

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Infark Miokard Akut

1. Pengertian IMA

Berupa kematian jaringan miokardium akibat kurang seimbangnya pasokan oksigen ke jantung secara mendadak dan disebabkan oleh rupture athroma sehingga menimbulkan penumpukan trombosit menjadi thrombus dan spasme coroner (Jaka S *et al.*, 2020).

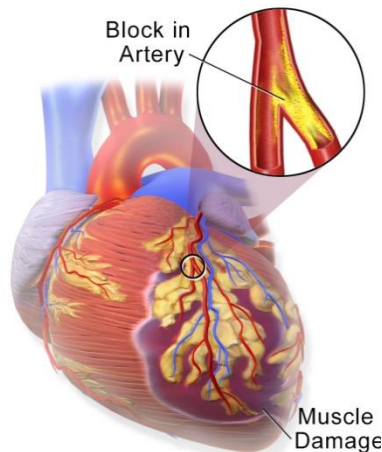
Reaktivasi platelet, agregasi platelet, dan trombosis disebabkan oleh pecahnya plak yang menyebabkan penurunan aliran darah secara tiba-tiba. Ketika trombus menutup lumen, aliran darah koroner tersumbat menyebabkan pembentukan trombus di dalam arteri koroner, yang mengakibatkan aliran darah yang buruk dan menghambat distribusi oksigen ke jaringan distal (Gonzales, 2000).

2. Gejala klinis IMA

Gejala yang dialami oleh penderita IMA adalah mual muntah, lemas, kulit terasa dingin, dan rasa nyeri yang secara tiba-tiba terjadi dan menyeluruh. Ciri khas nyeri pada Infark Miokard Akut adalah nyeri yang menyebar (Faizah, 2017). Keluhan khusus penderita IMA yaitu dada nyeri seperti diremas, ditekan, ditusuk, atau dada terasa panas. Adanya peningkatan asam laktat yang dihasilkan dari proses metabolisme anaerob pada saat terjadi iskemia pembuluh darah menyebabkan nyeri dada muncul.

3. Patofisiologi

Plak pada IMA sering dijumpai, Plak arterioma yang robek serta pecah selanjutnya diikuti dengan proses agregasi trombosit serta pengaktifan jalur koagulasi. Setelahnya akan terbentuk trombus yang banyak mengandung trombosit. Trombus kemudian menyumbat lubang pembuluh darah secara total maupun sebagian, selain itu trombus dapat berubah menjadi lebih berat. Ketika suplai darah yang masuk berkurang maka akan terjadi iskemia miokardium, dan apabila terjadi lebih dari 20 menit maka akan mengakibatkan nekrosis pada miokard (*infark miokard*) (PERKI, 2015).



Gambar 1. Penyumbatan arteri (PERKI, 2015).

Sel miokardium memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap adanya perubahan pH yang menyebabkan fungsinya mengalami penurunan. Asidosis yang terjadi menyebabkan miokardium lebih rentan terhadap aksi enzim lisosom dalam sel. Kemampuan jantung untuk memompa darah juga akan menurun akibat penurunan kontraktilitas. Ketika sel miokard mati, enzim intraseluler akan dilepaskan ke dalam sirkulasi, sehingga sel miokard dapat dikenali menggunakan pengujian laboratorium (Joyce, 2014). Nekrosis miokard dimulai di daerah terbatas di bawah permukaan endokardium dan pusat iskemik setelah penyumbatan arteri koroner. Di area ini, IMA biasanya menyebabkan perfusi darah dan obstruksi (Robbins, 2005).

