

AKTIVITAS INVITRO ENZIM FIBRINOLITIK EKSTRAK TEMPE HASIL FERMENTASI RHIZOPUS OLIGOSPORUS ATCC 6010 PADA SUBSTRAT KEDELAI HITAM

ACHMAD TOTO POERNOMO, ISNAENI, PURWANTO

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

e-mail : achmad.toto.p@gmail.com

ABSTRACT

Screening of fibrinolytic activity of tempeh extract derived from Rhizopus oligosporus ATCC 6010 fermentation has been investigated. The fermentation used Glycine Soja Sieb. et Zucc, Canavalia ensiformis, Phaseolus radiaus L., Lablab purpureus, Glycine max (L) Merrill, Glycine Soja Sieb. et Zucc, and Vigna unguiculata as substrates. Nattokinase and phosphate buffer 0,05 M pH 5,0 was used as positive and negative control respectively. The proteolytic and fibrinolytic activity of fermentation product used five kinds of legumes has been compared each other. The Glycine Soja Sieb. et Zucc exhibited the highest activity with proteolytic and fibrinolytic index of the crude enzyme is $3,00 \pm 1,58$ and $3,07 \pm 0,15$ respectively. Ratio of the proteolytic and fibrinolytic index between the crude enzyme and nattokinase is 112,36 % and 88,14% respectively.

Keywords : Fibrinolytic, trombosis, tempeh extract, Rhizopus oligosporus ATCC 6010.

PENDAHULUAN

Enzim fibrinolitik adalah protease yang mampu mendegradasi fibrin, suatu bekuan darah yang terbentuk dari fibrinogen melalui proteolisis oleh trombin. Bekuan darah ini jika terakumulasi dalam pembuluh darah tanpa adanya keseimbangan hemostasis dari faktor antikoagulan, plasmin, akan menyebabkan trombosis intravaskular yang dapat berujung pada penyakit kardiovaskular seperti stroke dan serangan jantung. Enzim fibrinolitik mulai banyak dikembangkan dari makanan fermentasi tradisional.

Enzim fibrinolitik telah banyak diteliti pada makanan hasil fermentasi baik oleh mikroba, termasuk bakteri, Actinomycetes dan Jamur antara lain Natto dari Jepang, Douchi dari China, saus Chungkook-jang dari Korea, dan tempe dari Indonesia (Kotb, 2012). Jamur yang berfilamen telah diteliti dan menghasilkan protease dengan aktivitas fibrinolitik yang tinggi seperti dari *Aspergillus ochraceus*, *Lunatus cochliobolus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp.*, *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus* atau *Rhizopus chinensis* (Peng et al., 2005). Sampai saat ini belum diketahui *Rhizopus sp.* yang memiliki aktivitas fibrinolitik. Telah diketahui bahwa *Rhizopus sp.* seperti *R. oligosporus*, *R. oryzae*, dan *R. stolonifer* biasanya dimanfaatkan untuk memfermentasi kacang-kacangan dalam pembuatan tempe (Astuti, 2011). *Rhizopus oligosporus* dalam proses

fermentasi tempe untuk menghasilkan enzim fibrinolitik belum pernah dilaporkan pada penelitian lain, sehingga diharapkan memiliki aktivitas fibrinolitik yang bermanfaat sebagai agen trombolitik. Pemilihan tempe sebagai media fermentasi didasarkan pada laporan bahwa ekstrak air tempe dari jamur *Fusarium sp* menunjukkan aktivitas trombolitik yang kuat (Sugimoto et al., 2007).

