

**LAPORAN PENELITIAN DANA FAKULTAS**

**AKTIVITAS FIBRINOLITIK PADA MAKANAN FERMENTASI BERBASIS  
KACANG (*BEAN*) DI KAWASAN ASIA SEBAGAI PANGAN FUNGSIONAL  
ANTI-ATHEROTROMBOSIS**



**TIM PENGUSUL**

Dr. Alberta Rika Pratiwi	(05811993147)
Dea N. Hendryanti, STP., MS	(05812015297)
Dr. V. Kristina Ananingsih	(05812000239)


**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA  
SEMARANG**

**2020**

**HALAMAN PENGESAHAN**  
**PENELITIAN INTERNAL UNIKA SOEGIJAPRANATA**

1. Judul Penelitian : Aktivitas fibrinolitik pada makanan fermentasi berbasis kacang (*bean*) di kawasan Asia sebagai pangan fungsional dalam menurunkan resiko anti-atherotrombosis
2. Kode>Nama Rumpun Ilmu : Nutrisi dan Pangan Fungsional  
Rekayasa Pengembangan Produk
3. Ketua Peneliti  
a. Nama : Dr. A. Rika Pratiwi, MSi  
b. NIDN/NPP : 0608056601 / 05811993147  
c. Jabatan Fungsional : Lektor  
d. Program Studi : Teknologi Pangan  
e. Nomor HP : 083865591181
4. Anggota Peneliti (1)  
Nama : Dea N. Hendryanti, STP., MS  
NIDN/NPP : 0617129202 / 05812015297  
Perguruan Tinggi : Universitas Katolik Soegijapranata
5. Anggota Peneliti (2)  
Nama : Dr. V. Kristina Ananingsih, ST., MSc  
NIDN : 0623127302  
Perguruan Tinggi : Universitas Katolik Soegijapranata
6. Lama Penelitian : 8 bulan
7. Biaya Penelitian keseluruhan : Rp. 3.500.000,00
8. Sumber Biaya : - Dana Fakultas Rp. 1.200.000,00  
: - *in kind* Rp. 2.300.000

Mengetahui,  
Dekan FTP



Dr. R Probo Nugrahedi, MSc  
NIDN 0625077502

Semarang, 11 Oktober 2019  
Ketua Tim Pengusul



Dr. A. Rika Pratiwi, MSi  
NIDN 0608056601

Menyetujui,  
Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



Dr. Berta Bekti Retnawati, MSi  
NIDN 0606097302

# DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	2
DAFTAR ISI.....	3
ABSTRAK.....	4
BAB 1. PENDAHULUAN.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	11
BAB 3. METODE PENELITIAN .....	13
BAB 4. HASIL <i>REVIEW</i> .....	18
DAFTAR PUSTAKA .....	47
LAMPIRAN.....	49

# ABSTRAK

Atherotrombosis merupakan penyebab utama kematian pada penderita penyakit kardiovaskular. Sekitar 80% kematian pada penderita penyakit jantung di dunia terjadi sebagai akibat dari stroke dimana sekitar 90% dari stroke disebabkan oleh trombosis. Di Indonesia, stroke itu sendiri ternyata menjadi penyebab kematian utama berdasarkan Riset Kesehatan Dasar 2007 yang dilakukan oleh Kementerian Kesehatan RI. Tujuan penelitian ini adalah untuk me-*review* faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas fibrinolitik pada makanan fermentasi berbasis kacang (*bean*) yang berasal dari kawasan Asia. Metode penelitian yang digunakan berupa *review* dari 843 jurnal yang dipublikasi selama 10 tahun terakhir. Berdasarkan penelitian ini, makanan fermentasi berbasis *bean* yang berasal dari Asia memiliki potensi untuk dijadikan pangan fungsional dalam mendegradasi gumpalan darah pada pasien atherothrombosis. Efektivitas kinerja komponen aktif yang berperan sebagai pro-fibrinolitik pada bahan pangan tersebut dapat dipengaruhi oleh berat molekul, pH, suhu, inhibitor and activator dimana terdapat kecenderungan bahwa jenis mikroorganisme memberikan pengaruh dominan terhadap karakteristik enzim fibrinolitik. Perkembangan penelitian hingga saat ini masih perlu untuk terus dilanjutkan, salah satu enzim fibrinolitik yang telah memberikan bukti kuat yaitu enzim nattokinase yang terkandung pada Natto, makanan khas Jepang. Sementara, komponen bioaktif lainnya masih perlu dilanjutkan hingga tahap *human study* untuk dapat memberikan bukti yang kuat.

**Kata kunci** : aktifitas fibrinolitik, makanan fermentasi di Asia, *bean*

# **BAB 1. PENDAHULUAN**

## **1.1. Latar Belakang**

Aterotrombosis merupakan kelainan pada dinding pembuluh darah. Penyakit aterotrombosis merupakan penyakit yang terjadi akibat adanya sumbatan bekuan darah (trombus) pada pembuluh darah (arteri). Pembentukan trombus ini adalah penyebab utama sindrom koroner akut dan kematian kardiovaskular (Viles-Gonzalez et al., 2004). Salah satu penyakit kardiovaskular yang disebabkan dari aterotrombosis ini yaitu penyakit jantung koroner (PJK). World Health Organization (WHO) menyebutkan bahwa sebagian besar penyakit kardiovaskular dapat dicegah dengan mengatasi faktor-faktor risiko perilaku seperti penggunaan tembakau, pola makan dan obesitas yang tidak sehat, aktivitas fisik yang tidak sehat, dan penggunaan/konsumsi alkohol yang berlebihan.

WHO juga menyebutkan, lebih dari 17 juta orang di dunia meninggal akibat penyakit jantung dan pembuluh darah. Angka kematian akibat PJK sangat besar terjadi di negara berkembang. Di beberapa negara berkembang hal ini terjadi akibat adanya kemiringan sosial yang terbalik dengan anggota kelompok sosial ekonomi rendah yang menderita tingkat PJK terbesar dan tingkat berbagai faktor risiko (Reddy, 2004). Perbedaan besar lain antara negara maju dan berkembang adalah jumlah sumber daya yang dikhususkan untuk perawatan PJK (Gaziano et al., 2010). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018, di Indonesia angka kejadian penyakit jantung dan pembuluh darah semakin meningkat dari tahun ke tahun. Setidaknya, 15 dari 1000 orang, atau sekitar 2.784.064 individu di Indonesia menderita penyakit jantung.

Trombus yang menyumbat pembuluh darah tersebut dapat dihancurkan dengan mekanisme trombolisis (fibrinolisis). Fibrinolisis merupakan mekanisme untuk mencegah dan membatasi gumpalan yang terbentuk akibat adanya kerusakan pada endotelium pembuluh darah (Bhattacharjee, Payel ; Bhattacharyya, 2014).

Menurut (Gad et al., 2014), agen trombolitik dapat digunakan untuk mengobati serangan jantung karena semua agen trombolitik adalah protease serin dan mengubah plasminogen menjadi plasmin yang mampu memecah fibrinogen dan fibrin sehingga melarutkan bekuan darah. Protease serin merupakan aktivator plasminogen yang dapat mengaktifkan plasminogen secara langsung untuk melangsungkan proses fibrinolisis (Flemmig & Melzig, 2012).

Banyak enzim fibrinolitik turunan makanan telah dimurnikan dari berbagai makanan fermentasi tradisional Asia, seperti Natto di Jepang (Fujita et al., 1993), Chungkookjang di Korea (W. Kim et al., 1996), Tempe di Indonesia (Yoon et al., 2002). Salah satu enzim yang memiliki aktivitas fibrinolitik adalah enzim nattokinase. Nattokinase memiliki kemampuan yang kuat untuk memecah trombi dan fibrin. Sumber utama untuk mendapatkan nattokinase yang murni berasal dari produk fermentasi kedelai, natto (Weng et al., 2017).

Fermentasi merupakan salah satu bentuk dan metode tertua dari pengolahan serta pengawetan makanan (Paul Ross et al., 2002), dan juga memiliki fungsi untuk meningkatkan sifat gizi dan fungsional dari produk asli (Frias et al., 2008). Selain kedelai makanan fermentasi berbasis *bean* yang memiliki enzim fibrinolitik juga ditemukan pada buncis (Wei et al., 2011), dan kacang merah (B. H. Lee et al., 2015).

## **1.2. Tinjauan Pustaka**

### **1.2.1. Pembentukan Gumpalan Darah**

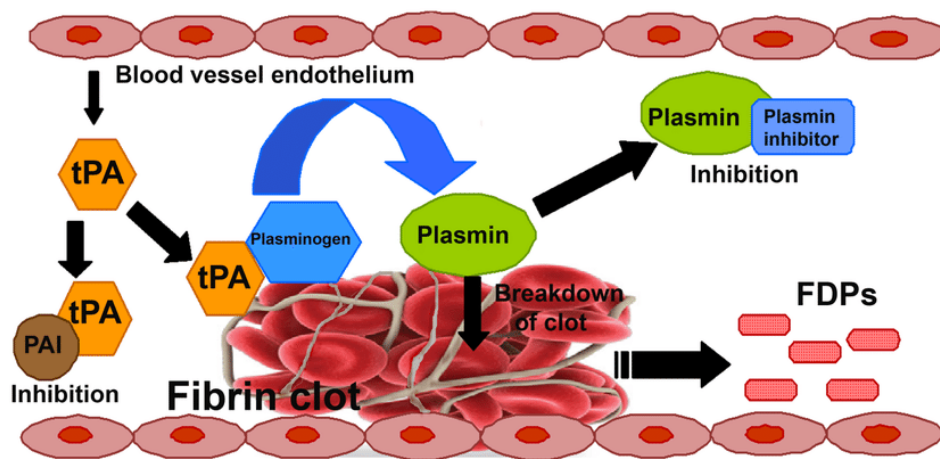
Trombosis merupakan pembentukan gumpalan atau bekuan darah yang tidak normal, hal ini terjadi bila terdapat gangguan pada jalur pembekuan darah dan pemecahan fibrin. Trombosis dapat terbentuk karena ketidakseimbangan faktor pembekuan darah akibat kelainan molekular yang didapat maupun berasal dari keturunan. Selain itu gangguan aliran darah akan memperlambat aliran inhibitor faktor pembekuan darah, sehingga mencegah berkurangnya faktor pembekuan darah yang aktif dan menyebabkan trombosit kontak dengan endotelium (Durachim & Astuti, 2018).

Penggumpalan fibrin dimulai dari adanya kerusakan jaringan atau kolagen di bawah endotelium pembuluh darah, sehingga terjadi pembentukan bekuan fibrin (*fibrin clot*) yang menyebabkan penyumbatan trombosit (Mine et al., 2005). Kerusakan endotelium ini dapat disebabkan dari infeksi virus, imunokompleks, stres hemodinamik, produk tembakau, konsentrasi kolesterol tinggi, enzim eikosanoid yang dilepaskan oleh trombosit dan leukosit dalam peradangan, hiperhomosisteinemia, dan diabetes (Badimon & Vilahur, 2008). Gumpalan fibrin dalam pembuluh darah dapat mengganggu aliran darah dan menyebabkan terjadinya penyakit kardiovaskular. Gumpalan fibrin terbentuk dari fibrinogen oleh adanya trombin (Mine et al., 2005).

Konsentrasi fibrinogen dapat mempengaruhi dan meningkatkan proses trombosis (Koenig, 2003). Kadar fibrinogen cenderung lebih tinggi pada pasien yang memiliki diabetes, hipertensi, obesitas, kebiasaan merokok, dan gaya hidup yang tidak sehat (Maresca et al., 1999; Meade T.W, Imeson J., 1987). Trombus yang menyumbat pembuluh darah tersebut dapat dihancurkan dengan mekanisme trombolisis (fibrinolisis).

### 1.2.2. Proses Fibrinolisis

Ketika *fibrin clot* (gumpalan terbentuk), diperlukan mekanisme untuk membatasi pembentukan gumpalan dan menguraikan gumpalan. Mekanisme untuk mendegradasi *fibrin clot* disebut proses fibrinolisis. Mekanisme proses fibrinolisis dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Proses Fibrinolisis

Sumber : (Bhattacharjee, Payel ; Bhattacharyya, 2014)

Fibrinolisis merupakan suatu mekanisme untuk mencegah dan membatasi gumpalan yang terbentuk akibat adanya kerusakan pada endotelium pembuluh darah. Sel endotelium menjaga keseimbangan koagulasi/antikoagulasi dengan melepaskan inhibitor aktivator plasminogen (PAI) yang dapat menghambat proses fibrinolisis. Konversi dari plasminogen menjadi plasmin dipengaruhi oleh aktivator jaringan plasminogen (tPA) dan urokinase (uPA). Menurut (Bhattacharjee, Payel ; Bhattacharyya, 2014), plasmin dapat mencegah polimerisasi fibrin dan dapat memecah fibrinogen atau fibrin dan membentuk fragmen yang lebih kecil menjadi produk degradasi fibrin (FDP). Plasmin dapat melakukan aktivitas untuk mengatur dan mencegah adanya fibrinolisis berlebihan.