IMA tidak selalu disebabkan karena oklusi total arteri koroner. Namun iskemia, yang mengakibatkan gangguan kontraktilitas miokardium akibat proses hibernating dan stunning (pasca iskemia), dan distritmia serta perubahan fisiologis dari ventrikel (PERKI, 2015)

4. Jenis IMA

4.1. STEMI (ST-Elevation Myocardial Infarction), pada infark miokard akut elevasi ST, penyumbatan total arteri koroner menyebabkan wilayah infark yang lebih luas yang meliputi ketebalan miokardium (Kingma Jr., 2018). Arteri koroner mengalami pembentukan trombus singkat di lokasi kerusakan pembuluh darah akibat merokok, tekanan darah tinggi, dan penumpukan lemak (Dipiro, 2015). Jaringan mati miokard yang parah dengan kenaikan ST (STEMI) akan terjadi ketika ada penurunan aliran darah koroner yang tidak terduga sebagai akibat dari gumpalan yang menyumbat plak aterosklerotik sebelumnya. Di lokasi kerusakan pembuluh darah, yang

disebabkan oleh merokok, tekanan darah tinggi, dan penumpukan lemak, bekuan darah cepat terbentuk.

STEMI merupakan indikator yang digunakan untuk kejadian oklusi total yang terjadi pada arteri koroner, baik secara medis dengan obat fibrinolitik maupun secara mekanis dengan adanya sumbatan koroner. Revaskularisasi diperlukan dalam hal ini untuk mendapatkan aliran darah dan reperfusi miokard kembali normal. agen pelapis kulit (Irmalita *et al.*, 2015).

4.2. NSTEMI (Non-ST Elevation Myocardial Infarction), terjadi ketika vena koroner utama tersumbat sebagian atau vena koroner kecil tersumbat seluruhnya, keduanya menyebabkan aterosklerosis. Profil EKG akan menunjukkan segmen ST yang tertekan atau penyisipan gelombang T. Selain EKG, tes troponin jantung diperlukan untuk mengevaluasi apakah pasien menderita NSTEMI atau Unstable Angina (UA). Pembacaan troponin kardiovaskular memberikan ilustrasi yang jelas tentang NSTEMI, mereka mulai dengan peningkatan tajam dan kemudian terus menurun dengan mantap (Cohen dan Visveswaran, 2020).

Infark miokard non-STEMI dapat disebabkan oleh salah satu dari empat mekanisme patofisiologis. Gangguan mekanis progresif, dianggap sebagai penyebab paling umum, ruptur plak, dan elemen lainnya telah ditemukan. Perubahan aliran oksigen ke jantung dapat mengakibatkan penyumbatan dinamis dan angina tidak stabil selanjutnya (Fauci *et al.*, 2008).

B. Bakteri Fibrinolitik

Mikroorganisme biasanya menghasilkan enzim (Vinod *et al.*, 2014). Mikroorganisme yang produksi enzim fibrinolitiknya dapat diteliti antara lain bakteri. Bakteri mungkin hanya digunakan untuk menghasilkan, memproduksi, dan mengisolasi enzim. Bakteri lebih menguntungkan sebagai sumber enzim karena dapat ditumbuhkan dengan mudah, ukuran produksi sel dapat diperbesar dengan mudah, proses produksi tidak tergantung musim, waktu penyelesaiannya tidak lama, dapat tumbuh pada substrat yang murah, mudah dikendalikan, dan dapat menghasilkan tingkat enzim yang sangat tinggi (Meyrath dan Volavseck, 1975).

Kemampuan bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 (Peng *et al.*, 2003) untuk membuat enzim fibrinolitik telah diteliti. Sumber agen

fibrinolitik adalah bakteri. *Bacillus subtilis* DC33 (C. T. Wang *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis* tipe A1 (Yang *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis* 168 (Kho *et al.*, 2005), spesies *Bacillus* DJ-2 (Choi *et al.*, 2005), dan *Bacillus sp.* K-1 (Yang *et al.*, 2006). Juga telah ditunjukkan bahwa bakteri *Streptomyces* menghasilkan enzim fibrinolitik dari *Streptomyces lividans* (Pimienta *et al.*, 2007), *Streptomyces sp* CS684 (Simkhada *et al.*, 2010).

Mikroorganisme penghasil enzim dari limbah layak dikembangkan dalam bidang farmasi. Berdasarkan penelitian Madaniyah (2013) yang mengidentifikasi mikroba pada tanah pembuangan ampas tahu, 1 kelompok bakteri hanya memiliki aktivitas proteolitik dan 9 kelompok bakteri memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik. Jamur tanah di hutan mangrove Wonorejo Surabaya menghasilkan enzim fibrinolitik dan memiliki aktivitas proteolitik pada 13 dari 13 jamur yang diteliti (Muisristanto *et al.*, 2015).

