fibrin. Trombus dapat menghambat aliran darah dengan menghalangi pembuluh darah sehingga jaringan aliran darah dan oksigen tidak normal. Jika tidak segera dihilangkan, jaringan yang biasanya disuplai oksigen melalui pembuluh darah akan mati atau rusak parah. Hal ini dapat menyebabkan detak jantung menjadi tidak teratur, lalu dapat terjadi henti jantung, dan juga berakibat dengan kematian (Emran *et al.*, 2015; Kotb, 2012). Saat ini tersedia agen trombolitik untuk tujuan terapeutik yaitu sebagian besar aktivator plasminogen, seperti tipe jaringan aktivator plasminogen (t-PA), plasminogen tipe urokinase aktivator (UK), dan aktivator plasminogen yang diperoleh dari sumber bakteri, seperti streptokinase (SK) (Jong-Suk, 2006). Akan tetapi agen trombolitik tersebut memiliki kekurangan yaitu dapat menyebabkan pendarahan. Selain itu, agen ini juga memiliki waktu paruh yang pendek dan biaya yang tinggi (Kotb, 2012). Sehingga perlu mencari alternatif sumber agen trombolitik, salah satunya yaitu dengan menggunakan agen trombolitik yang berasal dari tanaman.

Tanaman yang mempunyai aktivitas trombolitik biasanya mempunyai kandungan protein yang tinggi. Salah satu tanaman yang memiliki kandungan protein yang besar yaitu *Helianthus annuus* L. (Bunga Matahari) (Bashir *et al.*, 2015). Sumber agen trombolitik lainnya yaitu berasal dari mikroorganisme seperti *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, yang memiliki protease (Sada, 2021). Kedua sumber agen trombolitik ini dikombinasikan dengan cara proses fermentasi. Fermentasi adalah proses untuk mendapatkan metabolit primer dan sekunder dari tumbuhan melalui aktivitas metabolisme mikroorganisme. Mikroorganisme dapat memicu kerusakan dinding sel tumbuhan dan melakukan proses biotransformasi dari senyawa aktif tanaman tersebut, sehingga mendapatkan metabolit yang lebih besar dan

spesifik (Singh, 2017). Jenis fermentasi yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu *Solid State Fermentation* (SSF) karena sangat cocok untuk produksi enzim oleh jamur. (Nascimento *et al.*, 2015). Dalam proses fermentasi terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi seperti mineral, gula, oksigen, pH, media, CO₂, tekanan udara, suhu, dan kelembapan (Gan *et al.*, 2017; Widyastuti and Hidayat, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pH dan suhu yang optimum dalam produksi agen trombolitik yang maksimum dari hasil fermentasi *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011. Sehingga hasil dari penelitian ini dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi senyawa pada *Helianthus annuus* L. yang berperan dalam aktivitas trombolitik.

Penelitian ini dimulai dengan peremajaan *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 pada media *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) miring. Selanjutnya dibuat suspensi *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk membentuk massa sel. Kemudian menyiapkan media fermentasi dari biji bunga matahari yang disemprotkan suspensi *Rhizopus oryzae* FNCC 6011. Selanjutnya dilakukan proses fermentasi dengan variasi suhu (30°C, 35°C, dan 40°C) dan variasi pH suspensi *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 (5,7, dan 8). Proses fermentasi ini dilakukan selama 42 jam.

Tahap selanjutnya, melakukan uji proteolitik dan uji fibrinolitik. Uji proteolitik menggunakan media *Skim Milk Agar* (SMA), sedangkan untuk uji fibrinolitik menggunakan media *fibrin plate*. Uji proteolitik dan uji fibrinolitik dilakukan untuk melihat apakah *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, *Helianthus annuus* L., dan hasil fermentasi dapat mendegradasi protein pada *Skim Milk Agar* (SMA) dan fibrin pada *fibrin plate*. Dari hasil penelitian, didapatkan zona jernih atau hasil positif dari *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, *Helianthus annuus* L., dan hasil fermentasi pada *Skim Milk Agar* (SMA) dan *fibrin plate*. Dapat disimpulkan, *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, *Helianthus annuus* L., dan hasil fermentasi memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik.

Selanjutnya, untuk dapat mengetahui aktivitas agen trombolitik yang terdapat pada *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, *Helianthus annuus* L., dan hasil fermentasi, dapat dilakukan dengan melihat nilai *clot lysis*. Untuk nilai *clot lysis* dilakukan pengukuran jumlah sel darah yang terlepas saat sel darah merah yang terkandung dalam bekuan fibrin terkena agen trombolitik dan akhirnya terjadi proses lisis (de Lange *et al.*, 2012). Dari hasil pengujian dan perhitungan statistik, didapatkan aktivitas trombolitik maksimum pada hasil fermentasi

dengan pH 8 suhu 35°C. Hal tersebut disebabkan karena pengaruh pH dan suhu yang optimum pada fermentasi biji bunga matahari.