Secara umum tempe dapat dibuat dari bahan baku kacang kedelai baik kedelai hitam ataupun kedelai kuning. Di Indonesia telah dikenal beragam tempe dari jenis kacang seperti kacang tanah, kacang tholo, kecipir, kacang merah, kacang koro, kacang hijau bahkan kacang gude. Kacang-kacangan tersebut mengandung protein sekitar 10 sampai dengan 34,9%. Pada penelitian ini tempe *Rhizopus oligosporus* akan dibuat dengan bahan baku lima macam kacang-kacangan seperti tersebut di atas. Tempe tempe tersebut selanjutnya secara kualitatif akan diuji aktivitas protease fibrinolitiknya menggunakan media skim milk agar dan fibrin plate. Perbedaan kandungan protein akan mempengaruhi perbedaan aktivitas fibrinolitik. Diharapkan penelitian ini memberikan peluang untuk penemuan sumber fibrinolitik baru dari makanan fermentasi lainnya terutama yang berasal dari Indonesia.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari : (1) jamur: *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, (2) Media untuk peremajaan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010: PDA (Potatoes Dextrose Agar) Oxoid, (3) Kacang-kacangan: kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis*), kacang merah (*Phaseolus radiaius* L.), Komak (Lablab purpureus), kedelai (*Glycine max* (L) Merrill), kedelai hitam (*Glycine Soja* Sieb. et Zucc), kacang tholo (*Vigna unguiculata*) diperoleh dari Balai Penelitian Kacang-Kacangan dan Umbi-Umbian (Balitkabi) Malang sebagai bahan baku pembuatan tempe, (4) NaCl 0,9%, air suling, dapar fosfat 0,05 M (pH 5,5-8,5), (5) Media kasein (Merc) untuk klarifikasi aktivitas proteolitik enzim tempe *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010, Bahan kimia : Human Thrombine dan Human Fibrinogen untuk pembuatan fibrin plate diperoleh dari Sigma-Aldrich, Fibrin Bovine Blood Simagchem®, Nattokinase®, Agarose, Agar, Metilen biru, dan NaOH.

Alat-alat

Autoclave electric HL – 340 Series, Vertical Type Steam Sterilizer, Incubator Memmert, Spektrofotometer Genesys-20, Timbangan Digital Sartorius Type BP 221S, Laminar Air Flow Cabinet, magnetic stirrer, refrigerator Samsung, ultracentrifuge HERMLE Z36HK, centrifuge Hettich Zentrifugen EBA 20, Vortex Thermolyne Maxi Mix, pH-meter Fisher Versamix, micro pipette, Blender, Camera.

Metode

1. Peremajaan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 (Modifikasi dari Hegemur, 2009)

Setelah dilakukan optimasi, PDA (Potatoes Dextrose Agar) merupakan media yang sesuai untuk pertumbuhan *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 dibandingkan SDA (Sabourouds Dextrose Agar), berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh di permukaan media agar.

Untuk membuat satu liter media, sebanyak 39 gram PDA ditambah 800 mL air suling, dipanaskan sampai mendidih dan larut, ditambah air suling sampai satu liter. Media dimasukkan ke dalam

tabung reaksi masing-masing sebanyak 12 mL. Tutup ujung tabung dan sterilisasikan dengan autoclave 121°C selama 30 menit dan dimiringkan. Didiamkan beberapa jam hingga media memadat. Digesekkan satu ose biakan jamur murni ke dalam media PDA miring, diinkubasi selama 72 jam pada suhu 30 °C.

2. Penyiapan inokulum.

Dilakukan pembuatan suspensi spora jamur *Rhizopus oligosporus* dengan cara menambahkan 10 mL NaCl 0,9% steril ke dalam tabung inokulum yang telah diinkubasi selama 72 jam, divortex sampai spora jamur terlepas dari medianya (± 15 menit). Kerapatan optik inokulum diukur dengan spektrofotometer dan dilakukan pengaturan hingga diperoleh persen transmitten suspensi spora yang akan digunakan mencapai $\pm 25\%$.

3. Pembuatan Media kacang-kacangan

Sebanyak 500 gram masing masing kacang dicuci dengan air suling, kemudian direbus selama 15 menit. Setelah dicuci kemudian, dilakukan pengelupasan (dehuled) kulit kacang dengan tangan dan dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil, direndam dalam air suling steril (1:3, b/v) selama 24 jam. Setelah perendaman 24 jam, dicuci dan direbus kembali dengan air (1:4, b/v) selama 15 menit dan ditiriskan selama 30 menit. (modifikasi metode Ajeigbe, et al, 2012).