C. Limbah Kecap

Usaha pembuatan kecap merupakan salah satu industri rumah tangga yang menghasilkan dua bentuk limbah yang berbeda, yaitu limbah cair yang meliputi limbah air dari alat dan mesin pabrikasi pencucian, dan limbah padat yang terdiri dari ampas kedelai dan rempah-rempah serta campuran semi kecap (Indriyati dan Susanto JP, 2009). Limbah cair industri kecap memiliki kandungan unsur hara makronutrien dan mikronutrien (Rina, T *et al.*, 2017).

Perusahaan skala besar hanya diperbolehkan memanfaatkan limbah kecap sebagai pakan ternak, namun jika volume limbahnya berlebihan, sebagian dapat dibakar sehingga dapat merusak lingkungan. Usaha kecil seringkali membuang limbah kecapnya langsung ke sungai sehingga merugikan biota lingkungan perairan. Karena oksigen dipecah, permintaan oksigen majemuk akan meningkat. Keadaan ini menyebabkan kematian pada ikan-ikan yang ada dalam perairan tersebut (Srikandi *et al.*, 2011).

Karakteristik limbah cair industri kecap yaitu air berwarna gelap, proses fermentasi kecap menghasilkan reaksi polisakarida membentuk warna hitam. Komponen pencemaran air limbah kecap tidak stabil, Produk pabrik kecap banyak sekali jenis produksinya, oleh karena itu komposisi air limbahnya sangat kompleks. Limbah cair kecap

dengan konsentrasi bahan organik tinggi memiliki biodegradabilitas yang baik (Zuo *et al.*, 2016)

Limbah cair industri dengan kandungan dan warna organik yang banyak berasal dari proses pembuatan kecap (Indriyati dan Susanto JP, 2009). Belum banyak penelitian tentang pemanfaatan limbah kecap, namun diyakini masih mengandung beberapa protein, karbohidrat, dan nutrisi lainnya (Srikandi *et al.*, 2011). Bakteri dapat memanfaatkan komponen dalam cairan limbah dari kecap sebagai sumber nutrisi.

Bakteri mengubah zat kimia yang kompleks menjadi zat yang lebih sederhana. Selain itu, berbagai kelompok bakteri yang terlibat dalam penguraian sampah bekerja sama secara sinergis. Dalam Said dan Wahjono, 1999 menyatakan bahwa bakteri hidrolitik, bakteri asidogenik fermentatif, bakteri asetogenik, dan bakteri metanogen adalah empat jenis bakteri yang bekerja sama mengubah bahan-bahan kompleks menjadi molekul sederhana yaitu bakteri hidrolitik, salah satu dari empat kelompok mikroba yang berkontribusi secara signifikan terhadap pemecahan campuran alami yang kompleks menjadi atom sederhana. Senyawa organik kompleks seperti protein dapat dipecah menjadi molekul monomer terlarut seperti asam amino oleh bakteri hidrolitik anaerob. Senyawa kompleks dihidrolisis oleh enzim ekstraseluler seperti lipase, selulase, dan protease lipase (Polprasert Dalam Said dan Wahjono, 1999).

D. Agen Fibrinolitik

1. Macam agen fibrinolitik

1.1. Enzim fibrinolitik, bisa ditemukan pada banyak sumber di alam, dan juga menghambat pembentukan bekuan fibrin sehingga kemungkinan besar bagi enzim ini untuk digunakan sebagai terapi trombolitik. Enzim fibrinolitik memiliki karakteristik serta ciri khas antara lain fibrinolisis, fibrinogenolisis efek proteolitik, mengubah keseimbangan antara koagulasi dan antikoagulasi serta menghasilkan berbagai macam aplikasi terapeutik (Chung-Lu *et al.*, 2012).

