

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Trombolitik adalah proses pemecahan gumpalan darah (trombus). Trombus dapat disebabkan karena adanya akumulasi fibrin. Fibrin adalah komponen protein utama dari bekuan darah. Fibrin biasanya dibentuk dari fibrinogen oleh trombin. 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. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk melarutkan bekuan darah adalah dengan cara terapi trombolitik (Emran *et al.*, 2015; Kotb, 2012).

Terapi trombolitik adalah pengobatan dengan cara pemberian agen trombolitik pada pasien yang memiliki penyakit kardiovaskular. Pemberian agen trombolitik ini biasanya diberikan melalui intravena segera setelah pasien mengalami serangan jantung. 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). Agen-agen ini adalah aktivator plasmin dan dapat mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin merupakan protease serin yang dapat mendegradasi fibrin (Agrebi *et al.*, 2009).

Dalam mendegradasi fibrin, protease serin memiliki mekanisme kerja yaitu dengan pengikatan protein substrat dengan sisi aktif enzim yaitu serin-195, histidin-57, dan aspartat-105 bergerak menuju tempat yang sesuai sehingga menyebabkan elektron pada nitrogen histidine terikat dengan atom hidrogen serin. Selanjutnya histidin bertindak sebagai katalisator basa dapat mengaktifkan oksigen pada serin dengan mengambil proton yang menyebabkan oksigen semakin bersifat nukleofil. Kemudian terbentuk zat perantara oksianion tetrahedral yang distabilkan oleh ikatan hidrogen pada gugus N-H serin dan glisin. Selanjutnya terjadi pemutusan ikatan peptide akibat adanya histidine sebagai katalisator

asam. Histidin dapat menstabilkan nitrogen pada ikatan peptide dengan memberikan proton. Kemudian elektron ikatan peptida akan kembali ke nitrogen dan berikatan dengan proton dari histidine yang menyebabkan ikatan peptide terputus. Kemudian elektron pada oksianion kembali ke karbon karbonil dan membentuk ikatan rangkap. Sehingga terbentuknya zat perantara yaitu asil-enzim, pada separuh protein yang terurai memisah. Kemudian elektron pada nitrogen histidine (katalisator basa) menarik sebuah proton dari air membentuk OH⁻ yang dapat melakukan proses nukleofilik pada karbon karbonil. Maka terbentuk zat perantara oksianion tetrahedral kompleks yang kedua. Kompleks ini juga distabilkan oleh ikatan hidrogen dengan ikatan peptida glisin dan serin. Kemudian terjadi pemutusan ikatan kovalen asil-enzim akibat pemberian proton histidin (katalisator asam) kepada elektron pada ikatan antara oksigen serin dan gugus karboksil substrat, yang menyebabkan elektron oksianion kembali ke karbon membentuk ikatan rangkap dan ikatan asil enzim akan terputus. Akhirnya enzim melepaskan substratnya untuk menjadi *fibrin degradation products* (FDPs) dan enzim kembali ke kondisi semula (Lieberman and Marks, 2009). Disamping fungsinya yang dapat mendegradasi fibrin, agen trombolitik tersebut juga memiliki kekurangan.

Kekurangan dari agen trombolitik tersebut yaitu dapat menyebabkan pendarahan dan penggunaan dosis yang besar agar bisa bekerja dengan efektif. Selain itu, agen ini juga memiliki waktu paruh yang pendek dan biaya yang tinggi (Kotb, 2012). Untuk mengatasi kendala tersebut, para peneliti melakukan penelitian, salah satunya yaitu dengan menggunakan agen trombolitik mikroba.

Agan trombolitik pada mikroba, memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan tambahan pangan fungsional, dapat dijadikan obat untuk mencegah atau menyembuhkan penyakit kardiovaskular, dan diutamakan yang berasal dari makanan yang difermentasikan menggunakan mikroorganisme (Jeong *et al.*, 2017). Makanan penghasil agen trombolitik yang akan difermentasikan biasanya terbuat dari tanaman. Beberapa tanaman yang menunjukkan aktivitas trombolitik yaitu, *Trema orientalis* (Chikan), *Bacopa monnieri* (Brahmi), *Capsicum frutescens* (Lanka-marich or Marich), *Brassica oleracea* (Kembang kol), dan *Urena sinuata* (Kunjia, Kungooya) berasal dari Bangladesh (Emran *et al.*, 2015).

