

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular (CVDs) merupakan penyakit yang berkaitan dengan gangguan pada jantung dan pembuluh darah yang menyebabkan aliran darah ke jantung dan otak berkurang. CVDs meliputi penyakit jantung koroner, penyakit serebrovaskular, penyakit arteri perifer, penyakit jantung rematik, penyakit jantung bawaan, dan trombosis vena dalam dan emboli paru. Pada tahun 2019, diperkirakan sebanyak 17,9 juta jiwa meninggal akibat CVDs, jumlah tersebut mewakili 32% dari penyebab kematian global (WHO, 2021). Salah satu penyebab CVDs adalah trombosis, yaitu pembentukan gumpalan darah di pembuluh darah yang disebut dengan trombus yang merupakan gabungan dari fibrin, trombin, dan platelet. Komponen utama dari pembekuan darah adalah fibrin yang terbentuk melalui proses proteolisis oleh trombin. Fibrin kemudian akan dihidrolisis oleh plasmin untuk mencegah trombosis di pembuluh darah menjadi produk degradasi fibrin (FDP). Namun pada kondisi ketidakseimbangan patofisiologi tubuh, mengakibatkan terjadinya trombosis karena tidak terjadi proses hidrolisis gumpalan darah. Maka dibutuhkan terapi antitrombotik untuk memecah trombus dengan pemberian sediaan enzim fibrinolitik (Kotb, 2012).

Agen trombolitik dapat berupa enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik merupakan protease yang mendegradasi fibrin, yaitu bekuan darah dari fibrinogen hasil dari proteolisis trombin, proenzim plasminogen akan diubah menjadi plasmin aktif enzim untuk melarutkan trombus, oleh karena itu plasmin disebut sebagai agen trombolitik. (Kalaiyarasi and Mubeen, 2014).

Secara kimia, proses degradasi fibrin oleh enzim fibrinolitik dapat dijelaskan sebagai berikut. Protease serin sebagai enzim fibrinolitik bertugas untuk memutuskan ikatan peptida. Fibrin sebagai substrat akan berikatan dengan sisi aktif dari serin dan histidin dari enzim fibrinolitik sehingga membentuk triad katalitik (aspartat-histidin-serin). Histidin berfungsi sebagai katalisator basa umum yang memisahkan proton dan meningkatkan nukleofilitas dari serin oksigen yang menyerang karbon karbonil. Histidin juga berfungsi sebagai katalisator asam umum. Ikatan peptida dari oksigen-

nitrogen kemudian akan terputus dan membentuk zat antara asil-enzim kovalen, dan amida pada separuh protein yang terurai memisah. Histidin kemudian akan mengaktifkan serangan nukleofilik oleh H₂O pada karbon karbonil, yang kemudian akan terbentuk zat antara tetrahedral oksianion-kompleks stadium transisi yang distabilkan oleh ikatan hidrogen dengan ikatan rangkap peptida glisin dan serin (Rodwell *et al.*, 2016)

Dalam pengobatan CVDs, agen trombolitik yang biasa digunakan untuk melarutkan bekuan darah adalah aktivator plasminogen seperti alteplase, antisterplase, t-Pa (*tissue plasminogen activator*), urokinase, dan streptokinase. Dalam terapi trombolitik, beberapa enzim tersebut dinilai kurang efektif karena dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, seperti risiko perdarahan saluran cerna saat diberikan secara oral, selain itu waktu paruhnya juga pendek serta spesifisitas fibrin yang rendah (Kotb, 2012).

Agan trombolitik banyak berasal dari hewan, tanaman, maupun mikroorganisme, namun umumnya agen trombolitik dihasilkan oleh mikroba termasuk bakteri dan jamur (Kotb, 2012). Tanaman telah digunakan sebagai sumber pengobatan utama karena menghasilkan sumber senyawa bioaktif yang dapat dikembangkan sebagai obat. Enzim protease merupakan enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan peptida pada protein banyak berasal dari tanaman yakni sebesar 43,85% yang kemudian diikuti oleh bakteri yakni sebesar 18,09% serta kapang 15,08%. (Herawati, 2020).