1.2. Nattokinase, merupakan salah satu enzim fibrinolitik. Aktivitas protease dan fibrinolitik Nattokinase ditemukan pertama kali oleh penelitian Sawamura pada tahun 1906 dan penelitian Oshima pada tahun 1925. Nattokinase adalah protease serin yang disuling dan diekstraksi dari "natto", makanan tradisional Jepang yang terbuat dari

kedelai yang difermentasi dengan bakteri *Bacillus subtilis*, menurut sebuah penelitian yang diterbitkan dalam publikasi oleh Weng *et al.*, 2017). Nattokinase memiliki keuntungan yakni tidak memiliki efek samping, biaya lebih rendah, dan lebih lama waktu paruh, dibandingkan dengan plasmin mikroba lain seperti urokinase, t-PA dan streptokinase (Tai *et al.*, 2006).

Nattokinase Ini menghancurkan gumpalan darah dengan menghidrolisis substrat fibrin dan plasmin. Dengan mengganti endogenous friendly to urokinase dengan urokinase (uPA), menurunkan PAI-1 (*inhibitor activator plasminogen-1*) dan meningkatkan tissue plasminogen activator (t-Dad), yang mendukung gerakan fibrinolitik, adalah metode paling populer untuk memecah penggumpalan darah dengan katalis nattokinase. (Rika A *et al.*, 2020). Studi yang dilakukan menunjukkan bahwa pemberian nattokinase melalui oral mudah untuk diserap saluran usus hal ini terjadi karena nattokinase memiliki aktivitas yang kuat pada fibrinolitik setelah penyerapan intraduodenal, karakteristik inilah yang membuat nattokinase menjadi serbaguna serta enzim fibrinolitik yang ampuh dan dapat digunakan untuk mendegradasi pembekuan darah.

1.3. Enzim fibrinolitik dari jamur, studi pertama tentang enzim fibrinolitik dari jamur dan aplikasinya sebagai agen terapeutik adalah kompleks proteolitik dari jamur *Flammulina velutipes* yang dipelajari dengan kromatografi gel dan aktivitas kompleks enzim dibandingkan dengan *Aspergillus terricola* dan *Streptomyces griseus proteinases* (Morozova *et al.*, 1982). Pada tahun 2007 untuk pertama kali telah berhasil dilakukan purifikasi terhadap protease fibrinolitik dari *Fusarium sp.* BLB (FP), dan teridentifikasi asam amino N-terminal (Ueda *et al.*, 2007).

1.4. Urokinase, merupakan enzim yang telah disintesis di ginjal dan mempunyai kemampuan dalam melisiskan plasmin. U-PA berfungsi melalui aktivasi plasminogen secara langsung. Selain mengobati tromboemboli arteri dan vena, urokinase digunakan untuk mengobati emboli paru. Mirip dengan streptokinase, obat ini menghancurkan komponen pembekuan darah lainnya dan menghasilkan lisis sistemik, umumnya dikenal sebagai fibrinogenolisis. (Gunawan, 2007).

1.5. Alteplase, bekerja sebagai fibrinolitik dengan mengikat fibrin dan mengaktivasi jaringan plasminogen. Plasmin yang sudah

terbentuk kemudian akan mendegradasi fibrin sehingga dengan demikian dapat melarutkan trombus (Tjay *et al.*, 2007).

1.6. Tissue plasminogen activator (t-PA), tingkat plasma mengandung glikoprotein yang dikenal sebagai aktivator plasminogen jaringan, yang diproduksi oleh sel endotel. Aktivator plasminogen jaringan (t-PA) mengaktifkan plasminogen yang berikatan dengan fibrin lebih disukai daripada plasminogen bebas darah. Hasilnya, t-PA lebih akurat menargetkan pembekuan darah (Gunawan, 2017). t-PA hanya memiliki sedikit penggunaan klinis karena waktu paruhnya yang singkat, kebutuhan dosis terapi yang tinggi, dan spesifikasi fibrin yang buruk untuk oklusi ulang (Reddy, 1998).