Tanaman yang mempunyai aktivitas trombolitik biasanya mempunyai kandungan protein yang tinggi. Kandungan protein yang tinggi pada sebuah tanaman dapat meningkatkan aktivitas agen trombolitik. Tanaman yang memiliki kandungan protein yang

tinggi dapat memicu pertumbuhan mikroorganisme penghasil agen trombolitik karena protein merupakan sumber nitrogen dan karbon yang merupakan nutrisi bagi mikroorganisme tersebut (Raju and Divakar, 2014). Salah satu tanaman yang memiliki kandungan protein yang besar yaitu *Helianthus annuus* L. (Bunga Matahari). *Helianthus annuus* L. merupakan tanaman yang termasuk dalam famili Asteraceae. Biji *Helianthus annuus* L. memiliki protein sebesar 20-30% dan karbohidrat. Selain protein, tanaman bunga matahari juga merupakan tanaman penghasil minyak terbesar ketiga di dunia (Feng *et al.*, 2021). *Helianthus annuus* L. memiliki komposisi minyak yang terdiri dari 90% oleat dan 10% asam linoleat (Mohmand, 2010). Biji *Helianthus annuus* L. memiliki enzim protease. Pada penelitian yang dilakukan oleh Mehdi *et al* tahun 2018, didapatkan hasil crude enzyme protease pada biji *Helianthus annuus* L. sebesar 3153,40 U (Mehdi *et al.*, 2018). Biji bunga matahari juga memiliki banyak manfaat yaitu sebagai antiinflamasi, antioksidan, antipiretik, dan antitumor (Bashir *et al.*, 2015). Pada penelitian yang dilakukan Winanti *et al* pada tahun 2020, berhasil melakukan fermentasi tempe biji bunga matahari dengan menggunakan ragi *Rhizopus oryzae*. Tempe hasil fermentasi tersebut memiliki protein terlarut sebesar 11,93% (Winanti and Wicaksono, luqman, 2020). Hal ini dapat dikatakan bahwa biji bunga matahari merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Maka dari itu diharapkan dapat meningkatkan agen trombolitik bersama dengan mikroorganisme yang dikombinasikan.

Agen trombolitik, yaitu salah satunya enzim fibrinolitik. Memiliki mekanisme kerja dengan cara mengkatalisis hidrolisis total protein dan secara khusus bekerja pada ikatan peptida interior. Semua sel hidup dapat menghasilkan berbagai jenis protease, tetapi mikroorganisme merupakan organisme yang paling besar memproduksi protease. Berikut adalah mikroorganisme penghasil enzim fibrinolitik yaitu *Actinomyces thermovulgaris*, *Streptomyces* sp. Y405, *Streptomyces spheroids* M8-2, *Streptomyces megasporus* SD50, *Bacillus subtilis* BK-17, *B. subtilis* A1, *B. subtilis* 168, *B. thuringiensis* IMV B-7324, *Paenibacillus* sp. IND8, *Pseudoalteromonas* sp. IND11, *Serratia* sp. KG-2-1, *Shewanella* sp. IND20, *Aspergillus ochraceus* 513, *Cochliobolus lunatus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* H9, *Fusarium pallidoroseum*, *Candida guilliermondii*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhizopus chinensis* 12, *Mucor substillissimus* UCP1262, *Codium intricatum*, *Codium latum*, dan *Rhizopus chinensis* 12. (Akhtar *et al.*, 2017). Pada penelitian yang dilakukan Sada pada