Hingga saat ini, banyak percobaan telah dilakukan untuk mencari senyawa atau sumber baru agen trombolitik karena agen trombolitik yang tersedia masih memiliki banyak kekurangan, termasuk kebutuhan untuk dosis besar agar efektif dan maksimal. Selain itu spesifisitas fibrin juga masih terbatas serta berisiko besar untuk terjadi perdarahan. Tanaman menyediakan sumber senyawa bioaktif yang dapat digunakan dalam pengembangan obat sebagai agen trombolitik. Potensi agen trombolitik dapat berasal dari hampir seluruh bagian dari tanaman meliputi daun, ranting, batang, kulit kayu, hingga akar dapat digunakan dan diambil ekstraknya (Kalaiyarasi and Mubeen, 2014). Beberapa tanaman di Indonesia yang berpotensi sebagai agen trombolitik antara lain *Tamarandus indica*, *Ocimum sanctum* L, *Zanthoxylum budrunga*, *Curcuma longa* L, *Camelia sinensis*, *Allium sativum*, dan *Ananas comosus* (Khan *et al.*, 2011; Al-Mamun *et al.*, 2012; Evangelista *et al.*, 2012; Sherwani *et al.*, 2013; Varadharajan, Shanmugam and Ramaswamy, 2015; Biswas *et al.*, 2017; Madhusudhan, Neeraja and

Devi, 2014). *Carica papaya* juga telah terbukti memiliki aktivitas trombolitik yang dibuktikan dengan %clot lisis sebesar 24,07% (Boddupally and Sushma, 2018)

Kacang-kacangan dikenal kaya akan kandungan gizi yang tinggi, merupakan sumber protein, karbohidrat, serat, vitamin, dan mineral. Salah satu keluarga kacang-kacangan yang tinggi akan kandungan proteinnya yaitu Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.), buncis biasa dimanfaatkan untuk sayuran diet sebagai sumber protein (Dias *et al.*, 2010). Buncis juga kaya akan kandungan kimia lain seperti antosianin, flavonoid, alkaloid, fenol, polifenol, saponin, triterpenoid, steroid, stigmasterin, trigonelin, arginin, asam amino, asparagin, kholina, tannin, dan fasin (Nugrahani *et al.*, 2016). Dalam penelitian Karmous, 2012 menyatakan bahwa buncis memiliki kandungan enzim protease yang tinggi sehingga buncis dapat berpotensi sebagai agen trombolitik (Karmous *et al.*, 2012). Chang, 2012 menyatakan bahwa keluarga *Phaseoulus* lain seperti kacang merah natto (*Phaseolus radiantus* L. var. Aurea) yang diinokulasi dengan *Bacillus subtilis* dan difermentasi selama 96 jam pada pH optimum 9, suhu optimal 60°C memiliki aktivitas fibrinolitik yang tinggi, setelah dilakukan uji *fibrin plate*, aktivitas fibrinolitik tertinggi muncul pada pH 11, namun pada suhu diatas 60°C aktivitasnya menurun secara signifikan. Kacang merah natto memiliki aktivitas fibrinolitik total sebesar 30,557 unit dengan menggunakan *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA sebagai substratnya, ekstrak kasar kacang merah natto menunjukkan bahwa natto memiliki aktivitas fibrinolitik seperti subtilisin protease serin (1529 u FA/g natto-red-bean), kacang merah natto juga dapat berpotensi sebagai antitrombotik (Chang *et al.*, 2012). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Kusnandar dkk, pada tahun 2020 menyatakan bahwa *Phaseolus vulgaris* L. mengandung protein sebesar 23,01%bk dengan komposisi yaitu asam aspartat 2,75g/100g, asam glutamat 3,71g/100g, leusin 1,80g/100g, serta lisin 1,50g/100g.,selain itu kacang merah juga tinggi akan karbohidrat (71,51%bk) (Kusnandar *et al.*, 2020). Kandungan protein yang tinggi dalam tanaman dapat meningkatkan aktivitas fibrinolitik karena merupakan sumber nitrogen dan karbon yaitu nutrisi bagi mikroorganisme untuk tumbuh (Raju and Divakar, 2014).

Selain dari tanaman, agen trombolitik juga dapat dihasilkan oleh mikroorganisme, yaitu bakteri dan jamur. Keanekaragaman mikroba alami menjadi potensi besar untuk produk bioteknologi, termasuk protease fibrinolitik. Biokimia dan fisiologis dari bakteri dan jamur menghasilkan protease fibrinolitik yang lebih baik yang berpotensi sebagai agen trombolitik. Bakteri ataupun jamur dapat tumbuh dengan cepat serta mudah diterima untuk manipulasi genetik. Selain itu, bakteri dan jamur

banyak disukai karena biaya yang relatif rendah dan dapat dengan mudah di produksi dalam skala besar karena stabilitas produk yang lebih baik (Bajaj *et al.*, 2014). Sifat enzimatik dari jamur sp. merupakan aspek baru dan sebagian besar belum diteliti. Jamur dianggap sebagai sumber agen trombolitik yang cocok karena kemampuannya untuk tumbuh pada substrat padat seperti residu limbah agroindustri. Purifikasi dari *Aspergillus ochraceus* 513 dilaporkan memiliki potensi fibrinolitik dan antikoagulan, protease serin dari *Bionectria* sp. dapat menjadi pengobatan potensial untuk penyakit trombolitik, protease alkali dan metaloprotease yang diperoleh dari strain *Aspergillus* KH 17 dan *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 memiliki potensi fibrinolitik yang kuat serta protease yang diisolasi dari *Mucor subtilissimus* UCP 1262 melalui dua pendekatan yang berbeda yaitu solid state fermentation (SSF) dan sistem dua fase berair dilaporkan memiliki potensi untuk pencegahan dan terapi trombosis (Diwan *et al.*, 2021)