1.7. Streptokinase, merupakan salah satu obat perawatan fibrinolitik yang telah disetujui FDA. Menurut Ghost *et al.*, (2012), diyakini bermanfaat dalam mengobati sejumlah kelainan pembuluh darah atau penyakit yang tercantum dalam Daftar Model Obat Esensial Organisasi Kesehatan Dunia. Plasminogen terikat oleh streptokinase, yang menyebabkan perkembangan kompleks enzim yang mengubah plasminogen menjadi plasmin. Selain itu, dapat meningkatkan jumlah protein yang dapat digunakan, yang akan meningkatkan disintegrasi klaster atau gumpalan darah (Fox *et al.*, 2013).

2. Mekanisme kerja agen fibrinolitik

Sistem fibrinolisis menggunakan agen fibrinolitik untuk menghidrolisis fibrin menjadi komponen larut, yang mirip dengan cara kerja plasmin. Demikian pula, ciri khas tindakan farmakologis trombolitik adalah konversi plasminogen menjadi plasmin, degradasi fibrinogen, dan induksi plasmin menjadi plasmin. Gumpalan darah yang menyumbat arteri darah dapat dilisiskan melalui metode trombolisis (juga dikenal sebagai fibrinolisis). Plasminogen akan diubah menjadi plasmin protein proteolitik melalui fibrinolisis. Plasmin mengubah bentuk trombus dan menghentikan terjadinya trombosis dengan mencerna fibrin secara proteolitik. (Kumada *et al.*, 1994).

Enzim fibrinolitik melakukan penghancuran gumpalan darah melalui hidrolisis fibrin, sehingga membentuk komponen yang bisa dikeluarkan dari sirkulasi. Proses ini memicu perbaikan dinding pembuluh darah dan membersihkan pembuluh darah dari gumpalan darah (Escobar *et al.*, 2002).

Enzim fibrinolitik dapat diberikan pada penderita trombosis karena enzim ini mampu melisiskan fibrin dalam bekuan darah menjadi

produk degradasinya yang lebih larut dalam darah (Sajuthi *et al.*, 2010). Enzim fibrinolitik dibagi menjadi dua golongan yaitu aktivator plasminogen dan fibrinolitik (like plasmin enzyme). Mengaktifkan plasminogen, enzim yang dikenal sebagai aktivator plasminogen dapat memicu sintesis enzim proteolitik plasmin. Aktivator plasminogen tipe jaringan (t-PA), urokinase (u-PA), dan streptokinase adalah contoh obat yang digunakan sebagai aktivator plasminogen (Vijayaraghavan dan Vincent, 2014). Cara kerja obat ini adalah dengan menstimulasi konversi plasminogen menjadi plasmin, yang dapat melarutkan bekuan fibrin dan melanjutkan aliran darah normal.

Aktivasi plasmin, kerusakan fibrin, degradasi fibrinogen, dan penghambatan aktivasi fibrinogen menjadi fibrin adalah empat fase utama aktivitas obat fibrinolitik. Plasmin diaktifkan oleh obat streptokinase dan anistreplase. Banyak enzim proteolitik memecah bekuan fibrin, menyebabkan kerusakan fibrin terlarut. Aktivitas enzim fibrinolitik dapat ditentukan dengan menggunakan metode lisis bekuan atau metode uji lempeng fibrin (Moroz dan Gilmore, 1975).

E. Isolasi Bakteri

Proses mengeluarkan bakteri dari media dan lingkungan asalnya serta menumbuhkannya di dalam media sehingga dapat dihasilkan biakan atau biakan murni dari hasil isolasi tersebut dikenal dengan istilah isolasi bakteri. Hasil isolasi berupa bakteri yang dapat diidentifikasi morfologi, sifat, dan kemampuan biokimianya. Pemindahan bakteri dilakukan menggunakan prosedur aseptik. Prosedur tersebut sangat penting karena melindungi tenaga kerja dan menghindari kontaminasi dari mikroorganisme lain (Singleton dan Sainsbury, 2006). Prinsip pemisahan adalah memisahkan antar jenis mikroba yang bersumber dari bermacam-macam mikroba (Afrianto, 2004). Adapun teknik kultur yang dapat digunakan untuk mendapatkan biakan murni, yaitu:

1. Cara penggoresan

Bertujuan untuk mendapatkan garis sebanyak mungkin pada permukaan media kultur dengan menggunakan jarum ose yang telah dicabut dari garis sehingga garis akhir koloni yang akan berkembang cukup berjauhan (Irianto, 2012). Teknik ini melibatkan penambahan media agar ke cawan petri steril. Begitu berada di dalam koloni bakteri, jarum ose dipanaskan. Jarum ose digoreskan pada media biakkan.