tahun 2021, didapatkan bahwa *Rhizopus oryzae* memiliki nilai aktivitas enzim fibrinolitik sebesar 1,3 U/ml pada suhu 35°C (Sada, 2021). Selain itu, *Rhizopus oryzae* juga menghasilkan protease dan amilase sebesar 1260 U/g dalam waktu 144 jam (Benabda et al., 2019). Pada penelitian yang dilakukan Omosebi dan Otunola pada tahun 2013, *Rhizopus sp* digunakan dalam pembuatan makanan hasil fermentasi yaitu tempe. Tempe yang berbahan baku kedelai, memiliki aktivitas trombolitik. Terdapat tiga varian *Rhizopus sp* yang digunakan yaitu *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, dan *Rhizopus stolonifer*. Didapatkan hasil bahwa ketiga tempe yang dihasilkan dari proses fermentasi memiliki kualitas nutrisi yang relatif tinggi dan karakteristik warna, aroma, dan tekstur yang memuaskan (Omosebi and Otunola, 2013).

Fermentasi adalah proses untuk mendapatkan metabolit primer dan sekunder dari tumbuhan melalui aktivitas metabolisme mikroorganisme. Mikroorganisme dapat memicu perusakan dinding sel tumbuhan dan melakukan proses biotransformasi dari senyawa aktif tanaman tersebut, sehingga mendapatkan metabolit yang lebih besar dan spesifik (Singh, 2017). Pada proses fermentasi, mikroorganisme yang digunakan untuk produksi dapat berupa sel bakteri, jamur, dll. Selama proses fermentasi, mikroorganisme akan memecah karbohidrat yang dapat diubah menjadi produk akhir seperti asam organik, karbon dioksida, dan alkohol (Mears et al., 2017). Selain itu, proses fermentasi juga membutuhkan protein sebagai sumber nitrogen. Nitrogen berpengaruh pada proses fermentasi dikarenakan penggunaannya untuk proses pertumbuhan mikroorganisme dan pembentukan dinding sel, serta sebagai bahan proses biosintesis pembentukan enzim (Widyastuti and Hidayat, 2018). 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). Berdasarkan sumber mikroba yang terlibat dalam proses fermentasi, terdapat dua fermentasi yaitu fermentasi alami dan diinokulasi. Terdapat dua metode proses fermentasi yang dapat digunakan, yaitu *Solid State Fermentation* (SSF) dan *Liquid State Fermentation* (LSF).

Liquid State Fermentation (LSF) merupakan proses fermentasi yang terjadi dengan adanya air (Adebo et al., 2022). Sedangkan *Solid State Fermentation* (SSF) didefinisikan sebagai fermentasi yang melibatkan padatan tanpa (atau hampir tidak ada) zat bebas air. Akan tetapi substrat yang digunakan pada proses fermentasi padat ini harus memiliki kelembapan

yang cukup untuk mendukung proses pertumbuhan dan metabolisme dari mikroorganisme. *Solid State Fermentation* (SSF) sangat cocok digunakan untuk produksi enzim oleh jamur. Hal ini dikarenakan pada proses fermentasi padat, mikroorganisme tumbuh secara alami di substrat padat seperti kayu, akar, daun tanaman, dan tanpa adanya air. *Solid State Fermentation* (SSF) memiliki beberapa keuntungan, antara yaitu biaya yang dibutuhkan cukup rendah, mencegah penghambatan biosintesis asam amino dan amonia, dan juga SSF dapat digunakan sebagai alternatif untuk penggunaan substrat dari residu agroindustri untuk mengurangi dampak negatif pada lingkungan (Nascimento *et al.*, 2015).

Pada fermentasi padat, suhu merupakan faktor yang penting. Fermentasi padat ditandai dengan eksotermik, atau melepaskan sejumlah besar panas, yang berbanding lurus dengan aktivitas metabolisme mikroorganisme, terutama fermentasi oleh filamentous jamur di mana suhu secara langsung mempengaruhi perkecambahan spora, pertumbuhan, dan pembentukan produk. Suhu juga sangat penting dalam regulasi metabolisme dan sintesis enzim. Suhu yang optimum untuk memproduksi protease melalui metode fermentasi padat adalah antara 28°C hingga 30°C. Akan tetapi, penelitian yang dilakukan oleh Nascimento *et al* pada tahun 2015, menunjukkan bahwa suhu optimum yang dibutuhkan pada fermentasi menggunakan *Mucor subullissimus* UCP 1262 melalui metode fermentasi padat adalah 25°C (Nascimento *et al.*, 2015).