Enzim fibrinolitik untuk melakukan fibrinolisis diklasifikasikan menjadi dua jenis. Salah satunya adalah aktivator plasminogen (PA), seperti aktivator plasminogen tipe jaringan (tPA) (Collen & Lijnen, 2004), streptokinase (SK), dan urokinase (UK) (Duffy, 2002), yang mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin aktif untuk didegradasi fibrin. Jenis lainnya adalah enzim fibrinolitik seperti plasmin, yang secara langsung menurunkan fibrin, sehingga melarutkan trombi dengan cepat dan sepenuhnya (Kotb, 2013).

### 1.2.3. Protease Serin

Protease terbagi ke dalam lima jenis berdasarkan gugus pembentuknya yaitu gugus serin, treonin, sistein, aspartik atau logam terutama bertanggung jawab atas katalisis. Aktivator plasminogen, yang mengaktifkan plasminogen secara langsung, semuanya adalah protease serin (Flemmig & Melzig, 2012).

Enzim-enzim fibrinolitik yang termasuk dalam protease serin dicirikan oleh adanya gugus serin di tempat aktifnya. Berdasarkan kesamaan struktural mereka, protease serin telah dikelompokkan menjadi 20 keluarga. Protein serin dikenali oleh penghambatan ireversibelnya oleh 3,4-*dichloroisocoumarin*, *diisopropyl fluorophosphate* (DFP), *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), dan *tosyl-lysine chloromethyl keton* (Kotb, 2013).

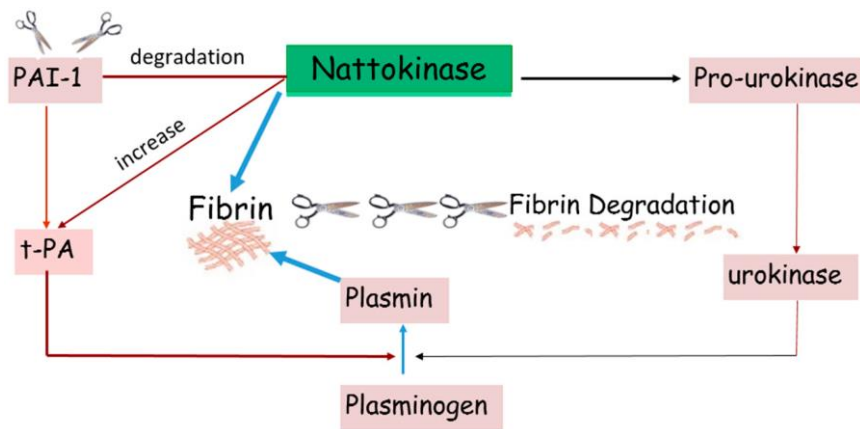
Mereka umumnya aktif pada pH netral dan alkali, dengan optimum antara pH 7 dan 11. Massa molekulnya berkisar antara 18 dan 35 kDa. Titik isoelektrik dari protease serin umumnya antara pH 4 dan 6 (Govind et al., 1981).

### 1.2.4. Enzim Nattokinase

Enzim nattokinase adalah salah satu enzim fibrinolitik. Dalam jurnal *review* yang ditulis oleh (Weng et al., 2017), dikatakan bahwa nattokinase adalah protease serin yang dimurnikan dan diekstraksi dari makanan tradisional Jepang bernama Natto yang berupa fermentasi kedelai dengan bakteri *Bacillus subtilis*. Enzim nattokinase dapat memecah gumpalan darah secara langsung (*direct*) dengan cara menghidrolisis fibrin dan substrat plasmin. Proses pemecahan gumpalan darah oleh enzim nattokinase dengan mengubah endogen pro-urokinase menjadi urokinase (uPA), menurunkan PAI-1 (inhibitor aktivator plasminogen-1), dan meningkatkan aktivator jaringan plasminogen (t-PA) yang mendukung aktivitas fibrinolitik. Liu et al. (2005) mengatakan bahwa nattokinase memiliki fungsi ganda yaitu mampu menghidrolisis trombin darah secara langsung



dan terlibat dalam konversi plasminogen menjadi plasmin dengan aktivitas enzimatik untuk mendegradasi fibrin.



Gambar 2. Mekanisme Aksi Degradasi *Fibrin Clot* oleh Enzim Nattokinase

Sumber : (Weng et al., 2017)

(Weng et al., 2017) mengemukakan bahwa saat dilakukan pengobatan pada arteri yang terluka dengan nattokinase, pembentukan trombus dan agregasi platelet terhambat. Nattokinase dapat memecah trombi dan fibrin serta memiliki fungsi yang sama dengan aspirin sebagai pengencer darah. Namun aspirin dapat memicu pendarahan dan penyakit lambung, sedangkan nattokinase dapat meningkatkan aliran darah tanpa efek samping. Salah satu hal inilah yang menjadi keunggulan dari enzim nattokinase sebagai agen fibrinolitik tanpa adanya efek samping.

Sumber utama untuk mendapatkan nattokinase murni berasal dari produk fermentasi kedelai, natto. Proses tradisional fermentasi kedelai untuk membuat natto sederhana dan mudah, dan dapat dengan mudah dilakukan di rumah. Bakteri *B. subtilis* adalah starter yang digunakan untuk membuat natto, secara komersial dan di rumah. *B. subtilis* dapat mempertahankan aktivitas pada pH 6-12 dan dapat mencapai suhu tinggi hingga 60°C (Weng et al., 2017).

### 1.2.5. Fermentasi Makanan Berbasis Kacang (*Bean*)

Fermentasi merupakan salah satu bentuk dan metode tertua dari pengolahan serta pengawetan makanan (Paul Ross et al., 2002), dan juga memiliki fungsi untuk meningkatkan sifat gizi dan fungsional dari produk asli (Frias et al., 2008). Beberapa makanan fermentasi dapat mengandung sifat biogenik yang dihasilkan dari produksi mikroba metabolit bioaktif seperti vitamin, peptida bioaktif, asam organik atau asam lemak yang dihasilkan selama proses fermentasi (Stanton et al., 2005). Fermentasi makanan diketahui dapat mengurangi kadar faktor antinutritif (Egounley &

Aworh, 2003) dan juga proses fermentasi telah banyak digunakan untuk meningkatkan bioavailabilitas nutrisi pada bahan pangan (Hotz & Gibson, 2007).

*Legum*, termasuk kacang-kacangan (*bean*), menempati tempat penting dalam nutrisi manusia karena di banyak negara kacang (*bean*) adalah salah satu makanan pokok. Biji kacang memiliki nilai gizi yang unik. Selain memiliki harga yang terjangkau sebagai sumber protein, sakarida, dan beberapa mikronutrien termasuk mineral dan vitamin, mereka dikenal sebagai kaya serat makanan dan rendah lemak (Sgarbieri, 1989; Soral-Śmietana & Krupa, 2005). Kontribusi *legum* dalam makanan sehari-hari memiliki banyak efek fisiologis yang menguntungkan karena memungkinkan untuk mencegah penyakit metabolisme umum, salah satunya yaitu penyakit jantung koroner (PJK) (Bazzano et al., 2001).

Makanan *legum* tradisional yang difermentasi dengan protein, banyak dikonsumsi di banyak negara Afrika dan Asia (G.A., 2019). Di negara Asia, kacang (*bean*) yang banyak diproduksi dan konsumsi yaitu fermentasi kedelai (Mah, 2015). Makanan berbasis kedelai dikenal memiliki kualitas gizi dan fungsional yang baik, bukan hanya karena kandungan protein dan minyak yang tinggi tetapi juga karena *phytochemical*, terutama isoflavon (Kishida et al., 2000). Banyak enzim fibrinolitik turunan makanan telah dimurnikan dari berbagai makanan fermentasi tradisional Asia, seperti Natto di Jepang (Fujita et al., 1993), Chungkookjang di Korea (W. Kim et al., 1996), Tempe di Indonesia (Yoon et al., 2002). Selain kedelai makanan fermentasi berbasis *bean* yang memiliki enzim fibrinolitik juga ditemukan pada buncis (Wei et al., 2011), dan kacang merah (B. H. Lee et al., 2015).

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Tujuan dilakukan *review* ini adalah untuk mengetahui studi terkait enzim fibrinolitik yang terdapat pada makanan fermentasi berbasis kacang (*bean*) di kawasan Asia serta mengulas karakteristik biokimia dari enzim fibrinolitik dari makanan fermentasi tersebut.

## **BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1. Nattokinase**

Nattokinase merupakan enzim fibrinolitik yang terjadi secara alami dari hasil fermentasi kedelai natto (makanan tradisional Jepang) dengan bakteri *Bacillus subtilis* (Obeid et al., 2015). Nattokinase ditemukan pertama kali pada tahun 1980 oleh Dr Hiroyuki Sumi dari Chicago sebagai agen alami trombolitik yang dapat mendegradasi fibrin dan secara efektif dapat melarutkan trombus. Sebagai enzim fibrinolitik, Nattokinase banyak digunakan untuk penyakit kardiovaskular seperti jantung, tekanan darah tinggi, dan pengerasan pembuluh darah (Haitha et al., 2011). Enzim fibrinolitik telah banyak diteliti pada beberapa makanan hasil fermentasi yaitu Natto dari Jepang, Douchi dari Cina, Saus Chungkook-jang dari Korea, dan tempe dari Indonesia (Kotb, 2012).

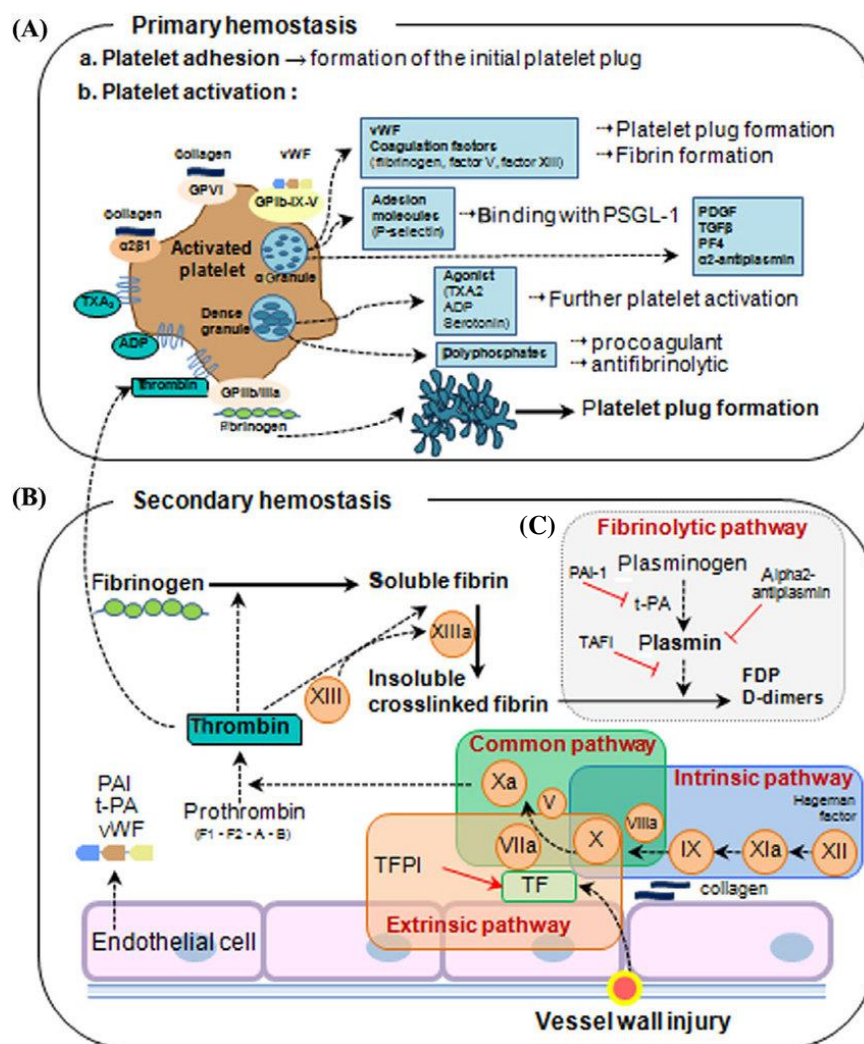
Temperatur, pH, dan proses biologi mempengaruhi hasil optimalisasi enzim Nattokinase (Candrasekaran et al., 2015). Borah et al (2012) melakukan isolasi Nattokinase berdasarkan karakteristik biokimia dan diperoleh hasil bahwa aktivitas enzim ditemukan menurun secara bertahap dengan peningkatan volume inhibitor serta dipengaruhi oleh pH dan temperatur. Enzim Nattokinase bersifat ekstraseluler sehingga produksinya dapat dipengaruhi oleh lingkungan serta ketersediaan substrat yang dapat diekstrak pada bahan pangan.