Media diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu kamar. (Barrow dan Feltham, 1993).

2. Cara penuangan

Tujuan cara penuangan sebagai perawatan perkiraan jumlah bakteri yang tumbuh dalam suatu cairan. Hasil perhitungan total bakteri dinyatakan dalam koloni (Irianto, 2012).

3. Cara penyebaran

Tujuan cara penyebaran sama dengan cara penuangan. Perbedaan kedua teknik tersebut terletak pada cara penuangan sampel dan media. Cara ini diawali dengan pengenceran sampel. Media dituang ke dalam cawan petri steril tunggu hingga memadat, selanjutnya sampel dituang diatas permukaan media. Penyebaran sampel dilakukan dengan menggunakan batang drugalsky yang telah dipanaskan (Waluyo, 2007).

F. Identifikasi Bakteri

1. Pengamatan makroskopis

Berdasarkan Dwidjoseputro (1989) pengamatan makroskopis dilakukan untuk mengetahui ciri-ciri koloni bakteri hasil isolasi. Bentuk koloni-koloni yang dapat dilihat dari atas berupa bulat (*circular*), tidak bertepi (*irregular*), serabut (*flamentus*), akar (*rhizoid*), dan lonjong (*spindle*). Sisi-sisi koloni menunjukkan permukaan datar (datar), datar terangkat (*elevated*), melengkung terangkat (cembung), dan berbukit (*umbonate*). Tepi koloni yang dapat terlihat dari atas adalah utuh, bergerigi, lobate, flammentus, dan undunate. Warna koloninya seperti putih yang hampir bening kekuningan.

2. Pengamatan mikroskopis

Tujuan pengamatan mikroskopis adalah untuk mengetahui bentuk sel dan ciri-ciri bakteri. Pengamatan mikroskopis pengujian biokimia dan pewarnaan Gram (Holt *et al.*, 1994).

2.1. Pewarnaan Gram, bertujuan untuk dapat mengetahui ukuran lebar dan bentuk yang rata-rata panjang hingga 10 mikron dan lebar 0,5 hingga 1 mikron sehingga perlu menggunakan pewarna yang dapat menutupi seluruh tubuh bakteri. Bakteri yang sesuai terlebih dahulu ditutup dengan larutan larutan ungu kristal, larutan yodium, alkohol (bahan pemucat), dan safranin (Pelezar dan Chan, 2008). Pewarnaan Gram adalah teknik untuk mengidentifikasi mikroorganisme Gram positif atau Gram negatif. Bahkan setelah

diputihkan (decolored), bakteri Gram-positif akan tetap berwarna ungu karena mengandung kompleks warna kristal violet-iodine. Sedangkan bakteri Gram negatif akan berwarna merah disebabkan adanya kompleks warna yang larut ketika diberikan zat peluntur sehingga mengambil zat warna kedua yang berwarna merah yaitu safranin. perbedaan struktur antara bakteri Gram positif dengan bakteri Gram negatif menyebabkan adanya perbedaan warna (Waluyo, 2007).

2.2. Uji biokimia, bertujuan untuk menemukan informasi dan mengidentifikasi bakteri berdasarkan karakteristik fisiologisnya. Gagasan pencernaan bakteri harus jelas dalam tes biokimia dari hubungan antara metabolit yang dihasilkan dengan reagen senyawa. Menurut Lay (1994), karakteristik biokimia suatu bakteri dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesiesnya. beberapa uji biokimia, yaitu:

2.2.1. Uji H_2S , bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menguraikan asam amino sistein menjadi asam sulfida (H_2S) yang menunjukkan adanya enzim desulfurase pada bakteri. Sistein adalah asam amino yang mengandung sulfur dan tidak terdapat di semua protein. Pada keadaan anaerobik sistein akan dipecah menjadi H_2S , asam asetat dan amonia sedangkan pada keadaan aerobik sistein akan terjadi asimilasi dan menghasilkan H_2S (Salle, 1961 dalam Safitri, 2019).