Berbagai jamur telah dilaporkan sebagai penghasil protease fibrinolitik seperti *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus chinensis*, dan *Cordyceps militaris*. (Sharma *et al.*, 2020). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Poernomo, dkk pada tahun 2015 *Rhizopus oligosporus* ATCC 6010 memiliki aktivitas fibrinolitik yang merupakan agen trombolitik dengan menggunakan substrat yaitu tempe. *Rhizopus oligosporus* menghasilkan enzim proteolitik sebesar $3,07 \pm 0,15$ dengan larutan nattokinase sebagai kontrol positif dan dapar fosfat 0,05M pH 5,0 sebagai kontrol negatif. Tempe kedelai hitam difermentasikan menggunakan *Rhizopus oligosporus* selama 43 jam pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Aktivitas fibrinolitik yang dibandingkan dengan nattokinase sebagai kontrol positif memperoleh hasil 88,14% (0,88 kali lebih kecil dari nattokinase) (Poernomo *et al.*, 2015). *Aspergillus oryzae* KSK-3 yang diisolasi dari beras koji komersial untuk pembuatan miso juga telah dilaporkan menunjukkan aktivitas fibrinolitik. Aktivitas fibrinolitik maksimum diperoleh pada pH 6 pada suhu 50°C menghasilkan 2,960 U urokinase per mililiter dari kultur *broth* (Shirasaka *et al.*, 2012). *Aspergillus oryzae* yang diisolasi dengan Biji Buncis memiliki *crude enzyme protease* sebesar 439,062 U (Ao *et al.*, 2018). Enzim fibrinolitik dari *Rhizopus microspores* var. *tuberosus* yang telah dipurifikasi dan diisolasi dari daqu (agen fermentasi minuman keras Cina) juga telah dilaporkan memiliki aktivitas fibrinolitik maksimum pada suhu 37°C dan pada pH 7,0 menunjukkan ketahanan terhadap penghambat tripsin, serta mampu mempertahankan 96,1% aktivitasnya setelah di inkubasi selama 4 jam (Zhang *et al.*, 2015)

Fermentasi adalah proses oleh mikroorganisme yang menghasilkan produk bernilai tinggi dari substrat mentah, mengubah substrat menjadi komponen yang kompatibel oleh mikroba enzim sehingga meningkatkan sifat substrat dan menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih banyak, fermentasi juga meningkatkan nilai nutrisi pada makanan serta memecahnya menjadi bentuk yang mudah untuk dikatabolisme. Fermentasi dilakukan dengan menggunakan mikroorganisme seperti bakteri dan jamur. Pada fermentasi yang menggunakan *Lactobacillus* sebagai mikrobanya, dihasilkan asam organik, protein yang dihidrolisis serta antioksidan yang baik. Pada penelitian sebelumnya, fermentasi dengan menggunakan *Aspergillus oryzae* yang digunakan sebagai mikroba, dihasilkan anti-oksidan yang kuat sebagai penangkal radikal bebas (Hussain *et al.*, 2016). Pada proses fermentasi, mikroorganisme membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhannya sehingga penggunaan tanaman sebagai media fermentasi sangat bermanfaat karena kandungan karbohidrat, protein, vitamin dan mineralnya dapat menjadi sumber nutrisi bagi mikroorganisme (Swain *et al.*, 2014). *Bacillus natto* diketahui menghasilkan enzim fibrinolitik yang diperoleh dari fermentasi kedelai jepang yaitu *natto*. Enzim fibrinolitik juga diketahui dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 dari makanan fermentasi kedelai China yaitu *douche*. Media yang mengandung banyak ion metal seperti kalsium, kobalt, tembaga, serta boron dapat meningkatkan aktivitas trombolitik yang dihasilkan oleh beberapa bakteri seperti *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Bacillus cereus* GD55 (Raju and Divakar, 2014). Tempe dari kedelai hitam yang difermentasi menggunakan *Rhizopus oligosporus* juga telah dilaporkan memiliki aktivitas trombolitik yang kuat (Poernomo *et al.*, 2015). Hasil dari fermentasi dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya pemilihan probiotik dan media yang sesuai, pH, suhu, serta waktu fermentasi (Bordoloi and Ganguly, 2014).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Rajaselvam (2021) *Bacillus amyloliquefaciens* strain KJ10 diinkubasi dalam berbagai suhu untuk menghasilkan enzim fibrinolitik. Pengujian tersebut dilakukan pada suhu 25, 28, 31, 34, 37, dan 40°C menunjukkan peningkatan produksi enzim fibrinolitik dan mencapai maksimum pada suhu 34°C (2209 ± 29 U/ml) dan secara bertahap menurun pada suhu yang lebih tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa suhu berpengaruh terhadap produksi dari enzim fibrinolitik. Reaksi enzimatik akan berlangsung lambat pada suhu rendah, begitupun sebaliknya hingga mencapai suhu optimum. Saat suhu mengalami kenaikan, molekul akan bergerak cepat yang mengakibatkan interaksi antara substrat dan enzim juga