Selain suhu, pH juga merupakan faktor penting dalam fermentasi. Variasi pH rendah atau tinggi juga dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi dan akan menyebabkan ionisasi pada sisi aktif enzim, ionisasi pada substrat, atau akan mempengaruhi konformasi enzim, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim (Hu *et al.*, 2019). Pada penelitian fermentasi jus melon oleh bakteri *Lactobacillus casei* yang dilakukan oleh Fonteles *et al* pada tahun 2021, didapatkan bahwa pH optimum untuk fermentasi adalah 6,1 (Fonteles *et al.*, 2012). Untuk fermentasi douchi menggunakan *Bacillus subtilis* DC27 yang dapat menghasilkan enzim fibrinolitik, didapatkan pH optimumnya yaitu pada pH 7 (Hu *et al.*, 2019).

Sampai saat ini terdapat beberapa penelitian mengenai kombinasi fermentasi tanaman oleh mikroorganisme. Kombinasi ini dapat berfungsi sebagai makanan dan juga obat-obatan. Seperti kombinasi fermentasi *Curcuma longa* oleh *Aspergillus oryzae* yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Sulasyah *et al.*, 2018). Lalu ada makanan hasil fermentasi yaitu douchi

yang difermentasi oleh *Bacillus subtilis* LD-8547, yang digunakan sebagai agen trombolitik (Yuan *et al.*, 2012).

Untuk dapat mengetahui aktivitas agen trombolitik yang terdapat pada hasil fermentasi tanaman oleh mikroorganisme, dapat dilakukan dengan melihat nilai *clot lysis* atau menggunakan metode *fibrin plate*. 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).

Untuk menunjang hasil penelitian ini, maka dilakukan uji proksimat dan uji elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE. Uji proksimat dilakukan untuk mengetahui jumlah kandung protein, lemak, karbohidrat, air, dan abu sebelum dan sesudah fermentasi biji bunga matahari (Thangaraj, 2015). Uji elektroforesis dengan menggunakan SDS-PAGE dilakukan untuk memisahkan molekul protein berdasarkan berat molekul. Tujuannya untuk mengetahui perubahan berat molekul protein yang terkandung pada biji bunga matahari sebelum fermentasi dengan biji bunga matahari yang telah mengalami fermentasi (Aristya *et al.*, 2013).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan inovasi baru dengan melakukan penelitian kombinasi melalui proses fermentasi biji *Helianthus annuus* L. oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk mengetahui adanya pengaruh lingkungan pada fermentasi untuk menghasilkan agen trombolitik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai sumber informasi untuk alternatif pengobatan penyakit kardiovaskular.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapa suhu optimum untuk fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk memproduksi agen trombolitik yang maksimum?
2. Berapa pH optimum untuk fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk memproduksi agen trombolitik yang maksimum?
3. Apakah persentase *clot lysis* yang didapatkan dari hasil fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 lebih besar dibandingkan biji bunga matahari sebelum fermentasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan suhu optimum untuk fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk memproduksi agen trombolitik yang maksimum.
2. Mendapatkan pH optimum untuk fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 untuk memproduksi agen trombolitik yang maksimum.
3. Mendapatkan persentase *clot lysis* dari hasil fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011 lebih besar dibandingkan biji bunga matahari sebelum fermentasi (*Helianthus annuus* L.).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Ilmiah

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi mengenai alternatif terapi untuk penyakit kardiovaskular dari aktivitas trombolitik yang berasal dari hasil fermentasi biji bunga matahari (*Helianthus annuus* L.) oleh *Rhizopus oryzae* FNCC 6011.

1.4.2 Diri sendiri

Penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya pada bidang farmasi dan dapat menghasilkan produk yang berguna untuk masyarakat serta memiliki nilai bisnis.

1.4.3 Masyarakat

Memberikan bahan informasi alternatif mengenai agen trombolitik yang dapat digunakan sebagai terapi penyakit kardiovaskular.