2.2.2. Uji katalase, bertujuan untuk mengetahui bakteri penghasil enzim katalase. Enzim katalase adalah enzim yang mempunyai fungsi mengkatalisis penguraian H_2O_2 menjadi udara dan O_2 . Pada proses metabolisme aerob H_2O akan terbentuk sehingga mikroorganisme aerob harus menguraikan H_2O_2 . Bakteri yang menghasilkan enzim katalase akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 yang ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen (Safitri, 2019).

2.2.3. Uji koagulase, bertujuan untuk mengetahui bakteri yang memproduksi enzim yang dapat menggumpalkan fibrin. Uji koagulase mempunyai dua metode, yaitu metode tabung dan metode slide. Uji metode koagulase tabung akan memberikan hasil setelah diinkubasi selama 4 sampai 24 jam, sedangkan metode uji slide memperoleh hasil yang lebih cepat hanya memerlukan waktu pelaksanaan selama 1-2 menit (Jawetz *et al.*, 2008). Uji koagulase metode tabung digunakan untuk mengidentifikasi adanya koagulase bebas dengan hasil positif

apabila terbentuk gumpalan dan ketika tabung dimiringkan gumpalan akan tetap berada di dasar tabung (Lay, 1994).

G. Uji Aktivitas Fibrinolitik

1. Ekstraksi enzim pada bakteri

Ekstraksi adalah proses pemisahan bahan aktif dari komponen tertentu. Enzim dapat dipisahkan dari sumber internal dan eksternal. Dasar ekstraksi adalah perpindahan massa komponen padat ke dalam pelarut, yang dimulai dari lapisan antarmuka dan dilanjutkan dengan difusi ke dalam pelarut. Disintegrasi, dispersi, dan kerangka adalah tiga fase umum ekstraksi yang dibagi menjadi kelompok-kelompok ini (Deutscher, 1990). Sumber dan lokasi enzim mempengaruhi proses ekstraksi. Enzim yang diperoleh diekstraksi dari sel dengan sentrifugasi..

2. Pemurnian enzim

Pemurnian enzim menurut Wardani & Ahsanaton (2012) adalah proses penghilangan kontaminan atau senyawa lain yang tidak diinginkan dari enzim yang diisolasi. Metode pemurnian enzim dapat dipilih berdasarkan sifat enzim tersebut karena sebagai protein tentunya enzim memiliki perbedaan dari segi kelarutan, muatan, serta ukurannya. Pemurnian yang dilakukan diharapkan dapat menghasilkan enzim yang mempunyai aktivitas spesifik yang lebih baik daripada ekstrak kasarnya (Lehninger, 2004). Terdapat 2 teknik yang sering dipakai dalam pemisahan enzim yaitu sebagai berikut:

2.1. Sentrifugasi, penggunaan teknik sentrifugasi sebagai salah satu teknik pemurnian enzim yang paling sering digunakan dalam penelitian. Sentrifugasi memiliki prinsip kerja dengan pemisahan berdasarkan ukuran dan BM senyawa uji. Sentrifugasi enzim hendaknya dilakukan pada temperatur rendah karena sifatnya yang termolabil guna meminimalisir kegagalan pemurnian enzim yang diinginkan (Yazid dan Nursanti, 2006).

2.2. Pengendapan dengan amonium sulfat, enzim dapat dimurnikan dengan menambahkan larutan pH, pelarut non polar dan penambahan garam. Namun pada umumnya pemurnian enzim menggunakan garam yang ditambahkan pada larutan enzim merupakan cara yang paling sering dilakukan. Jenis garam yang berguna untuk pemurnian enzim seperti NaCl, Na₂SO₄ dan (NH₄)₂SO₄. (NH₄)₂SO₄ mempunyai keuntungan yang lebih banyak dari pada jenis garam lain

yaitu kelarutan tinggi, tidak mempengaruhi aktivitas enzim, daya sedimentasi yang baik, stabil terhadap kebanyakan enzim serta mampu ditambahkan pada berbagai macam kondisi pH (Scopes, 1982).