Untuk menunjang hasil penelitian ini, maka dilakukan uji proksimat dan uji elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE. Hasil dari uji proksimat yaitu terdapat penurunan jumlah kandungan protein, karbohidrat, dan abu sebelum dan sesudah fermentasi. Sedangkan untuk jumlah kandungan lemak dan air mengalami peningkatan dari sebelum dan sesudah fermentasi biji bunga matahari. Untuk uji elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE dilakukan untuk memisahkan molekul protein berdasarkan ukuran molekul. Hasil yang didapatkan dari uji elektroforesis ini, molekul protein dari hasil fermentasi memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan sebelum fermentasi.

ABSTRACT

Determination of the Optimum pH and Temperature for Fermentation of *Helianthus annuus* L. Seeds by *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 in the Production of Thrombolytic Agents

Mahjatul Ghaliyah

Thrombolytic agents are plasminogen activators that can break down fibrin into fibrin degradation product (FDP). Thrombolytic agents can be used in the treatment of cardiovascular disease. Thrombolytic agents can be obtained from microorganisms such as *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 and from plants such as *Helianthus annuus* L. The source of these thrombolytic agents can be combined through a fermentation process to enhance its therapeutic effect. Fermentation mediated by microorganism has been shown to enhance the therapeutic efficacies of some plants. This research aimed to determine the optimum fermentation pH and temperature to produce maximum thrombolytic activity of the fermented product *Helianthus annuus* L. seeds by *Rhizopus oryzae* FNCC 6011. Fermentation was carried out at various pH (5, 7, and 8) and temperature (30°C, 35°C, and 40°C) for 42 hours. The thrombolytic activity was determined using in-vitro clot lysis method. The result was analyzed using two-way ANOVA and showed a significant difference in fermentation of pH 8 and temperature 30°C and 35°C with a thrombolytic index of 131,74 and 126,18 compared to *Helianthus annuus* L. (66,30).

Keywords: Thrombolytic, *Helianthus annuus* L, *Rhizopus oryzae* FNCC 6011, pH, Temperature

DAFTAR ISI

	Halaman
Lembar Pengesahan	ii
KATA PENGANTAR.....	v
RINGKASAN.....	vii
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjauan Tentang Trombosis.....	8
2.2 Tinjauan Tentang Enzim.....	8
2.3 Tinjauan Tentang Enzim Fibrinolitik	9
2.3.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Fibrinolitik.....	10
2.3.2 Mekanisme Kerja Enzim Fibrinolitik.....	10
2.3.1 Tinjauan Metode Uji Enzim Fibrinolitik (Uji Fibrin <i>Plate</i>).....	13
2.4 Tinjauan Tentang Pembentukan Trombus.....	14
2.5 Tinjauan Tentang Agen Trombolitik	15
2.5.1 Tinjauan Tentang Protease	15
2.5.2 Penggolongan Agen Trombolitik.....	16
2.5.3 Metode Perhitungan Aktivitas Trombolitik dengan <i>Clot lysis</i>	17
2.5.4 Tanaman Penghasil Agen Trombolitik	18
2.6 Tinjauan Tentang Bunga Matahari	19
2.7 Tinjauan Tentang Jamur	20
2.7.1 Tinjauan Tentang <i>Rhizopus oryzae</i>	20
2.8 Tinjauan Tentang Fermentasi	21

2.8.1 Fermentasi Padat	21
2.8.2 Tinjauan Tentang Fermentasi Herbal	22
2.8.3 Faktor-faktor dalam Fermentasi	23
2.9 Tinjauan Uji Proksimat.....	23
2.10 Tinjauan Uji Elektroforesis.....	24
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	26
3.1. Kerangka Konseptual.....	26
3.2. Hipotesis	27
3.3. Bagan Kerangka Konseptual	28
BAB IV METODE PENELITIAN	29
4.1 Desain Penelitian	29
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
4.3 Variabel Penelitian.....	29
4.4 Bahan dan Alat Penelitian.....	30
4.5 Tahapan Penelitian.....	31
4.5.1 Preparasi Media Peremajaan Kultur	31
4.5.2 Peremajaan Kultur <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011	31
4.5.3 Pembuatan Suspensi Spora.....	32
4.5.4 Pembuatan Substrat Biji Bunga Matahari	32
4.5.5 Fermentasi Padat Biji Bunga Matahari Secara Aseptis	32
4.5.6 Optimasi Produksi Agen Trombolitik	33
4.5.7 Isolasi Enzim Kasar (<i>Crude Enzyme</i>) dan Ekstrak Kasar (<i>Crude Extract</i>)	33
4.5.8 Preparasi Media Uji Aktivitas Proteolitik (<i>Skim Milk Agar</i>).....	33
4.5.9 Uji Aktivitas Proteolitik	34
4.5.10 Preparasi Media Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik (<i>Fibrin Plate</i>).....	34
4.5.11 Uji Aktivitas Fibrinolitik (<i>Fibrin Plate</i>)	34
4.5.12 Uji Aktivitas Agen Trombolitik dengan <i>Clot Lysis</i>	35
4.5.13 Uji Proksimat.....	35
4.5.14 Uji Elektroforesis.....	37
4.6 Kerangka Operasional.....	39
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1 Preparasi Media Peremajaan (PDA)	40