### **2.2. Haemostasis dan Fibrinolisis**

Trombus atau gumpalan darah adalah massa padat, terdiri dari konstituen darah, yang terbentuk dalam sistem vaskular. beberapa faktor seperti peningkatan kolesterol LDL, merokok, dan hiperglikemia, dapat meningkatkan resiko pembentukan thrombus dalam aliran darah. Potongan-potongan trombi dapat tersirkulasi ke lokasi yang berbeda melalui aliran darah sehingga dapat termanifestasi menjadi stroke, emboli paru, trombosis vena dalam, trombosis arteri, infark miokard akut (AMI) dan oklusi arteri retina (Banerjee et al, 2004).

Seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1, proses thrombosis melibatkan beberapa mekanisme yaitu (A) Hemostasis primer (*clot initiation*): ketika endotelium terluka, matriks subendotelial prokoagulan (terdiri dari protein, seperti kolagen, faktor vonWillebrand (vWF), fibrinogen, laminin, dan fibronectin) akan terekspose, dan mengaktifkan hemostasis primer, yang terdiri dari (1) *platelet adhesion*, (2) *platelet activation*, dan (3) *platelet plug formation*. (B) Hemostasis

sekunder (pembentukan *crosslinked fibrin clot* atau trombus). Melalui jalur ekstrinsik penggumpalan darah, dinding pembuluh yang mengalami cedera akan mengekspresikan *tissue factor* (TF) yang kemudian akan memfasilitasi pembentukan thrombin dari prothrombin. Thrombin ini selain akan meningkatkan reaktifitas platelet, juga akan mengubah fibrinogen menjadi *crosslinked fibrin* atau trombus. Trombus dapat terdegradasi menjadi *fibrinogen degradation product* (FDP) oleh plasmin melalui sistem fibrinolisis. Plasminogen dikonversikan menjadi plasmin oleh *tissue plasminogen activator* (t-PA), yang dikendalikan secara negatif oleh *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1). Aktifitas plasmin secara langsung dihambat oleh  $\alpha$ 2-antiplasmin dan *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) (Repetto et al, 2017).

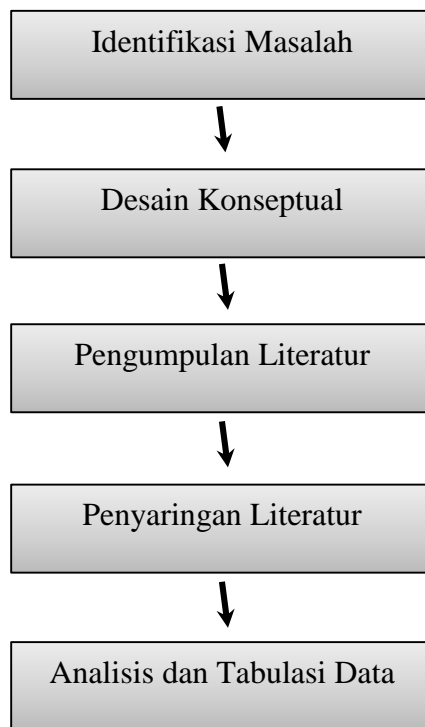


**Gambar 1.** Peran sistem fibrinolisis atau *fibrinolytic pathway* dalam mendegradasi trombus pada metabolisme tubuh manusia: Hemostasis primer (A), Hemostasis sekunder (B), Sistem Fibrinolisis (C). *Crosslinked fibrin* atau trombus dapat didegradasi menjadi FDP melalui sistem fibrinolisis. Proses ini akan membuka kembali aliran darah yang sebelumnya terhambat atau tertutup oleh gumpalan darah (Repetto et al, 2017).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 1.4. Diagram Alir Penelitian

Tahapan proses yang dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3. Penelitian diawali dengan melakukan identifikasi masalah untuk mengetahui telaah literatur (publikasi *review*) yang sudah ada dan menyusun rumusan masalah. Kemudian dilakukan perumusan kata kunci yang diterjemahkan dalam diagram tulang ikan (Gambar 4) dan mulai dilakukan pengumpulan literatur yang sesuai dengan kata kunci. Dari literatur yang diperoleh, dilakukan penyaringan literatur berdasarkan kualitas dan kesesuaian dengan topik penelitian untuk menentukan literatur yang akan digunakan.



Gambar 3. Desain Penelitian

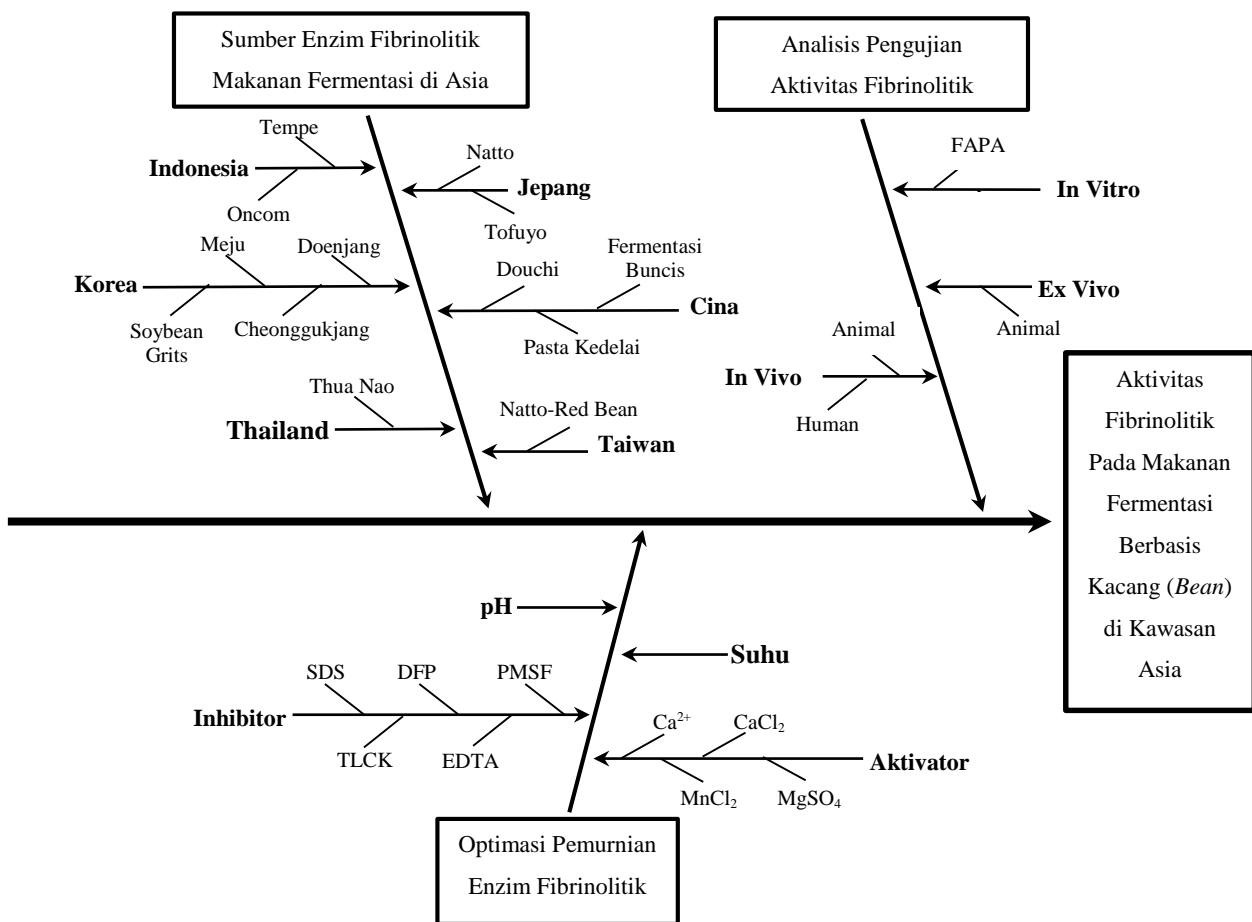
### 1.5. Identifikasi Masalah

Pengidentifikasi masalah dapat dilakukan dengan melakukan analisa kesenjangan, yakni mengumpulkan berbagai publikasi *review* dalam satu topik dan melihat masalah yang belum dibahas pada *review – review* tersebut. Pengumpulan *review* untuk analisa kesenjangan dilakukan dengan melakukan pencarian jurnal menggunakan *database Google Scholar, SpringerLink, ScienceDirect, PubMed, Directory of Open Access Journal (DOAJ)*. Kata kunci yang digunakan

dalam pencarian adalah “fibrinolytic”, “fermented food”, “bean”, dan “soybean”. Setelah menemukan masalah, masalah tersebut diidentifikasi apakah sudah ada ulasannya atau belum. Jika sudah ada ulasannya, maka perlu dipertanyakan lagi apakah ulasan tersebut sudah berjalan dengan baik. Saat belum ada atau kurangnya ulasan yang mencukupi, maka masalah tersebut dapat diangkat menjadi topik *review*.

### 1.6. Desain Konseptual

Desain konseptual digunakan untuk merumuskan kata kunci yang akan digunakan dalam pencarian literatur yang dibutuhkan. Perumusan kata kunci dilakukan dengan membuat diagram tulang ikan. Berdasarkan Coccia (2017) diagram tulang ikan dapat digunakan dalam perumusan kata kunci dalam mencari masalah-masalah yang ada serta pencarian penyelesaian masalah.



Gambar 4. *Fish Bone* Desain Konseptual

### 1.7. Pengumpulan Literatur

Tujuan dilakukannya pengumpulan literatur adalah untuk membantu penulis dalam mengetahui lebih lanjut tentang masalah yang sudah dipilih. Demi mendapatkan data yang akurat, digunakan

setidaknya 60 jurnal yang sudah dipublikasi dalam beberapa laman ilmiah yang terpercaya. Pengumpulan literatur menggunakan *database Google Scholar, SpringerLink, ScienceDirect, PubMed, Directory of Open Access Journal (DOAJ)*.

Literatur yang akan digunakan dipilih dengan menggunakan kata-kata kunci sebagai berikut: “fibrinolytic”, “fermented food”, “bean”, dan “soybean”. Kriteria pengumpulan literatur yaitu artikel harus merupakan riset asli yang telah dikaji dan dituliskan dalam bahasa Inggris berbentuk *full text*, serta artikel memiliki tujuan untuk menyelidiki aktivitas fibrinolitik pada makanan fermentasi dan tempe. Dalam pengumpulan literatur penulis tidak membatasi tahun terbit literatur karena artikel lama (diatas 10 tahun) dapat digunakan sebagai landasan dasar penelitian dan artikel baru (kurang dari 10 tahun) dapat digunakan sebagai pembaruan (*update*) informasi terkini.

<i>Database</i>	Terminologi Pencarian	Hasil
Google Scholar	fibrinolytic activity AND Asia fermented food AND bean AND soybean	552
SpringerLink	fibrinolytic AND fermented food AND bean OR soybean	130
ScienceDirect	fibrinolytic AND fermented food AND bean OR soybean	116
PubMed	fibrinolytic AND fermented food AND soybean	31
Directory of Open Access Journal (DOAJ)	fibrinolytic AND fermented food	14

### **1.8. Penyaringan Literatur**

Setelah didapatkan literatur yang sesuai dengan rumusan masalah yang dibuat, kemudian penulis memilih literatur-literatur yang sesuai dengan topik. Untuk mempermudah pemilihan literatur, penulis akan membaca abstrak pada literatur. Kemudian literatur yang sesuai dengan topik dibaca dan dicari data kuantitatif dan kualitatif yang dibutuhkan. Setelah diperoleh data yang dibutuhkan,

kemudian dilakukan penyaringan literatur berdasarkan penilaian kualitas literatur berdasarkan metode Hawker et al. (2002) appendix D.

Pada penilaian ini, akan dilakukan *scoring* pada abstrak dan judul, latar belakang dan tujuan, pengambilan sampling, dan hasil penelitian dengan kriteria sangat baik (skor 5), baik (skor 4), kurang baik (skor 3) dan sangat kurang baik (skor 2). Setelah itu skor akan dijumlah untuk didapatkan nilai keseluruhan literatur. Nilai pada penilaian kualitas literatur adalah sebagai berikut:

Kualitas tinggi : 20 – 25

Kualitas sedang: 16 – 19

Kualitas rendah : 10 – 15

Tabel 1. Penilaian Kualitas Literatur

Bagian Literatur	Skor	Keterangan
Abstrak dan Judul	(5)	Abstrak terstruktur serta terdapat informasi yang lengkap dan jelas serta judul jelas
	(4)	Abstrak terstruktur namun informasi yang kurang lengkap
	(3)	Abstrak kurang memadai
	(2)	Tidak terdapat abstrak
Pendahuluan dan Tujuan	(5)	Terdapat latar belakang yang singkat namun jelas, memiliki tujuan yang jelas serta terdapat review literatur yang terkini
	(4)	Latar belakang atau tujuan kurang jelas
	(3)	Terdapat latar belakang namun tidak terdapat tujuan atau sebaliknya
	(2)	Tidak terdapat latar belakang dan tujuan
Sampling	(5)	Pengambilan sampel dijelaskan dengan detail dan jelas (jumlah yang digunakan, jenis sampel yang digunakan, dan perlakuan yang digunakan)
	(4)	Pengambilan sampel dijelaskan dengan kurang detail (jumlah yang digunakan tidak jelas, jenis sampel yang digunakan dan perlakuan yang digunakan)
	(3)	Tidak dijelaskan jenis sampel yang digunakan dan perlakuan yang dilakukan
	(2)	Tidak terdapat penjelasan tentang pengambilan sampel



Result	(5)	Hasil mudah dipahami, sesuai dengan tujuan serta data yang didapatkan cukup dan sesuai dengan tujuan
	(4)	Penjelasan hasil penelitian kurang lengkap namun masih sesuai dengan tujuan
	(3)	Tidak terdapat penjelasan tentang hasil penelitian
	(2)	Hasil penelitian tidak sesuai dengan tujuan

---

### **1.9. Analisis dan Tabulasi Data**

Data kuantitatif yang didapatkan dari penyaringan literatur akan diolah dan dirangkum oleh penulis dalam sebuah tabel. Dengan menggunakan tabel, penulis dapat lebih mudah memahami hasil penelitian yang didapatkan. Setelah itu data dalam tabel akan dijelaskan menggunakan data kualitatif.