4. Proses Fermentasi tempe

Fermentasi masing masing kacang oleh *Rhizopus oligosporus* dilakukan dalam cawan petri steril. Tiap cawan berisi 100 gram kacang dan difermentasi dengan 10 ml suspensi spora dan dicampur sampai homogen. Seluruh cawan petri dimasukkan inkubator pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 43 jam. Cawan petri berisi kacang tanpa penambahan suspensi spora digunakan sebagai kontrol.

5. Produksi Ekstrak kasar (Crude Enzyme) (Modifikasi dari Michail, et al., 2005)

Ditimbang 500 g tempe, diekstraksi dengan dapar fosfat dingin 0,05 M pH $\pm 7,0$ sebanyak 1000 mL menggunakan blender. Dilakukan dengan penambahan volume dapar sedikit demi sedikit agar dicapai hasil yang optimal dan selama proses

ekstraksi dijaga agar suhu relatif tetap. Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi plastik masing-masing 10 mL. Sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dikumpulkan, selanjutnya dilakukan liofilisasi (*freeze drying*) hingga diperoleh serbuk enzim kasar.

6. Uji Aktivitas Enzim Proteolitik (Fatoni et al., 2008; Palanivel et al., 2013)

Dilakukan inokulasi tiga sampel enzim kasar tempe 12,5%, kontrol, dapar fosfat 0,05 M pH 5,0, suspensi spora *Rhizopus oligosporus* dengan %T 25%, dan larutan standar nattokinase masing-masing sebanyak 60 µL pada lubang (sebagai pencadang) dalam media yang terdiri dari campuran kasein 1%, agar 1,5% dalam air suling. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dan zona jernih (*halo zone*) yang terbentuk di sekitar pencadang diamati dan diukur diameter zona jernih (mm) yang menunjukkan aktivitas protease.

7. Uji Cakram Fibrin (fibrin plate) (Ashipala and He., 2007)

Fibrin sebanyak 0,3% dalam 100 mL dapar borat pH 7,8 dicampur dengan agarosa sebanyak 1,7%, kemudian dipanaskan. Dalam keadaan masih panas, tuang media fibrin plate sebanyak 20 mL ke dalam cawan petri. Tambahkan methylen blue sebanyak 400 µL pada plate agar zona jernih fibrinolitik terlihat dengan jelas. Setelah beberapa

menit media akan memadat, dibuat sebanyak tujuh lubang dan diinokulasikan tiga sampel enzim kasar tempe 12,5%, kacang kontrol, dapar fosfat 0,05 M pH 5,0, suspensi spora *Rhizopus oligosporus* dengan %T 25%, dan larutan standar nattokinase masing-masing sebanyak 60 µL. Seluruh cawan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam dan aktivitas fibrinolitik dapat diukur. Zona jernih transparan mengindikasikan hasil degradasi fibrin dan diameter zona sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas proteolitik

Untuk membuktikan bahwa tempe hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* menghasilkan enzim fibrinolitik, maka sebelumnya dilakukan uji aktivitas proteolitik. Enzim proteolitik menguraikan golongan protein yang potensi aktivitasnya ditunjukkan dengan ukuran diameter zona jernih yang terbentuk di sekitar pencadang. Potensi aktivitas enzim proteolitik yang berperan memecah protein dalam media padat Skim Milk Agar (SMA) hanya diukur secara kualitatif, tidak kuantitatif. Enzim proteolitik dapat diketahui dari aktivitasnya terhadap substrat protein, yang pada percobaan ini digunakan kasein. Media isolasi dan seleksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kasein dalam media susu skim

Tabel 1 : Diameter zona jernih aktivitas proteolitik masing masing larutan tempe 60 µL