5.2	Peremajaan Kultur <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011.....	40
5.3	Pembuatan Suspensi Spora	41
5.4	Pembuatan Substrat Biji Bunga Matahari.....	41
5.5	Fermentasi Biji Bunga Matahari oleh <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011	42
5.6	Uji Proteolitik Pada Media Susu Skim Agar	43
5.7	Uji Fibrinolitik pada Media <i>Fibrin Plate</i>	46
5.8	Uji Trombolitik (<i>Clot lysis</i>)	49
5.9	Uji Proksimat	51
5.10	Uji Elektroforesis	52
5.11	Analisis Data.....	54
5.11.1	Uji Normalitas	54
5.11.2	Uji Homogenitas	54
5.11.3	<i>Two Way Anova Test</i>	54
5.11.4	Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison</i> (Tukey HSD).....	54
5.11.5	<i>Homogeneous Subsets</i> (Duncan) Pada Subset Alpha = 0,05	55
5.11.6	Uji t sampel berpasangan	55
5.11.7	Kesimpulan Uji Statistik	56
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN		57
6.1	Kesimpulan	57
6.2	Saran	57
DAFTAR PUSTAKA		58
LAMPIRAN.....		66

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
II.1 Mikroorganisme yang Mengandung Enzim Fibrinolitik.....	10
II.2 Hasil dari Uji <i>Fibrin Plate</i> Beberapa Mikroorganisme.....	14
II.3 Penggolongan Agen Trombolitik Berdasarkan Perkembangan Generasi	16
II.4 Aktivitas Agen Trombolitik di Berbagai Tanaman.....	18
II.5 Kondisi Optimum Fermentasi Genus <i>Rhizopus sp.</i>	23
V.1 Hasil Uji Proteolitik	44
V.2 Hasil Uji Fibrinolitik.....	48
V.3 Hasil Uji Aktivitas Trombolitik	50
V.4 Hasil Uji Proksimat Biji Bunga Matahari Sebelum dan Sesudah Fermentasi	51
V.5 Hasil uji elektroforesis	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Mekanisme Kerja Enzim Fibrinolitik	12
2.2 Aktivasi Plasminogen Oleh Enzim Fibrinolitik.....	13
2.3 Kedua Jenis Enzim Fibrinolitik Menurut Mekanisme Kerjanya	17
2.4 Bunga dan Biji Bunga Matahari (<i>Helianthus annuus</i> L.)	19
2.5 Komposisi Nutrisi (%) dari beberapa sampel ^{*)}	24
2.6 SDS-PAGE dari enzim kasar dan nattokinase murni.	25
5.1 Pembuatan Media <i>Potatoes Dextrose Agar</i> (PDA).....	40
5.2 Hasil peremajaan <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011 pada media PDA	41
5.3 Hasil % transmitten suspensi spora <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011.....	41
5.4 Biji Bunga Matahari yang akan diinkubasi selama 42 jam	42
5.5 Hasil fermentasi biji bunga matahari selama 42 jam.....	43
5.6 Hasil pengamatan aktivitas proteolitik hasil fermentasi biji bunga matahari.....	43
5.7 Hasil pengamatan aktivitas fibrinolitik hasil fermentasi biji bunga matahari.....	46
5. 8 Hasil pengamatan aktivitas trombolitik pada semua sampel uji.....	49
5.9 Hasil uji elektroforesis menggunakan SDS-PAGE ^{*)}	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Sertifikat <i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6011	67
2 Determinasi <i>Helianthus annuus</i> L.	68
3 Hasil Uji Aktivitas Proteolitik	69
4 Uji Aktivitas Fibrinolitik	73
5 Uji Aktivitas Trombolitik	77
6 Hasil Analisis Data	80
7 Hasil Uji Proksimat.....	84
8 Hasil Uji SDS-PAGE.....	100