## BAB 4. HASIL *REVIEW*

### ENZIM FIBRINOLITIK PADA MAKANAN FERMENTASI BERBASIS KACANG (*BEAN*) DI KAWASAN ASIA

**Tabel 2. Enzim Fibrinolitik pada Makanan Fermentasi Berbasis Kacang (*Bean*) di Kawasan Asia**

Makanan	Mikroorganisme	Enzim Fibrinolitik	Jenis Kacang ( <i>Bean</i> )	Referensi
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	Kedelai	(Sumi et al., 1990)
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	Kedelai	Fujita et al. (1993)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. CK	CK	Kedelai	W. Kim et al. (1996)
Tofuyo, Jepang	<i>B. pumilus</i> TYO-67	SMCE	Kedelai	Yasuda et al. (1999)
Doenjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. DJ-4	Subtilisin DJ-4	Kedelai	S. H. Kim & Choi (2000)
Tempe, Indonesia	<i>Enterococcus faecalis</i>	Nattokinase	Kedelai	Yoon et al. (2002)
Tempe, Indonesia	<i>Bacillus subtilis</i>	Nattokinase	Kedelai	Yoon et al. (2002)
Thua Nao, Thailand	<i>Bacillus subtilis</i> 38	-	Kedelai	Chantawannakul et al. (2002)
Douchi, Cina	<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	Subtilisin DFE	Kedelai	Peng et al. (2003)
Soybean Grits, Korea	<i>Bacillus firmus</i> NA-1	-	Kedelai	Seo & Lee (2004)
Natto, Jepang	<i>B. subtilis</i> 168	NKCP	Kedelai	Omura et al. (2005)
Doen-jang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. DJ-2	bpDJ-2	Kedelai	Choi et al. (2005)
Tempe, Indonesia	<i>Bacillus subtilis</i> TP6	TPase	Kedelai	Seong Bo et al. (2006)

Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> DC33	Subtilisim FS33	Kedelai	C. T. Wang et al. (2006)
Thua Nao, Thailand	<i>Bacillus subtilis</i>	Nattokinase	Kedelai	Inatsu et al. (2006)
Tempe, Indonesia	<i>Fusarium</i> sp. BLB	FP	Kedelai	Sugimoto et al. (2007)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	-	Kedelai	S. H. Wang et al. (2008)
Natto, Jepang	<i>B. natto</i> B-12	Nattokinase	Kedelai	C. Wang et al. (2009)
Meju, Korea	<i>Bacillus polyfermenticus</i>	-	Kedelai	Bora et al. (2010)
Cheonggukjang, Korea	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CH86-1	AprE86-1	Kedelai	A. R. Lee et al. (2010)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus subtilis</i>	Bp-K2	Kedelai	E. J. Kim et al. (2011)
Fermentasi Buncis, Cina	<i>Bacillus amyloliquefacies</i>	-	Buncis	Wei et al. (2011)
Cheonggukjang, Korea	<i>Bacillus licheniformis</i> CH 3-17	-	Kedelai	Jo et al. (2011)
Natto-Red Bean, Taiwan	<i>Bacillus subtilis</i>	P2	Kacang Merah	Chang et al. (2012)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	DFE	Kedelai	Yuan et al. (2012)
Doenjang, Korea	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	Kedelai	T. W. Kim et al. (2012)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus subtilis</i> SCD 115035	-	Kedelai	M. H. Kim et al. (2012)
Natto, Jepang	<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2616	Nattokinase	Kedelai	Kapoor & Panda (2013)
Tempe Gembus, Indonesia	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>B. pumilus</i> 2.g	Kedelai	Afifah et al. (2014)
Doenjang, Korea	-	-	Kedelai Hitam	H. E. Kim & Kim (2014)
Oncom Merah, Indonesia	<i>Bacillus licheniformis</i> RO3	-	Kedelai	Afifah et al. (2015)
Doenjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp.	Nattokinase	Kedelai	Jeon et al. (2016)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	Kedelai	Nailufar et al. (2016)
Tempe, Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i> FNCC 6010	TpFE	Kedelai Hitam	Poernomo et al. (2017)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	Kedelai	Stephani et al. (2017)
Tempe Bongkrek, Indonesia	-	-	Kedelai	Sasmita et al. (2018)
Pasta Kedelai, Cina	<i>Neurospora sitophila</i>	-	Kedelai	Deng et al. (2018)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Protease Steno	Kedelai	Kurnia et al. (2018)

Douchi, Cina	<i>B. subtilis</i> MX-6	Nattokinase	Kedelai	Man et al. (2019)
Natto, Jepang	<i>Bacillus subtilis</i> G8	<i>B. subtilis</i> G8	Kedelai	Lucy et al. (2019)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> DC27	DFE 27	Kedelai	Hu et al. (2019)

---

Makanan fermentasi di Asia Jepang, Korea, Indonesia, Thailand, Cina, dan Taiwan seperti mengandung komponen yang bersifat fibrinolitik (Tabel 2). Sebagian besar makanan fermentasi yang mengandung enzim fibrinolitik menggunakan substrat kedelai dengan mikroorganisme fermentatif golongan *Bacillus sp.* Namun demikian, penelitian ini menemukan bahwa *Rhizopus sp.*, *Fusarium sp.*, dan *Enterococcus faecalis* dapat juga mensintesis enzim TpFE, FP dan Nattokinase yang dapat mengaktifkan *fibrinolytic pathway* di dalam tubuh, sehingga berpotensi untuk membantu penyembuhan pasien atherothrombosis.

Berdasarkan *evidence strength* pada Tabel 4-6, penelitian masih perlu untuk dilakukan agar dapat memberikan bukti ilmiah yang kuat. Sebagian besar komponen aktif yang bersifat fibrinolitik pada makanan fermentasi berbasis *bean* di Asia telah teruji secara *in vitro*, namun sejauh ini hanya Nattokinase yang diekstrak dari Natto, makanan fermentasi khas Jepang yang telah teruji klinis memberikan efek. Review terkait ini, masih terus akan dilakukan.

**Tabel 3. Analisa Pengujian Aktivitas Fibrinolitik (*In Vitro* - FAPA & Animal)**

Makanan	Mikroorganisme	Enzim Fibrinolitik	Metode	Bahan Uji	Kondisi	Dosis Sampel	Hasil Aksi	Referensi
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	Fibrin plate	Bovine fibrin plate	Suhu 37 ° C selama 15 jam	10 µL	N/A	Fujita et al. (1993)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. CK	CK	Fibrin plate (bebas plasminogen)	[2,5 ml 1,2% (berat / volume) fibrinogen manusia (Sigma) dalam bufer natrium fosfat 0,1 M, pH 7,4] dicampur dengan 0,1 ml larutan trombin (100 NIH U / ml; Sigma ) dan 7,4 ml larutan agarose 1% (berat / vol)	Suhu 37°C selama 8 jam	2 µL	0.331 U	W. Kim et al. (1996)
			Fibrin plate (kaya plasminogen)	2 ml fibrinogen (1.5% [vol / vol]) dan 0.5 ml plasminogen (10 U / ml)			0.536 U	
							0.494 U	

Doenjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. DJ-4	Subtilisin DJ-4	Fibrin plate	5 ml 0.6% (wt/vol) larutan fibrinogen, 5 ml 2% (wt/vol) larutan agarosa dengan 0.1 ml larutan trombin	Suhu 37°C selama 6 jam	20 µL	145.56 ± 1.75 U	S. H. Kim & Choi (2000)
Tempe, Indonesia	<i>Enterococcus faecalis</i>	Nattokinase	Fibrin plate	Fibrinogen manusia dilarutkan dalam 10 mM buffer natrium fosfat (pH 7,4) ke konsentrasi akhir 0,5% diikuti dengan menambahkan trombin (10 unit NIH)	Suhu 37°C selama 12 jam	20 µL	7.24 U/mg	Yoon et al. (2002)
Douchi, Cina	<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	Subtilisin DFE	Fibrin plate (bebas plasminogen)	Fibrinogen (mengandung sedikit plasminogen)	N/A	N/A	N/A	Peng et al. (2003)
Soybean Grits, Korea	<i>Bacillus firmus</i> NA-1	N/A	Fibrin plate	10 ml fibrinogen 0.5% dengan 0.1 ml trombin (100 NIH units/ml)	Suhu 37°C selama 2 jam	20 µL ekstrak kasar enzim	3,4 unit / ml	Seo & Lee (2004)
Natto, Jepang	<i>B. subtilis</i> 168	NKCP	Tabung	Gumpalan darah manusia (laki-laki, sehat)	Enzim dalam suhu kamar	0,1 mg/ml	Gumpalan darah mulai larut setelah 10 menit	Omura et al. (2005)
Tempe, Indonesia	<i>Bacillus subtilis</i> TP6	TPase	Fibrin plate (bebas plasminogen)	Fibrinogen manusia (0,5%, b / v, Sigma) dilarutkan dalam 10	Suhu 37°C selama 6 jam	50 µL	N/A	Seong Bo et al. (2006)

				mM buffer natrium fosfat (pH 7,4)				
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> DC33	Subtilisim FS33	Tabung (bebas plasminogen)	Gumpalan darah tikus Wistar (jantan)	Suhu 80°C selama 30 menit (menonaktifkan faktor fibrinolitik endogen seperti plasmin, plasminogen, dan t-PA)	0.5 g	Gumpalan darah larut dalam 2 jam	C. T. Wang et al. (2006)
Thua Nao, Thailand	<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilisin NAT	Fibrin plate	Urokinase Fuji 60.000 (digunakan untuk aktivitas fibrinolitik standar (0.1-200 U cm <sup>-3</sup> ))	Suhu 37°C selama 16 jam	0.01 cm <sup>3</sup>	4.7 ± 2.4 U cm <sup>-3</sup>	Inatsu et al. (2006)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	N/A	Tabung (bekuan litik)	50 ml fibrinogen dan 5 ml trombin (diinkubasi suhu kamar selama 1 jam)	Suhu 37°C selama 24 jam	100 µL (20 mg)	Mendegradasi fibrinogen, plasmin dan trombin dalam 30 menit	S. H. Wang et al. (2008)
Cheonggukjan g, Korea	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CH86-1	AprE86-1	Fibrin plate	N/A	Suhu 37°C selama 10 jam	20 µL	N/A	A. R. Lee et al. (2010)
Douchi, Cina		DFE				259 U	Tidak ada efek	Yuan et al. (2012)



	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547		Tabung (antikoagulan)	Darah kelinci (New Zealand)	Suhu 37°C selama 30 menit	518 U	Ada efek	
						1035 U	Ada efek	
						2070 U	Ada efek (terbaik)	
			Tabung (bekuan litik)	Darah kelinci (New Zealand)	Suhu 37°C selama 24 jam	259 U	73%	
						518 U	83%	
						1035 U	91%	
						2070 U	98%	
Tempe, Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i> FNCC 6010	TpFE	Fibrin plate (bebas plasminogen)	5 ml fibrinogen 0,5% b/v dari plasma sapi dalam 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) dengan 5 ml 2% (b/v) agarosa dan 0.1 ml trombin (100 NIH U/ml)	Suhu 37°C selama 18 jam (setiap 6 jam diamati)	10 µL ekstrak kasar enzim	N/A	Poernomo et al. (2017)
			Tabung	Gumpalan darah tikus sehat	Suhu kamar 25 / 50 / 75 detik	250 µL	75.10 / 87.79 / 89.05 %	
						500 µL	92.58 / 96.66 / 97.46 %	
						Saline (kontrol)	8.16 / 7.70 / 8.77 %	
Douchi, Cina	<i>B. subtilis</i> MX-6	Nattokinase	Fibrin plate (bebas plasminogen)	N/A	Suhu 37 °C selama 18 jam	10 µL ekstrak kasar enzim	21.6 mm (puncak jam ke-72 jam)	Man et al. (2019)
Natto, Jepang	<i>Bacillus subtilis</i> G8	<i>B. subtilis</i> G8	Tabung	Darah ayam (dikoagulasi dari pasar lokal)	Suhu 37°C	0.1 g pada 1 ml media	Bekuan darah berkurang setelah 2 jam	Lucy et al. (2019)