Sampel tempe	Diameter zona jernih <i>Crude enzyme 1</i>	Diameter zona jernih <i>Crude enzyme 2</i>	Rerata zona jernih (mm)	SD
A	43.12	43.56	43.34	0.31
B	42.46	43.12	42.79	0.47
C	53.02	54.12	53.57	0.78
D	41.58	42.68	42.13	0.78
E	39.82	40.92	40.37	0.78

Keterangan: A = Komak, B = Kedelai, C = Kedelai hitam, D = Kacang merah, E = Kacang tholo

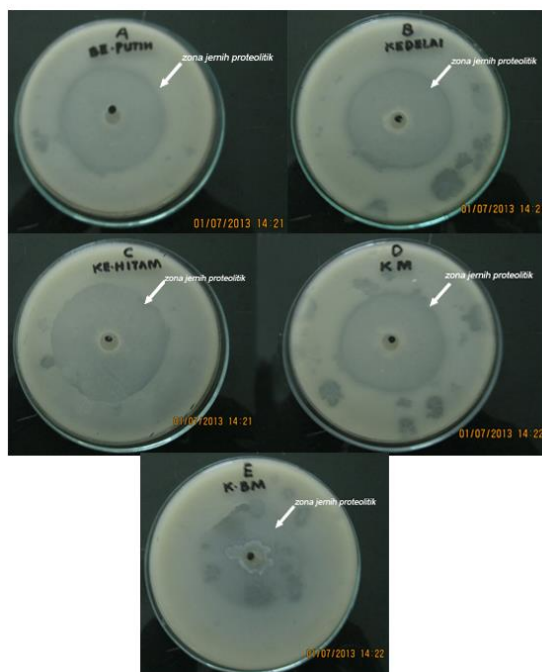
Kasein merupakan protein yang terdiri dari fosfoprotein yang berikatan dengan kalsium membentuk garam kalsium yang disebut kalsium kaseinat. Molekul ini sangat besar dan tidak larut dalam air serta membentuk koloid. Suspensi ini

berwarna putih dan dapat diamati secara langsung pada saat disuspensikan ke dalam kultur media padat. Dengan adanya enzim proteolitik ekstraseluler *Rhizopus oligosporus*, kasein ini akan terhidrolisis menjadi peptida-peptida dan asam-asam

amino yang larut. Hilangnya pertikel kasein di dalam media susu skim ditandai dengan adanya zona lisis (zona jernih) (Gambar 1) di sekitar pencadangan yang mengandung enzim yang dihasilkan oleh *Rhizopus oligosporus*.

Hasil uji statistik anova satu arah berdasarkan data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa tempe C (tempe kedelai hitam) mempunyai zona jernih yang paling besar. Fenomena ini dapat dijelaskan karena

kecepatan enzim yang dihasilkan oleh tempe C dalam membentuk produk asam amino lebih cepat dibanding dengan tempe yang lain dalam kurun waktu 18 jam. Diharapkan hasil aktivitas proteolitik juga akan menunjukkan sifat aktivitas fibrinolitik, sehingga dapat digunakan sebagai agen trombolitik. Pada tahap uji selanjutnya, tempe C (kedelai hitam) dipilih sebagai sampel untuk uji aktivitas fibrinolitik



Gambar 1. Hasil penapisan aktivitas proteolitik masing-masing larutan tempe 60 uL dengan substrat kasein A. Tempe Komak (*Lablab purpureus*), B. Tempe Kedelai (*Glycine max (L) Merrill*), C. Tempe Kedelai hitam (*Glycine Soja Sieb. et Zucc*), D. Tempe Kacang merah (*Phaseolus radiatus*), E. Tempe Kacang tholo (*Vigna unguiculata*).

Untuk mengetahui aktivitas atau kemampuan enzim proteolitik tempe C1 benar-benar dihasilkan oleh tempe hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus*, maka dilakukan uji terhadap *crude enzyme* proteolitik tempe kedelai hitam yang dibandingkan dengan ekstrak kedelai hitam, dapar fosfat, suspensi *Rhizopus oligosporus* dan control positif nattokinase.