meningkat hingga mencapai batas optimum yang kemudian setelah melewati batas optimum enzim akan terdenaturasi kembali sehingga menyebabkan terjadinya penurunan reaksi enzimatik (Rajaselvam *et al.*, 2021).

Selain dipengaruhi oleh suhu, aktivitas fibrinolitik juga dipengaruhi oleh pH. Aktivitas protease fibrinolitik dari *Bacillus amyloliquefaciens* strain KJ10 diamati dalam berbagai pH yaitu pada pH 6,5; 7; 7,5; 8; dan 8,5 menunjukkan peningkatan produksi enzim fibrinolitik dan mencapai maksimum pada pH 7,5. Pada pH 8 *Bacillus amyloliquefaciens* menunjukkan peningkatan produksi enzim di dekat pH netral atau pada kondisi basa. pH dari media kultur dapat mempengaruhi pertumbuhan dan akumulasi berbagai metabolit dari media yang diperlukan untuk menjaga stabilitas serta mempertahankan fungsi dan struktur enzim (Rajaselvam *et al.*, 2021). Aktivitas enzim dari *Aspergillus oryzae* KSK-3 yang dimurnikan, diukur menggunakan substrat sintesis pada 37°C dalam glisin-HCL (pH 3,0), asam asetat (pH 4,0 – 5,0), fosfat (pH 6,0 – 7,0), Tris – HCl (pH 8,0 – 9,0), dan glisin NaOH (pH 10,0). Buffer yang digunakan adalah dengan konsentrasi 20mM. Aktivitas proteinase dianalisis pada suhu 20° – 80°C. *Aspergillus oryzae* memiliki pH optimum untuk enzim yang dimurnikan pada pH 6,0. Ketika enzim diinkubasi dalam buffer pada suhu 37°C selama 4 jam pada berbagai pH, lebih dari 20% aktivitasnya dipertahankan pada pH 4 – 9. *Aspergillus oryzae* menunjukkan aktivitas fibrinolitik sebesar ~3,000 U urokinase/ml lebih tinggi dibandingkan dengan nattokinase (Shirasaka *et al.*, 2012).

Berdasarkan uraian diatas, maka dalam penelitian ini akan dilakukan proses fermentasi untuk mengetahui adanya aktivitas trombolitik yang dimiliki oleh Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dan *Aspergillus oryzae* FNCC 6004. *Aspergillus oryzae* dalam proses fermentasi dari Biji Buncis untuk menghasilkan enzim fibrinolitik belum pernah dilaporkan, sehingga diharapkan memiliki aktivitas fibrinolitik sebagai agen trombolitik yang bermanfaat sebagai pengobatan alternatif penyakit kardiovaskular.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah enzim yang dihasilkan dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 memiliki aktivitas trombolitik?
2. Berapa pH optimum dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 untuk menghasilkan aktivitas trombolitik maksimum?

3. Berapa suhu optimum dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 untuk menghasilkan aktivitas trombolitik maksimum?
4. Apakah aktivitas trombolitik hasil fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 lebih besar dibandingkan dengan sebelum dilakukan fermentasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Membuktikan adanya aktivitas trombolitik hasil dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004.
2. Mendapatkan pH optimum dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dalam menghasilkan aktivitas trombolitik
3. Mendapatkan suhu optimum dari fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 dalam menghasilkan aktivitas trombolitik
4. Membuktikan adanya peningkatan aktivitas trombolitik hasil fermentasi padat Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 lebih besar dibandingkan dengan sebelum dilakukan fermentasi?

1.4 Manfaat Penelitian

1. Bagi kepentingan keilmuan, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas agen trombolitik dari hasil fermentasi Biji Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) oleh *Aspergillus oryzae* FNCC 6004 sebagai dasar dalam pengembangan alternatif pengganti sediaan enzim fibrinolitik sebagai agen trombolitik yang umum digunakan karena memiliki efek samping yang tidak diinginkan.
2. Bagi masyarakat, penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif dalam pengobatan thrombosis pada penyakit kardiovaskular.