Keterangan :

Aktivitas fibrinolitik berdasarkan pemurnian enzim fibrinolitik pada makanan fermentasi

N/A = Not Available (data tidak tersedia)

**Tabel 4. Analisa Pengujian Aktivitas Fibrinolitik (*In Vivo* - Animal)**

Makanan	Mikroorganisme	Enzim Fibrinolitik	Model	Mekanisme Aksi	Spesies dan Spesifikasi Hewan	Kondisi Hewan	Perlakuan	Dosis	Hasil Aksi	Referensi
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	Intravena (trombosis vena saphenous)	Infus bovine fibrinogen dan bovine thrombine melalui vena saphenous eksternal hewan	Anjing (Mongrel), jantan, berat 10.1-10.6 kg	N/A	Diberikan secara oral kepada anjing dan aktivitas fibrinolitik dalam plasma dilihat setelah duodenum tercapai. Trombosis dievaluasi dengan angiografi dengan memasukkan kateter ke dalam arteri femoralis dan menyuntikkan 4 ml angiographin selama 2 detik. Angiogram diperoleh sebelum pembentukan	Plasebo	60 ± 10 menit (2.5-12 jam)	(Sumi et al., 1990)
				250 mg NK/kapsul				30 ± 18 menit (30 menit) / 41 ± 13 menit (1jam) / 54 ± 11 menit (3 jam) / 55 ± 9 menit (6 jam)		

							trombus dan pada 2.5 / 5 / 12 / 18 / 25 jam setelah trombosis			
Natto, Jepang	<i>B. subtilis</i> 168	NKCP	Arteriovenous shunt (n=6)	Hemorrhage	Tikus (Sprague-Dawley) jantan berusia 8 minggu	Mengalami kerusakan endotel dan gangguan aliran darah (pemberian 0.65 mg/L kalium peperangan (Eisai Corp, Tokyo) sebagai pasokan air selama 11 hari sebelumnya	NKCP 5 dan 250 mg/kg disiapkan dengan salin dan diberikan langsung ke loop tertutup duodenum 2 jam setelah kanulasi, setelah 6 jam darah diambil melalui aorta	5 mg/kg enzim NKCP	17,4 ± 0,4 / detik	Omura et al. (2005)
								250 mg/kg enzim NKCP	21,3 ± 1,7 / detik	

						dari kanulasi)				
Meju, Korea	<i>Bacillus polyfermenticus</i>	N/A	Rat-tail bleeding (n=9)	Hemorrhage	Tikus	Sehat (ditempatkan di kandang berventilasi baik pada suhu kamar dengan siklus terang/gelap 12 jam)	Transeksi 1 cm dari ujung, darah dibersihkan interval 20 detik	Kedelai fermentasi <i>B. polyfermenticus</i> sekali sehari (1/2/4 minggu)	Minggu 1 : 5.1 ± 1.3 / menit	Bora et al. (2010)
				Coagulation			Transeksi 1 cm dari ujung, darah dibersihkan interval 30 detik		Minggu 2 : 5.9 ± 2.23 / menit	
									Minggu 1 ; 4.39 ± 1.67 / menit	
									Minggu 2 : 4.73 ± 1.7 / menit	
									Minggu 4 : 6.49 ± 1.07 / menit	

Douchi , Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	DFE	Rat-tail bleeding (n=4)	Hemorrhage	Tikus (Kunming) jantan dan betina	Sehat (ditempatkan di kandang stainless steel di ruang hewan berventilasi, air suling dan makanan steril untuk tikus tersedia ad libitum, tikus puasa 24 jam sebelumnya)	Diberi NS dan DFE (sesuai dosis) melalui mulut selama 1 minggu, ujung ekor dipotong 3 mm, darah dibersihkan interval 30 detik	0 (kontrol )		Yuan et al. (2012)	
							2206 U/35 g bb				
							4412 U/35 g bb				
							8824 U/35 g bb				
				Trombolitik			Diberi NS dan DFE (sesuai dosis) melalui mulut selama 1 minggu, setengah jam setelah perawatan diijenksi 17 µL / 10 g bb	0 (kontrol )			Panjang trombus : 3.7 cm
								2051 U/35 g bb			Panjang trombus : 2 cm
								4103 U/35 g bb			Panjang trombus : 0.4 cm

							karaginan. Diukur interval 24 jam	8206 U/35 g bb	Panjang trombus : 0.2 cm	
Oncom , Indone sia	<i>Stenotrop homonas</i> sp.	N/A	Arteriovenous shunt	Trombolitik	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) jantan, Wistar, berat 300-400 gr, ekor >13 cm	Sehat (diaklimatisasi selama 7 hari di kamar yang terkontrol)	Disuntik aqua (plasebo), diobati oral salin 3 kali sehari	-	-	Nailufar et al. (2016)
							Disuntik kappa karagenan, 1 mg/kg bb, diobati oral (sesuai dosis) 3 kali sehari selama 8 hari	Salin (tanpa dosis)	N/A (13 cm)	
								Lumbrokinase 25 mg/kg bb	70,35 ± 23,11% (8,9 ± 3,4 cm)	
								Ekstrak kasar 25 mg/kg bb	56,99 ± 15,95% (8,4 ± 4,2 cm)	
							Enzim semipurifikasi (endapa	71,5 ± 15,7% (10,9 ± 2,2 cm)		

								n amoniu m sulfat) 25 mg/kg bb		
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Tabel 5. Analisa Pengujian Aktivitas Fibrinolitik (*Ex Vivo* - Animal)**

Makanan	Mikroorganisme	Antikoagulan	Model	Spesies dan Spesifikasi Hewan	Kondisi Hewan	Perlakuan	Dosis	Hasil Aksi	Referensi
Tempe, Indonesia	<i>Enterococcus faecalis</i>	Kultur Bebas Sel E. faecalis BRCA-5 (CS)	Antiplatelet	Tikus (Sprague-Dawley) jantan berat 200-250 g	Sehat (puasa 24 jam (diperbolehkan minum air)	4.5 ml darah utuh diambil dari jantung tikus yang dianestesi menggunakan jarum suntik dengan jarum 26G yang mengandung 0.5 ml natrium sitrat 3.8%. Aliquot dari seluruh darah (450 µL) diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 menit diikuti dengan penambahan 5 µL kolagen untuk	Kontrol, aspirin, dan CS diberikan dengan dosis 100 mg/kg bb/hari selama 4 minggu berturut-turut	Aktivitas CS menunjukkan lebih dari 50% aktivitas antiplatelet dari aspirin	Yoon et al. (2002)

						menginduksi agregasi platelet.			
--	--	--	--	--	--	--------------------------------	--	--	--

**Tabel 6. Analisa Pengujian Aktivitas Fibrinolitik (*In Vivo* - Human)**

Makanan	Mikroorganisme	Enzim Fibrinolitik	Spesifikasi	Kondisi Sukarelawan	Perlakuan	Dosis	Waktu	Hasil Aksi			Referensi
									ELT (jam)	EFA (mm <sup>2</sup> )	
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	12 orang Jepang (6 laki-laki dan 6 perempuan, usia antara 21-55 tahun)	Sehat	Sampel darah diambil secara berkala 1/10 dari 3.8% volume sodium sitrat (sebagai antikoagulan), pengambilan darah dilakukan jam 10 pagi	Diberi 200 g natto / kedelai rebus (kontrol) sehari sekali sebelum sarapan, atau 2 enteric-coated kapsul berisi NK (650 mg/cap) 3 kali dalam satu hari setelah makan	Jam				(Sumi et al., 1990)
							0	Natto	31.5 ± 6.2	0	
							2		16.4 ± 8.6	8.4 ± 5.1	
							4		16.7 ± 6.6	15.2 ± 3.0	
							8		19.3 ± 12.0	5.8 ± 4.1	
							12		27.4 ± 10.3	1.9 ± 5.2	
							24		31.9 ± 8.9	0.8 ± 0.6	
							0			32.2 ± 6.3	
							2		33.4 ± 9.0	0	



							4	Kedelai rebus (kontrol)	$35.2 \pm 4.8$	0	
							8		$36.1 \pm 5.5$	0	
							12		$34.6 \pm 7.3$	0	
							24		$34.6 \pm 7.7$	$0.4 \pm 0.2$	

## **FAKTOR YANG MEMPENGARUHI ENZIM FIBRINOLITIK PADA MAKANAN FERMENTASI BERBASIS KACANG (*BEAN*) DI KAWASAN ASIA**

Enzim fibrinolitik adalah agen yang melarutkan gumpalan fibrin (Mine et al., 2005). Mekanisme kerja enzim fibrinolitik adalah dengan menghidrolisis fibrin yang menyebabkan bekuan darah menjadi produk terlarut yang dapat dibuang dari peredaran darah sehingga membebaskan pembuluh darah dari bekuan darah dan memulai proses penyembuhan dinding pembuluh darah (Escobar *et al.*, 2002).

Enzim fibrinolitik dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis berdasarkan mekanisme kerjanya. Pertama enzim fibrinolitik yang bekerja dengan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin aktif untuk didegradasi fibrin atau aktivator plasminogen (PA), seperti aktivator jaringan plasminogen (t-PA) (Collen & Lijnen, 2004), streptokinase (SK), dan urokinase (UK) (Duffy, 2002). Kedua jenis enzim fibrinolitik seperti plasmin yang secara langsung menurunkan fibrin, sehingga melarutkan trombi dengan cepat dan sepenuhnya (Kotb, 2013). Salah satu contoh enzim fibrinolitik yang bekerja mendegradasi fibrin secara langsung (*direct*) seperti plasmin yaitu enzim Nattokinase. Berdasarkan Tabel 7, aktivitas enzim fibrinolitik dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor dimana pada enzim fibrinolitik yang sama ternyata memiliki *range* kondisi optimum dan yang berbeda. Hal ini mengindikasikan bahwa terdapat faktor lain yang mempengaruhi.

Jenis mekanisme yang sering dijumpai pada makanan fermentasi yaitu enzim fibrinolitik yang tergolong dalam protease serin. Enzim fibrinolitik yang paling dikenal dari mikroorganisme yaitu protease serin, seperti enzim fibrinolitik yang terdapat dari berbagai jenis *B.subtilis* (C. Wang et al., 2009). Enzim fibrinolitik yang termasuk dalam protease serin dicirikan dengan memiliki gugus serin di tempat aktifnya dan dapat dihambat dengan adanya 3,4-*dichloroisocoumarin*, *diisopropyl fluorophosphate* (DFP), *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), dan *tosyl-lysine chloromethyl keton* (TLCK) (Kotb, 2013). Menurut Govind et al. (1981), enzim jenis ini biasanya aktif pada pH netral dan alkali dengan pH optimum antara pH 7 dan 11 serta memiliki massa molekul berkisar antara 18 dan 35 kDa, serta memiliki titik isoelektrik antara pH 4 dan 6.

Namun selain protease serin, enzim fibrinolitik dengan jenis metalloprotease juga sudah ditemui pada makanan fermentasi. Menurut (Kotb, 2013), metalloprotease merupakan salah satu jenis enzim fibrinolitik yang memiliki jenis katalitik protease yang beragam. Metalloprotease dicirikan

**Tabel 7. Karakteristik Enzim Fibrinolitik pada Makanan Fermentasi Berbasis Kacang (*Bean*) di Kawasan Asia**

Makanan	Mikroorganisme	Enzim Fibrinolitik	Golongan Enzim Berdasarkan Katalitiknya	Mol. wt., pI, pH, suhu (optimal)	pH, suhu (stabil)	Referensi
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	N/A	N/A	N/A	(Sumi et al., 1990)
Natto, Jepang	<i>Bacillus natto</i>	Nattokinase	Protease serin	28 kDa, pI 8.7, N/A, N/A	pH 6–12, suhu <50°C	Fujita et al. (1993)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. CK	CK	Protease serin	28.2 kDa, N/A, pH 10, suhu 70°C	pH 7-10.5, suhu <50°C (60 menit)	W. Kim et al. (1996)
Tofuyo, Jepang	<i>B. pumilus</i> TYO-67	SMCE	N/A	30 kDa, pI 9.75, N/A, suhu 65°C	N/A	Yasuda et al. (1999)
Doenjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. DJ-4	Subtilisin DJ-4	Protease serin	29 kDa, N/A, pH 10, suhu 40°C	pH 4-11, suhu ruang (48 jam)	S. H. Kim & Choi (2000)
Tempe, Indonesia	<i>Enterococcus faecalis</i>	Nattokinase	N/A	N/A, N/A, N/A, suhu 37°C (5 jam)	pH 4.5-8, suhu 25-40°C	Yoon et al. (2002)
Tempe, Indonesia	<i>Bacillus subtilis</i>	Nattokinase	N/A	N/A	N/A	Yoon et al. (2002)
Thua Nao, Thailand	<i>Bacillus subtilis</i> 38	N/A	Metalloprotease	N/A, N/A, pH 6.5, suhu 47°C	N/A	Chantawannakul et al. (2002)
Douchi, Cina	<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	Subtilisin DFE	Protease serin	28 kDa, pI 8, pH 9, suhu 48°C	pH 6-10, suhu <50°C (60 menit)	Peng et al. (2003)
Soybean Grits, Korea	<i>Bacillus firmus</i> NA-1	N/A	N/A	N/A	pH 7-9, suhu 40°C	Seo & Lee (2004)
Natto, Jepang	<i>B. subtilis</i> 168	NKCP	Protease serin	34 kDa, N/A, N/A, N/A	N/A	Omura et al. (2005)
Doen-jang, Korea	<i>Bacillus</i> sp. DJ-2	bpDJ-2	Protease serin	42 kDa, pI 3.5-3.7, pH 9, suhu 55-60°C	pH 6-10, 37°C (2 jam)	Choi et al. (2005)
Tempe, Indonesia	<i>Bacillus subtilis</i> TP6	TPase	Protease serin	29 kDa, N/A, pH 7, suhu 50°C	pH 6-6.5, suhu 37°C	Seong Bo et al. (2006)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> DC33	Subtilisim FS33	Protease serin	30 kDa, pI 8.7, pH 8, suhu 55°C	pH 5-12, suhu <60°C	C. T. Wang et al. (2006)
Thua Nao, Thailand	<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilisin NAT	N/A	N/A	N/A	Inatsu et al. (2006)
Tempe, Indonesia	<i>Fusarium</i> sp. BLB	FP	Protease serin	20.6 kDa, N/A, N/A, N/A	N/A	Sugimoto et al. (2007)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	N/A	Protease serin	30 kDa, N/A, pH 8, suhu 50°C	pH 7-10, suhu 37°C selama 50 menit	S. H. Wang et al. (2008)