Hasil pengukuran diameter zona jernih pada Tabel 2 menunjukkan *Crude enzyme* I-III menunjukkan diameter yang lebih besar dibandingkan ekstrak kedelai hitam, dapar fosfat, suspensi *Rhizopus oligosporus*. Hasil uji kualitatif aktivitas proteolitik ekstrak *crude enzyme* kedelai hitam yang dinyatakan dengan indeks proteolitik

adalah 3.00 ± 1.58 . Rasio indeks proteolitik sampel dan nattokinase adalah 112,36 % atau sekitar 1,12 kali lebih besar dibanding nattokinase yang indeks proteoliticnya hanya 2,86. Pada uji zona jernih enzim proteolitik tersebut didapatkan pula diameter zona jernih ekstrak kedelai hitam tanpa fermentasi dan dari suspensi spora jamur *Rhizopus oligosporus* yang berarti bahwa keduanya pun memiliki aktivitas proteolitik, namun tidak sebesar tempe kedelai hitam. Indeks proteolitik sampel jika dibandingkan dengan keduanya adalah sebesar 2,26 dan 2,59 kali lebih besar. Abdul Rauf *et al.* (2010) dalam penelitiannya menyatakan bahwa *Rhizopus oligosporus* memproduksi enzim protease asam, sedangkan produksi enzim proteolitik dari kedelai

hitam masih belum diketahui. Tempe dengan media kedelai hitam merupakan tempe yang dapat

menghasilkan aktivitas proteolitik lebih besar dibandingkan dengan sampel lainnya (Gambar 2)

Tabel 2. Hasil pengukuran aktivitas enzim proteolitik tempe kedelai hitam dibandingkan ekstrak kedelai, dapar fosfat, suspensi *Rhizopus oligosporus* dan larutan Nattokinase dinyatakan sebagai diameter zona jernih.

Lubang	Macam sampel	Diameter zona jernih (mm)	Diameter lubang (mm)	Indeks proteolitik
1	Crude enzyme I	19.32	7,00	2.76
2	Crude enzyme II	21.42	7,00	3.06
3	Crude enzyme III	22.40	7,00	3.20
4	Ekstrak kedelai hitam	9.30	7,00	1.33
5	Dapar fosfat pH 4,94	-	7,00	-
6	Suspensi <i>R. oligosporus</i>	7.10	7,00	1.16
7	Kontrol positif nattokinase	23.00	7,00	2.67

Secara kualitatif aktivitas enzim fibrinolitik tempe kedelai hitam dapat diketahui dari hasil pengukuran zona yang terbentuk di sekitar pencadang pada media fibrin agarosa (Gambar 3). Besarnya aktivitas fibrinolitik yang dinyatakan dengan indeks fibrinolitik sampel adalah $3,07 \pm 0,15$. Sebagai kontrol negatif dan positif masing-masing digunakan dapar fosfat 0,05 M pH 5,0 dan larutan nattokinase.

Rasio indeks fibrinolitik sampel dan nattokinase sebesar 88.14 % atau 0,88 kali lebih kecil dibandingkan nattokinase yang indeks memiliki fibrinolitik 3,49. Aktivitas fibrinolitik ditentukan

oleh kemampuan enzim yang dapat menghidrolisis substrat fibrin, yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar pencadang. Zona jernih yang terbentuk sangat tipis dan hampir tidak terlihat pada media fibrin tanpa zat warna, sehingga perlu ditambahkan pewarna *methylen blue*. Semakin besar aktivitas fibrinolitik, semakin besar zona jernih yang terbentuk. Milner dan Makise (2002) menyatakan, terbentuknya zona jernih yang semakin lebar dan jelas menunjukkan semakin banyak fibrin yang terhidrolisis oleh enzim fibrinolitik. Diameter zona jernih fibrinolitik lebih rendah dibandingkan proteolitik pada media SMA.