Natto, Jepang	<i>B. natto</i> B-12	Nattokinase	Protease serin	29 kDa, N/A, pH 8, suhu 40°C	pH 9-12, suhu <50°C	C. Wang et al. (2009)
Meju, Korea	<i>Bacillus polyfermenticus</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	Bora et al. (2010)
Cheonggukjang, Korea	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CH86-1	AprE86-1	Metalloprotease	27 kDa, N/A, pH 6-7, N/A	N/A, suhu 45°C	A. R. Lee et al. (2010)
Fermentasi Buncis, Cina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	N/A	Protease serin	N/A, N/A, N/A, suhu 34°C	N/A	Wei et al. (2011)
Cheonggukjang, Korea	<i>Bacillus licheniformis</i> CH 3-17	AprE3-17	Protease serin	27 kDa, N/A, pH 6, N/A	pH netral, suhu 45°C	Jo et al. (2011)
Natto-Red Bean, Taiwan	<i>Bacillus subtilis</i>	P2	Protease serin	39.93 kDa, N/A, pH 9, suhu 60°C	N/A, suhu 30-35°C (60 menit)	Chang et al. (2012)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	DFE	N/A	N/A	N/A	Yuan et al. (2012)
Doenjang, Korea	<i>B. amyloliquefaciens</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	T. W. Kim et al. (2012)
Chungkookjang, Korea	<i>Bacillus subtilis</i> SCD 115035	N/A	N/A	N/A	N/A	M. H. Kim et al. (2012)
Natto, Jepang	<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 2616	Nattokinase	N/A	N/A, N/A, N/A, suhu 37°C	N/A	Kapoor & Panda (2013)
Tempe Gembus, Indonesia	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>B. pumilus</i> 2.g	Protease serin	20 kDa, N/A, pH 7, N/A	pH 7-9, suhu <50°C	Afifah et al. (2014)
Doenjang, Korea	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	H. E. Kim & Kim (2014)
Oncom Merah, Indonesia	<i>Bacillus licheniformis</i> RO3	N/A	Protease serin	<35 kDa, N/A, pH 8, suhu 60°C	N/A	Afifah et al. (2015)
Doenjang, Korea	<i>Bacillus</i> sp.	Nattokinase	N/A	N/A	N/A	Jeon et al. (2016)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	N/A	N/A	N/A	N/A	Nailufar et al. (2016)
Tempe, Indonesia	<i>Rhizopus oligosporus</i> FNCC 6010	TpFE	N/A	N/A, N/A, pH 5, suhu 45°C	pH <7, suhu <50°C	Poernomo et al. (2017)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	N/A	N/A	N/A	N/A	Stephani et al. (2017)
Tempe Bongkreng, Indonesia	N/A	N/A	Protease serin	75.82 kDa, N/A, pH 7, suhu 50°C	pH 4-7, suhu 30-50°C	Sasmita et al. (2018)
Pasta Kedelai, Cina	<i>Neurospora sitophila</i>	N/A	Protease serin	30 kDa, N/A, pH 7.4, suhu 37°C (24 jam)	pH 6.8-8.8, suhu 25°C-52°C	Deng et al. (2018)
Oncom, Indonesia	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Protease Steno	Protease serin	58.3 kDa, N/A, N/A, N/A	N/A	Kurnia et al. (2018)

Douchi, Cina	<i>B. subtilis</i> MX-6	Nattokinase	N/A	28 kDa, N/A, N/A, N/A	N/A	Man et al. (2019)
Natto, Jepang	<i>Bacillus subtilis</i> G8	<i>B. subtilis</i> G8	N/A	19.1 kDa, N/A pH 8, suhu 40°C	pH 6-9, suhu 30-50°C	Lucy et al. (2019)
Douchi, Cina	<i>Bacillus subtilis</i> DC27	DFE 27	Protease serin	29 kDa, N/A pH 7, suhu 45°C	pH 6-10, suhu 37°C (90 menit)	Hu et al. (2019)

Keterangan :

Aktivitas fibrinolitik berdasarkan pemurnian enzim dari makanan fermentasi

N/A = *Not Available* (data tidak tersedia)

logam. Semuanya dihambat oleh agen *chelating* seperti EDTA tetapi tidak oleh *agen sulphydryl* (DFP).

### **Pemurnian/Purifikasi Enzim Fibrinolitik**

Proses pemurnian enzim fibrinolitik pada makanan fermentasi dapat mempengaruhi jumlah aktivitas fibrinolisis. Pemurnian enzim yang biasa dilakukan saat ini melibatkan langkah fraksinasi pelarut organik, penggaraman, dan kromatografi (Xin et al., 2019). Bayouhd et al. (2000) pun melakukan pemurnian pada enzim protease alkali dengan tiga langkah pemurnian yaitu konsentrasi protein dengan presipitasi menggunakan amonium sulfat dan pelarut organik, kemudian dimurnikan dengan permeasi gel kolom Sephadex G-100, dan terakhir dilakukan pemurnian dengan kromatografi pertukaran ion dengan DEAE-selulosa.

Kromatografi merupakan metode pemurnian dengan prinsip di mana molekul-molekul dalam campuran diaplikasikan ke permukaan atau ke dalam padatan, dan fase diam fluida (fase stabil) terpisah satu sama lain sambil bergerak dengan bantuan fase gerak. Faktor-faktor yang efektif pada proses pemisahan ini meliputi karakteristik molekuler yang terkait dengan adsorpsi (cair-padatan), partisi (cair-padatan), dan afinitas atau perbedaan di antara bobot molekulnya (Cuatrecasas et al., 1968; Porath, 1997).

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode pemurnian protein berdasarkan salah satu ciri khas protein, selain itu juga digunakan untuk mengontrol pemurnian protein. Dalam pemurnian kolom kromatografi, Sephadex G merupakan bahan yang paling sering digunakan. Ada juga bahan lain yang sering digunakan yaitu dekstran, agarosa, dan juga poliakrilamida (Coskun, 2016).

Menurut Poernomo et al. (2017), dilakukan presipitasi amonium sulfat bertujuan untuk memisahkan enzim fibrinolitik dengan enzim lain. Selain itu pada penelitian yang dilakukan oleh Bayouhd et al. (2000), 70% amonium sulfat mampu menghasilkan pemulihan lebih dari 82% pada pemurnian enzim protease alkali. Sedangkan dari penelitian yang dilakukan (Vijayaraghavan & Prakash Vincent, 2014), 30%-70% amonium sulfat ditemukan optimum untuk presipitasi enzim fibrinolitik.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh (Baughman & Waugh, 1967), dilakukan kombinasi pertukaran kation antara Amberlite CG-50 atau selulosa fosfat dan diikuti penggunaan DEAE-selulosa dalam pemurnian sehingga didapatkan kemurnian tinggi dan stabilitas yang ditingkatkan

pada pemurnian fibrinolitik. Sedangkan pada pemurnian protease alkali yang dilakukan oleh Bayouhd et al. (2000), penggunaan kolom Sephadex G-100 mampu menghasilkan pemurnian enzim 7.6 kali lipat dengan pemulihan 55.7% dan dengan kromatografi pada DEAE-selulosa menghasilkan puncak tunggal aktivitas protease.

Pada enzim fibrinolitik nattokinase dilakukan pemurnian metode tradisional yaitu *fractional salting out*, namun menurut Fujita et al. (1993), metode ini masih memiliki tingkat pemurnian dan pemulihan yang rendah. Agrebi et al. (2009) melaporkan bahwa efisiensi pemurnian dihasilkan 4.97 lipatan dan yield 6.28% dengan menggunakan kombinasi dari kolom CM FF, kolom Sephadex G-100, dan kolom Sepharose Mono Q. Sedangkan Ko et al. (2004) menghasilkan 61.86 lipatan dan yield 7.4% dengan menggunakan kolom Sephacryl-100, kolom CM FF, dan kolom Superdex-75. Namun metode yang dilakukan oleh Agrebi et al. (2009) dan Ko et al. (2004) tersebut terbilang cukup mahal.

Dalam pemurnian nattokinase dan enzim fibrinolitik langkah terpenting yang harus dilakukan adalah penghilangan polisakarida yang sebagian besar terdiri dari produk metabolisme bakteri dan dapat berkombinasi dengan enzim (Ng, 1998). Polisakarida dapat mempengaruhi pemurnian karena memiliki muatan listrik dan dapat diserap oleh kromatografi penukar ion. Selain itu polisakarida dapat meningkatkan daya tahan asam nattokinase yang dapat mempengaruhi karakteristik biokimiawi dari enzim fibrinolitik. Sejauh ini protokol pemurnian untuk nattokinase jarang melibatkan penghilangan polisakarida dari enzim sehingga karakteristik biokimia yang didapat tidak akurat (Xin et al., 2019).

Metode pemurnian tradisional memang biasa dilakukan, namun memiliki kelemahan yaitu waktu produksi yang lama, selektivitas yang rendah, pemulihan aktivitas yang rendah, dan produktivitas yang rendah. Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Xin et al. (2019), protokol terbaik untuk menghasilkan enzim fibrinolitik yang alami, ramah lingkungan, hemat biaya, dan dapat diformulasikan untuk menjadi makanan fungsional fibrinolitik dengan melakukan tiga langkah pemurnian. Pertama dengan presipitasi amonium sulfat dan ultrafiltrasi, kemudian pemurnian kromatografi (disarankan kromatografi Q HP), dan terakhir dengan menggunakan kolom Sephacryl-100.

## **A. Berat Molekul**

Berat molekul suatu mikroorganisme yang memiliki aktivitas fibrinolitik dapat diketahui dengan melakukan uji SDS-PAGE. *Polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) dengan adanya anionik deterjen *sodium dodecyl sulfate* (SDS) merupakan alat yang digunakan untuk pemisahan dan identifikasi rantai polipeptida (Maizel, 1966). Pada penggunaan SDS-PAGE, protein terdenaturasi oleh adanya deterjen SDS sehingga dapat memisahkan protein sesuai dengan berat molekul (Shapiro et al., 1967).

Pada Tabel 3. dapat diketahui hasil berat molekul enzim fibrinolitik dengan metode SDS-PAGE pada beberapa makanan fermentasi sebagian besar berkisar antara 28 hingga 29 kDa, hal ini menunjukkan bahwa enzim fibrinolitik ini termasuk dalam golongan protease serin karena memiliki massa molekul antara 18 hingga 35 kDa (Govind et al., 1981). Enzim fibrinolitik yang tergolong protease serin berdasarkan berat molekulnya yaitu enzim Nattokinase (Fujita et al., 1993), dan enzim Subtilisin DFE (Peng et al., 2003), Enzim CK (W. Kim et al., 1996), dan Enzim Subtilisin DJ-4 (S. H. Kim & Choi, 2000). Sedangkan untuk enzim Jeot-gal dengan berat molekul sebesar 41 kDa (H. K. Kim et al., 1997), merupakan enzim fibrinolitik dengan jenis golongan metalloprotease.

## **B. Spesifikasi Substrat**

Tinggi rendahnya aktivitas fibrinolitik dapat dipengaruhi dari substrat yang digunakan. Semua enzim fibrinolitik ini memiliki spesifisitas substrat yang tinggi terhadap fibrin, berbeda dari protease lain dengan spesifisitas substrat yang luas (Kotb, 2013). Plasmin diketahui dapat mendegradasi fibrin dan substrat protein. Plasmin merupakan enzim proteolitik yang bekerja pada pH netral, serta dapat menghidrolisis protein yang terjadi secara alami seperti fibrin, fibrinogen, dan akselerator globulin. Salah satu contoh substrat protein untuk enzim ini yaitu kasein dan gelatin (Sherry et al., 1959).

Karena substrat protein untuk aktivitas fibrinolitik cocok dengan kasein dan gelatin, banyak peneliti yang melakukan uji spesifikasi substrat dengan menggunakan bahan ini. Pengujian aktivitas proteolitik dari enzim fibrinolitik terhadap protein lain dapat digunakan  $\alpha$ -kasein, kasein, susu skim, dan sel darah merah. Untuk substrat larut air digunakan  $\alpha$ -kasein, dan aktivitas kasein dapat ditentukan oleh produksi tirosin melalui metode spektrofotometri. Sedangkan untuk substrat yang tidak larut air, dapat digunakan metode *agar plate* yang hampir mirip dengan metode *fibrin plate* (H. K. Kim et al., 1997).



Karena pencernaan parsial fibrin yang serupa oleh plasmin diketahui meningkatkan fibrinolisis dengan menyediakan lisin C-terminal dalam rantai A $\alpha$  yang berikatan dengan plasminogen dan t-PA (43).

Plasmin dan subtilisin sering dibandingkan dengan enzim fibrinolitik lainnya. Hal ini dikarenakan enzim yang dapat mendegradasi fibrin yang serupa dengan plasmin diketahui meningkatkan fibrinolisis dengan menyediakan lisin C-terminal dalam rantai A $\alpha$  yang berikatan dengan plasminogen dan t-PA (Suenson et al., 1990). Subtilisin adalah salah satu dari dua famili protease serin yang besar (yang lainnya adalah famili serin protease seperti tripsin). Subtilisin hanya ditemukan pada mikroorganisme, terutama enzim dari *Bacillus*, dengan subkelompok subtilisin sejati (> 64% identitas), protease alkali tinggi (> 55% identitas), dan protease intraseluler (> 37% identitas) (Siezen & Leunissen, 1997).

Subtilisin BPN, subtilisin Carlsberg, thermitase, dan proteinase K sering dibandingkan dengan jenis protease serin lain karena inti dari sekitar 190 residu ini mengandung hampir semua elemen  $\alpha$ -helix dan  $\beta$ -strand yang umum (Siezen & Leunissen, 1997). H. K. Kim et al. (1997) juga menambahkan bahwa subtilisin Carlsberg merupakan protease alkali yang umum dengan urutan N-terminal yang identik. Pada makanan fermentasi Tofuyo, diketahui bahwa enzim SMCE dari *B. pumilus* TYO-67 memiliki struktur protein yang mirip dengan subtilisin Carlsberg dari *B. licheniformis* (Yasuda et al., 1999).

Pada enzim Nattokinase diketahui memiliki spesifikasi pada substrat subtilisin dibanding substrat untuk plasmin, sehingga Nattokinase merupakan enzim pertama yang memiliki aktivitas fibrinolitik sebagai protease seperti subtilisin (Fujita et al., 1993). Begitu juga dengan enzim Subtilisin DFE memiliki substrat paling sensitif terhadap subtilisin sehingga termasuk dalam protease jenis subtilisin, serta memiliki spesifisitas substrat yang relatif tinggi terhadap fibrin. Subtilisin DFE mampu mendegradasi fibrin secara langsung, namun tidak memiliki kemampuan mengubah plasminogen menjadi plasmin (Peng et al., 2003).

Enzim CK dapat bereaksi dengan dua substrat yaitu substrat kromogenik dan plasminogen. Selain itu aktivitas fibrinolitik enzim CK juga dibandingkan dengan subtilisin Carlsberg dan didapatkan hasil bahwa enzim CK dapat menurunkan fibrin sekitar delapan kali lebih tinggi daripada subtilisin Carlsberg (W. Kim et al., 1996).

Enzim Subtilisin DJ-4 memiliki N-terminal yang identik dengan subtilisin BPN, namun memiliki aktivitas fibrinolitik lebih tinggi 2.2 kali dari pada subtilisin BPN dan subtilisin Carlsberg. Enzim Subtilisin DJ-4 telah diidentifikasi sebagai plasmin (S. H. Kim & Choi, 2000). Sedangkan enzim bpDJ-2 pada substrat sintesis plasmin kurang efisien dibanding subtilisin BPN dan subtilisin Carlsberg, namun memiliki rasio aktivitas fibrinolitik dengan kaseinolitik masing-masing 2 dan 3.6 kali lebih tinggi daripada subtilisin BPN dan subtilisin Carlsberg (Choi et al., 2005).

Pada pengujian yang dilakukan oleh (H. K. Kim et al., 1997), enzim Jeotgal memiliki aktivitas spesifik. Enzim ini menunjukkan sedikit aktivitas pada kasein atau gelatin, dan tidak ada aktivitas pada sel-sel darah merah dalam uji *agar plate*. Diketahui enzim Jeotgal mampu menguraikan fibrin secara langsung.

Pada uji aktivitas fibrinolitik yang dilakukan Sumi et al. (1995) dengan membandingkan *fibrin plate* dan plasmin standar, ditemukan bahwa aktivitas fibrinolitik enzim KK 2.6 kali lebih besar dari pada plasmin. Selain itu enzim ini memiliki spesifikasi substrat >80% pada tripsin. Menurut (Sherry et al., 1959), tripsin mampu menjadi mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin yang dapat mendegradasi fibrin.

### **C. pH dan Suhu**

Keberhasilan aktivitas fibrinolitik pada suatu enzim dipengaruhi oleh kondisi pH dan suhu. Dalam aktivitas fibrinolisis, plasminogen harus dikonversi menjadi plasmin. Plasminogen merupakan prekursor enzim fibrinolitik yang terjadi secara alami. Plasminogen murni relatif tidak stabil pada pH netral dan alkali (Sherry et al., 1959). Plasminogen murni larut dibawah pH 4 dan diatas pH 8.6, dan sedikit larut pada pH netral. Namun kelarutan plasminogen pada pH netral dapat meningkat apabila ada penambahan lisin, asam e-aminokaproat, dan gliserol (N. Alkjaersig et al., 1958; Norma Alkjaersig et al., 1957). Sehingga aktivitas plasminogen dalam proses fibrinolisis dapat diturunkan dengan pH netral dan alkali.

Plasmin adalah enzim proteolitik yang bekerja pada pH netral, dan mampu menghidrolisis protein yang terjadi secara alami seperti fibrin, fibrinogen, akselerator globulin. Enzim proteolitik mirip tripsin, aktif pada pH netral dan mampu menghidrolisis sejumlah protein lain serta fibrin (Sherry et al., 1959). Enzim proteolitik diketahui dapat menghasilkan aktivitas fibrinolitik untuk proses fibrinolisis. Enzim proteolitik aktif pada pH netral dan mampu menghidrolisis sejumlah protein lain serta fibrin (Sherry et al., 1959). Enzim fibrinolitik pada makanan fermentasi yang paling

banyak ditemui yaitu jenis protease serin. Menurut (Govind et al., 1981), enzim jenis ini biasanya aktif pada pH netral dan alkali dengan pH optimum antara pH 7 dan 11.

Pada Tabel 3. dapat diketahui bahwa enzim Nattokinase, Subtilisin DFE, CK, Subtilisin DJ-4, dan bpDJ-2 tergolong protease serin. Enzim Nattokinase memiliki kestabilan aktivitas fibrinolitik pada kisaran pH 6-12. Selain itu dalam penelitian yang dilakukan oleh Fujita et al. (1993), aktivitas fibrinolitik pada enzim Nattokinase hilang ketika suhu lebih dari 50°C, sehingga enzim dapat aktif pada suhu <50°C.

Enzim fibrinolitik dengan rentang kisaran pH yang paling luas dimiliki oleh enzim KK yang stabil pada pH 1-10 dengan suhu 37°C. Sedangkan suhu optimal untuk enzim ini yaitu 60°C (Sumi et al., 1995). Enzim dengan rentang pH luas kedua yaitu enzim Subtilisin DFE memiliki kisaran pH luas di sekitar alkali yaitu pH 6-10, sehingga enzim ini tergolong protease alkali. Aktivitas fibrinolitik enzim ini mencapai optimal pada pH 9 dan suhu 48°C (Peng et al., 2003).

Enzim CK memiliki aktivitas fibrinolitik optimal pada pH 10, diatas pH 11 dan dibawah pH 6 aktivitas fibrinolitik akan menurun. Diketahui suhu optimal untuk enzim CK yaitu 70°C dalam aktivitas fibrinolitik (W. Kim et al., 1996). Sedangkan Enzim Subtilisin DJ-4 memiliki aktivitas fibrinolitik optimal pada pH 10 dan suhu 40°C (S. H. Kim & Choi, 2000). Diketahui bahwa enzim bpDJ-2 memiliki titik isoelektrik asam yaitu pada pH 3.5-3.7, namun enzim ini tergolong dalam protease alkali karena memiliki aktivitas fibrinolitik dalam rentang pH basa. Serta memiliki aktivitas fibrinolitik maksimum pada pH 9 dan suhu 55-60°C (Choi et al., 2005).

Enzim Jeotgal memiliki aktivitas fibrinolitik yang stabil pada rentang pH 7-9, namun memiliki aktivitas relatif pada pH 4-10. Enzim ini dapat bekerja secara optimal pada pH 7 dan suhu 40°C. Karena aktivitas fibrinolitik optimum pada pH luas di sekitar netral, enzim ini tergolong sebagai enzim metalloprotease (H. K. Kim et al., 1997).

pH optimal untuk aktivitas fibrinolitik pada enzim SMCE belum diketahui secara pasti, namun aktivitas enzim menurun karena pH meningkat dari 5.9 menjadi 7. Enzim ini memiliki suhu optimum yaitu 65°C (Yasuda et al., 1999).

#### **D. Inhibitor, Aktivator, dan Ion Logam**

Sherry (1959) menyebutkan aktivator plasminogen yang alami yaitu t-PA, plasma kinase, urokinase, tripsin, serta plasmin. Disebutkan oleh Seegers et al. (1965) bahwa *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) dapat menghambat tripsin dan kimotripsin, dimana tripsin merupakan salah satu aktivator konversi plasminogen menjadi plasmin.

Enzim fibrinolitik yang termasuk dalam protease serin dicirikan dengan memiliki gugus serin di tempat aktifnya dan dapat dihambat dengan adanya *3,4-dichloroisocoumarin*, *diisopropyl fluorophosphate* (DFP), *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), dan *tosyl-lysine chloromethyl keton* (TLCK). Sedangkan enzim protease jenis metalloprotease telah diakui berdasarkan sifat asam amino yang melengkapi situs pengikatan logam. Semuanya dihambat oleh agen *chelating* seperti *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) tetapi tidak oleh *agen sulfhydryl* (DFP) (Kotb, 2013).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dubey et al. (2011), enzim nattokinase sepenuhnya dihambat oleh PMSF, EDTA, dan SDS. Serta sebagian aktivitas enzim dihambat oleh adanya  $\text{HgCl}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Disebutkan bahwa aktivator pada enzim nattokinase terjadi ketika adanya penambahan  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  dan  $\text{MgSO}_4$ . Hal ini terbukti dari penelitian yang telah dilakukan oleh Fujita et al. (1993) didapatkan hasil enzim Nattokinase sepenuhnya dihambat oleh PMSF.

Aktivitas fibrinolitik dari enzim Subtilisin DFE sepenuhnya dihambat oleh PMSF dan sebagian dihambat oleh benzamidine hidroklorida, leupeptin, dan pepstatin A. EDTA, EGTA dan apoptin tidak menghambat aktivitas fibrinolitik. Sehingga menunjukkan bahwa Subtilisin DFE adalah protease serin (Peng et al., 2003).

Aktivitas fibrinolitik pada enzim CK sepenuhnya dihambat oleh PMSF dan sebagian dihambat oleh EDTA, asam e-aminocaproic, E64, dan pepstatin A. Enzim ini tergolong protease serin (W. Kim et al., 1996). Disebutkan oleh (Sherry et al., 1959) bahwa asam e-aminocaproic dapat menghambat aksi proteolitik dari tripsin dan plasmin.

Enzim Subtilisin DJ-4 dihambat oleh PMSF serta dihambat oleh logam  $\text{Cu}^{2+}$  dan  $\text{Zn}^{2+}$ . Sedangkan EDTA serta ion logam  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  tidak memberikan efek signifikan pada aktivitas fibrinolitik enzim. Sehingga enzim ini tergolong protease serin (S. H. Kim & Choi, 2000).

Aktivitas enzim bpDJ-2 dihambat oleh PMSF dan SDS, tetapi tidak dipengaruhi oleh leupeptin, EDTA, atau EGTA. Hasil ini menunjukkan bahwa bpDJ-2 adalah protease serin. Selain itu, aktivitas enzim dihambat oleh logam  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , atau  $Zn^{2+}$ , tetapi tidak oleh  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , atau  $Mn^{2+}$  (Choi et al., 2005).