Gambar 2. Hasil pengamatan zona jernih di sekitar pencadang pada uji aktivitas enzim proteolitik larutan sampel tempe kedelai hitam hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 pada media kasein agarosa. No 1-3 Crude enzyme, 4. Ekstrak kedelai hitam, 5. Larutan dapar fosfat, 6. Suspensi *R. oligosporus*, 7. Larutan Nattokinase

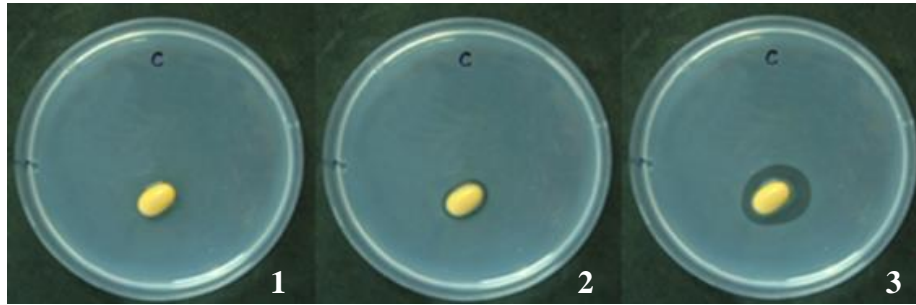
Berdasarkan hasil uji tersebut diketahui bahwa tidak hanya sampel saja yang positif memiliki aktivitas fibrinolitik, tetapi juga ekstrak kedelai hitam tanpa fermentasi dan dari suspensi spora jamur *Rhizopus oligosporus* (Tabel 3). Potensi fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di

sekitar pencadang. Indeks fibrinolitik hasil fermentasi kedelai hitam dengan jamur *Rhizopus oligosporus* jauh lebih besar 1,73 dan 1,97 kali dibandingkan kedelai hitam tanpa proses fermentasi dan *Rhizopus oligosporus*. Belum ada penelitian yang menyatakan bahwa baik kedelai hitam maupun

Rhizopus oligosporus mampu memproduksi enzim fibrinolitik.

Tabel 3. Hasil pengukuran aktivitas enzim fibrinolitik tempe kedelai hitam dibandingkan ekstrak kedelai, dapar fosfat, suspensi *Rhizopus oligosporus* dan larutan Nattokinase dinyatakan sebagai diameter zona jernih

Rep.1					
No Lubang	Keterangan	Diameter -1 (mm)	Diameter-2 (mm)	Diameter- rata ² (mm)	Indeks fibrinolitik
1	<i>Crude enzyme</i> I	21.90	20.70	21.30	3.04
2	<i>Crude enzyme</i> II	21.40	21.60	21.50	3.07
3	<i>Crude enzyme</i> III	20.10	20.40	20.25	2.89
4	Ekstrak kedelai hitam	12.60	13.30	12.95	1.85
5	Larutan dapar fosfat	-	-	-	-
6	Suspensi spora <i>R. oligosporus</i>	9.90	9.00	9.45	1.35
7	Nattokinase	24.40	24.20	24.30	3.47
Rep.2					
1	<i>Crude enzyme</i> I	24.90	23.00	23.95	3.42
2	<i>Crude enzyme</i> II	20.90	21.40	21.15	3.02
3	<i>Crude enzyme</i> III	21.20	20.70	20.95	2.99
4	Ekstrak kedelai hitam	11.70	12.90	12.30	1.76
5	Larutan dapar fosfat	-	-	-	-
6	Suspensi spora <i>R. oligosporus</i>	9.40	8.30	8.85	1.26
7	Nattokinase	24.50	23.80	24.15	3.45
Rep. 3					
1	<i>Crude enzyme</i> I	21.60	21.90	21.75	3.11
2	<i>Crude enzyme</i> II	22.60	21.00	21.80	3.11
3	<i>Crude enzyme</i> III	21.40	20.50	20.95	2.99
4	Ekstrak kedelai hitam	12.90	11.90	12.40	1.77
5	Larutan dapar fosfat	-	-	-	-
6	Suspensi spora <i>R. oligosporus</i>	9.00	8.50	8.75	1.25
7	Nattokinase	24.70	24.90	24.80	3.54