Pada enzim Jeotgal, aktivitas fibrinolitik logam  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  dan  $Fe^{3+}$  menghambat aktivitas enzimatis. Logam  $Zn^{2+}$  mengaktifkan sedikit aktivitas dari enzim. Pada penelitian yang dilakukan oleh H. K. Kim et al. (1997), inhibitor protease serin (DFP, TLCK, TPCK dan PMSF) tidak mempengaruhi aktivitas fibrinolitik. Inhibitor tripsin (SBTI dan aprotinin), hanya sedikit mempengaruhi aktivitas fibrinolitik. Namun agen *chelating* seperti EDTA, dan dua inhibitor metalloprotease yaitu 2,2'-bipiridin dan o-fenantrolin, sangat menekan aktivitas enzimatis. Sehingga enzim Jeotgal dapat digolongkan sebagai jenis metalloprotease.

Menurut Kotb (2013), metalloprotease merupakan salah satu jenis enzim fibrinolitik yang memiliki jenis katalitik protease yang beragam. Metalloprotease dicirikan oleh persyaratan untuk ion logam divalen sebagai aktivitasnya. Kurang lebih terdapat 30 jenis metalloproteases telah diakui berdasarkan sifat asam amino yang melengkapi situs pengikatan logam. Semuanya dihambat oleh agen *chelating* seperti EDTA tetapi tidak oleh *agen sulfhydryl* (DFP).

Aktivitas fibrinolitik enzim SMCE dihambat sepenuhnya oleh DFP dan kimostatin. Aktivitas enzim tidak dihambat oleh penambahan *p-chloromercuri-benzoate* (PCMB), leupeptin, pepstatin A, dan tripsin. Adanya ion logam  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  dan  $Sr^{2+}$  menyebabkan aktivitas enzim fibrinolitik bekerja lebih dari dua kali lipat, terutama logam  $Ca^{2+}$  membuat stabilitas enzim meningkat (Yasuda et al., 1999).

Aktivitas fibrinolitik enzim KK dihambat oleh DFP, SBTI, BPTI atau aprotinin (Sumi et al., 1995). Walaupun belum disebutkan jenis enzim ini oleh Sumi et al. (1995), ada kemungkinan enzim KK merupakan enzim protease serin. Hal ini dikarenakan inhibitor enzim KK merupakan inhibitor pada enzim jenis protease serin.

Kemampuan inhibitor PMSF pada enzim protease serin terbukti dari aktivitas fibrinolitik yang terhambat sepenuhnya oleh kehadiran PMSF pada enzim Nattokinase, Subtilisin DFE, CK, Subtilisin DJ-4, bpDJ-2, dan Jeotgal.

Buckell (1958) menemukan bahwa sitrat bisa menjadi aktivator yang dapat mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin. (Siezen & Leunissen, 1997) mengungkap bahwa dari struktur kristal subtilisin, termitase, dan proteinase K; ion kalsium sangat penting untuk stabilitas dan aktivitas.

## KESIMPULAN

Sebagian besar produk pangan fermentasi di kawasan Asia berbasis kacang (bean) terbukti memiliki aktivitas fibrinolitik yang dapat bermanfaat bagi kesehatan. Hal ini terlihat dari mekanisme aksi dari enzim tersebut di dalam metabolisme tubuh. Dengan demikian mengonsumsi makanan olahan fermentasi berbasis kacang memiliki manfaat kesehatan yang disebut sebagai pangan fungsional.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifah, D. N., Sulchan, M., Syah, D., Yanti, Suhartono, M. T., & Kim, J. H. (2014). Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus pumilus* 2.g Isolated from Gembus, an Indonesian Fermented Food. *Preventive nutrition and food science*, 19(3), 213-219. doi: 10.3746/pnf.2014.19.3.213
- Bagoly, Z., et al. (2012). Factor XIII, clot structure, thrombosis. *Thromb Res*, 129(3): p. 382-7.
- Barus, Tati., Linda Wati, Melani, Antonius Suwanti dan Yogiara. (2017). Diversity of Protease-Producing *Bacillus* spp. From Fresh Indonesian Tempeh Based on 16S rRNA Gene Sequence. *Journal of Biosciences*, 24(1), 35-40
- Borah, D., et al. (2012). Production, Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis*, Isolated from Tea Garden Soil Samples of Dibrugarh. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3): p. 124-125.
- Candrasedkaran, S.D., et al. (2015). Exploring the In Vitro Thrombolytic Activity of Nattokinase from a New Strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS. *Jundishapur J Microbiol*, 8(10).
- Escobar CE, Harmaening DM, Simmons VL, Smith, Moore KM, Wyrick-Glatzel J. (2002). Introduction to Hemostasis. Dalam: DM Harmening (ed.), *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. (Edisi Keempat) FA Da-vis, Philadelphia.
- Fontana, P., et al. (2014). Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway. *J Cardiovasc Transl Res*, 7(1): p. 29-38.
- Haritha, M., et al. (2011). Nattokinase: A review of fibrinolytic enzyme. *Chemical, environmental and pharmaceutical research*, 2(1): p. 61-66.
- Hu, Y., Yu, D., Wang, Z. et al. (2019). Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Sci Rep* 9, 9235 doi:10.1038/s41598-019-45686-y
- Jespersen, J. and T. Astrup, (1983). A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. Optimal conditions, reproducibility and precision. *Haemostasis* 13(5): p. 301-15.

- Kanno, Y. (2019). The Role of Fibrinolytic Regulators in Vascular Dysfunction of Systemic Sclerosis. *Int J Mol Sci* 20(3)
- Kim, S. B., Lee, D. W., Cheigh, C. I., Choe, E. A., Lee, S. J., Hong, Y. H., . . . Pyun, Y. R. (2006). Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33(6), 436-444. doi: 10.1007/s10295-006-0085-4
- Kotb, E. (2012). *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. Springer New York, p. 1-7.
- Lam, A.C., et al. (2017). A cross-sectional study of the knowledge, attitude, and practice of patients aged 50 years or above towards herpes zoster in an out-patient setting. *Hong Kong Med J* 23(4): p. 365-73.
- Obeid, A.E.F.E., et al. (2015). Isolation and Characterization of *Bacillus Subtillus* with Potential Production of Nattokinase. *International Journal of Advanced Research*, 3(3): p. 94-101.
- Viles-Gonzalez, J.F., J.J. Badimon, and V. Fuster. (2004). Atherothrombosis: A widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *European Heart Journal* 25(14): p. 1197-1207.
- Xiaoyan, Z., Zhenya, Z., Yingnan, Y., HaiTao, C., Guihua, Z., & Ji, L. (2010). Thrombolytic Activities of Nattokinase Extracted from *Bacillus Subtilis* Fermented Soybean Curd Residues. *International Journal of Biology*, Vol. 2 (2): 120-125



## LAMPIRAN

Kegiatan penelitian ini telah dilakukan mulai bulan Desember 2019, dengan rincian jadwal kegiatan dan anggaran yang dapat dilihat pada Lampiran 1. Review ini akan terus dilaksanakan, mengingat informasi yang didapatkan masih perlu dilengkapi

### Lampiran 1. Pelaksanaan Kegiatan

No.	Kegiatan								
		Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Jun
1.	Persiapan alat dan bahan	V	V						
2.	Pelaksanaan metode penelitian		V	V	V	V			
3.	Analisis data						V		
4.	Penulisan laporan							V	
5.	Presentasi hasil penelitian								V

### Lampiran 2. Laporan Keuangan

#### RINCIAN PENGELUARAN PROYEK PENELITIAN – FIBRINOLITIK

No.	Tanggal	Nama Barang	Jumlah	Harga
1.	20/02/20	Tempe “Pak Rosilin”	8 pcs (@ 1 kg)	Rp. 80.000
2.	02/03/20	Bawang Putih	500 gr	Rp. 24.000
		Bawang Merah	300 gr	Rp. 12.000
		Daun Salam	30 lembar	Rp. 2.000

		Santan “Sasa”	1 L	Rp. 32.000
		Daun Melinjo	10 lembar	Rp. 2.000
		Jeruk Nipis	5 pcs	Rp. 4.000
		Laos	2 pcs	Rp. 4.000
		Jahe	2 pcs	Rp. 8.000
3.		Terasi Udang ABC	1 pack	Rp. 18.000
		Minyak Goreng Sania (pouch)	2 L	Rp. 28.000
		Minyak Goreng Sania (botol)	2 L	Rp. 33.000
		Kecap Manis Bango	600 ml	Rp. 26.000
4.	03/03/20	Tempe	5 pcs	Rp. 30.000
		Daun Bawang	1 ikat	Rp. 6.000
		Air Kelapa	1,5 L	Rp. 3.000
		Gula	100 gr	Rp. 1.000
		Telur	6 butir	Rp. 10.000
5.	10/03/20	N Hexane	10 L	Rp. 180.000
6.		Tempe “Pak Rosilin”	8 pcs (@ 1 kg)	Rp. 80.000
7.	11/03/20	Tempe “Pak Rosilin”	4 pcs (@ 1 kg)	Rp. 40.000
8.	12/03/20	N Hexane	10 L	Rp. 170.000
	28/02/20	Kasein Hammarsten	3 gr	Rp. 30.000
		Akrilamida	30 gr	Rp. 780.000
		Bis-akrilamida	3 gr	Rp. 112.500
		TEMED	1 ml	Rp. 67.500
		APS	0,5 gr	Rp. 10.000
		Tabung Plastik	4 pcs	Rp. 40.000
<b>TOTAL PENGELUARAN</b>				<b>Rp. 1.833.000</b>
<b>TOTAL ANGGARAN</b>				<b>Rp 3.500.000</b>
<b>ANGGARAN YANG TEREALISASI</b>				<b>Rp 1.667.000</b>

Catatan : Metode penelitian mengalami perubahan akibat Pandemi Covid-19 dan terbatasnya akses dalam melaksanakan penelitian pada Laboratorium di luar Unika. Perubahan metode yang dimaksud yaitu pergeseran metode penelitian dari *in vitro* menjadi *review*. Sehingga, penyelesaian proyek ini membutuhkan waktu yang lebih lama. Anggaran yang belum terealisasi akan tetap digunakan untuk melanjutkan proyek penelitian ini.



10/03/20

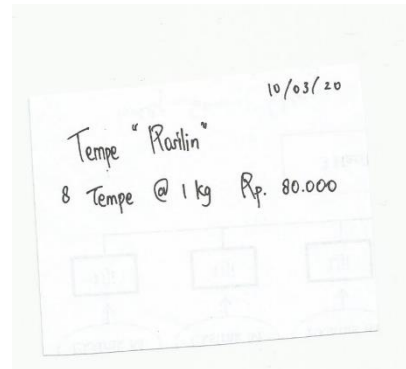
PT. MULTI KIMIA RAYA NUSANTARA  
JL. Sidodadi Timur 20, Telp. 8450665 - 8316850 Semarang 50125  
NPWP: 01 244 672 0511 000, Kep: S.125/WPJ.05/KI.1115/89

Kepada :  
MAS ANDI  
10-03-2020 08:56:19 20200310.02.030

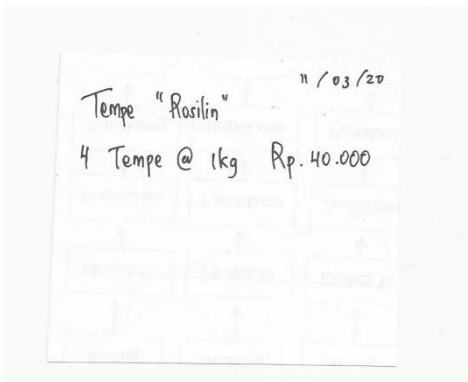
N HEKANE	@ 200 LT			
10,000 LTR	x	16,000.00	-	160,000.00
JERRYCAN 5 L NAT/OFT 19SG				
2,000 PCS	x	10,000.00	-	20,000.00
<b>TOTAL = 180,000.00</b>				

Cara Bayar : TUNAI  
Di Bayar : 180,000.00  
Kembali : 0.00

Note : Kasir : VINA  
Barang yang sudah dibeli,  
tidak dapat ditukar / dikembalikan



11/03/20



12/03/20

PT. MULTI KIMIA RAYA NUSANTARA  
JL. Sidodadi Timur 20, Telp. 8450665 - 8316850 Semarang 50125  
NPWP: 01 244 672 0511 000, Kep: S.125/WPJ.05/KI.1115/89

Kepada :  
MB FLORENZ  
12-03-2020 10:42:49 20200312.02.076

N HEKANE	@ 200 LT			
10,000 LTR	x	17,000.00	-	170,000.00
JERRYCAN 5 L NAT/OFT 19SG				
2,000 PCS	x	0.00	-	0.00
<b>TOTAL = 170,000.00</b>				

Cara Bayar : TUNAI  
Di Bayar : 170,000.00  
Kembali : 0.00

Note : Kasir : VINA  
Barang yang sudah dibeli,  
tidak dapat ditukar / dikembalikan