Gambar 3. Pengamatan zona jernih tempe kedelai hitam hasil fermentasi *Rhizopus oligosporus* FNCC 6010 pada media agarosa fibrin. No.1 = jam ke 0, no.2 =jam ke 8, no.3 = jam ke 12.

KESIMPULAN

Tempe kedelai hitam yang dihasilkan oleh *Rhizopus oligosporus* ATCC 6010 menghasilkan enzim fibrinolitik. Hasil uji aktivitas proteolitik ekstrak *crude enzyme* kedelai hitam secara kualitatif memberikan indeks proteolitik sebesar $3,00 \pm 1,58$. Perbandingan indeks proteolitik antara sampel dengan nattokinase 112,36 % atau sekitar 1,12 kali lebih besar dibanding nattokinase dengan indeks proteolitik 2,86. Aktivitas fibrinolitik yang dinyatakan sebagai indeks fibrinolitik $3,07 \pm 0,15$. Sebagai kontrol positif dan negatif masing-masing digunakan larutan nattokinase dan dapar fosfat 0,05 M pH 5,0. Perbandingan indeks fibrinolitik dan kontrol positif sebesar 88,14 % atau sekitar 0,88 kali lebih kecil dibanding nattokinase dengan indeks fibrinolitik 3,49.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashipala, O. K., He, Q. 2007. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC02 in aqueous two-phase system (polyethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Biosource Technology** **99**, pp. 4112-4119
- Astuti, M., Meliala, A., Dalais, F.S., Wahlqvist, M.L., 2000. Tempe, a Nutritious and Healthy Food from Indonesia. **Asia Pacific J Clin Nutr** **9**(4): 322–325.
- Fatoni, A., Zufahair, Lestari, P. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Protease Ekstraseluler dari Bakteri dalam Limbah Cair Tahu. **Jurnal Natur Indonesia**, **10** (2), 83-88
- Hegemur, H.R., 2009. Identifikasi Cendawan Mikro yang Berasosiasi pada Pinang Kering (GEBE) di Pasar Sanggeng Manokwari. Hal. : 14
- Kotb, Essam. 2012. **Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity**, Springer New York, Page: 1-74
- Michail, M., Vasiliadou, M., Zotos, A., 2005. Partial Purification and Comparison of Precipitation Techniques of Proteolytic Enzymes from Trout (*Salmo gairdnerii*) Heads. **Elsevier, Food Chemistry** **97** (2006) 50-55
- Milner Martin, N.D., and Kouhei Makise, M.D, **Natto and Its Active Ingredient Nattokinase, 2002, Alternative & complementary therapies**, p 157-162
- Palanivel P, Ashokkumar L, Balagurunathan R. 2013. **Production, purification and fibrinolytic** characterization of alkaline protease from extremophilic soil fungi. **Int J Pharm Bio Sci**, **4**(2), 101-110
- Peng, Y., Yang, X. & Zhang, Y., 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied Microbiology & Biotechnology**, **Vol.69**, No.2, pp. 126-132.
- Rauf, A., Irfan, M., Nadeem, M., Ahmed, I., Iqbal, H., 2010. Optimization of Growth Conditions for Acidic Protease Production from *Rhizopus oligosporus* through Solid State Fermentation of Sunflower Meal. **International Journal of Agricultural and Biological Sciences**, Vol.1 No.1, p. 40-43
- Sugimoto, S., Fujii T., Morimiya, T., Johdo, O., Nakamura, T., 2007. The fibrinolytic activity of a novel protease derived from a tempeh producing fungus, *Fusarium* sp. BLB. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **71**(9): 2184-2189.