Aturan yang digunakan untuk prosedur ini adalah memberi garam dengan perlahan-lahan membiarkan garam amonium sulfat mengembang dalam susunan senyawa. Selama penggaraman, ion garam dan molekul protein bersaing satu sama lain untuk berikatan dengan air. Dalam kondisi ini, protein dapat menjadi kurang larut bila diendapkan dengan konsentrasi garam yang tinggi. Lebih banyak udara daripada molekul protein yang biasanya melekat pada garam ketika jumlahnya banyak. Protein mengendap akibat sulitnya melarutkan protein dalam air. Garam dapat ditambahkan secara terus menerus dan bertahap ke dalam larutan untuk meningkatkan konsentrasi garamnya.

Protein memiliki jumlah ionisasi yang lebih rendah daripada garam, tetapi garam memiliki afinitas yang lebih besar terhadap air, yang menyebabkan protein menjadi aktif dan menyebabkan kompetisi antara garam dan protein untuk mempertahankan molekul air. Kepolaran protein yang kemudian tidak mampu bersaing dengan kepolaran milik garam menyebabkan molekul udara cenderung lebih tertarik pada garam. Hal tersebut mengakibatkan molekul air tidak lagi melindungi protein, sedangkan asam amino hidrofobik akan semakin muncul ke permukaan. Penambahan konsentrasi garam yang ditambahkan ke dalam ekstrak kasar enzim dilakukan pada suhu rendah untuk menghindari terjadinya denaturasi protein (Suhito, 2016).

Protein yang mengandung asam amino hidrofilik mengalami pengendapan (*salting out*). *Salting in* akan terjadi pada konsentrasi rendah karena ion-ion garam akan melindungi molekul protein (Scopes, 1987). Enzim yang telah dimurnikan menggunakan amonium sulfat dilarutkan dengan buffer fosfat yang bertujuan menjaga pH lingkungan sehingga mencegah terjadinya denaturasi dan inaktivasi ekstrak kasar enzim. Keuntungan metode pengendapan yaitu sederhana, efektif, dan relatif murah, tetapi metode tersebut belum efisien dalam pemurnian enzim karena garam-garam akan tertinggal selama proses pengendapan. Oleh karena itu, hasil ekstrak kasar enzim perlu dilakukan pemurnian tahap lanjutan agar diperoleh hasil yang maksimal (Abdi, 2020). Kandungan amonium sulfat yang masih tertinggal dalam protein dimurnikan menggunakan presipitasi aseton, pencucian dengan metanol, dan ekstraksi fenol (Wang *et al.*, 2006). Presipitasi aseton

merupakan metode pemurnian enzim secara parsial dengan pelarut organik (Wu *et al.*, 2014)

3. Analisis kadar protein

Analisis protein ekstrak enzim bakteri adalah metode analisis yang digunakan untuk mengukur kadar protein yang terdapat pada sampel presipitat protein. Analisis kadar protein berguna dalam mengukur jumlah enzim yang diperoleh setelah tahap pemurnian enzim. Metode analisis penetapan kadar protein yang biasa dilakukan adalah metode *Lowry*, *Biuret* dan *Bradford* (Sudarmadji *et al.*, 2007).

3.1. Metode *Biuret*, analisis protein dengan metode ini secara kualitatif diamati kompleks warna ungu menunjukkan bahwa terdapat protein akibat adanya pada pH basa, polipeptida protein berinteraksi dengan ion Cu^{2+} pada pereaksi biuret (Bintang, 2010). Dua spektrum cahaya maksimum, pada 270 nm dan 540 nm. Tetapi disarankan untuk menggunakan panjang gelombang 540 nm meskipun temuan yang dihasilkan oleh gelombang 270 nm memiliki sensitivitas enam kali lebih tinggi dibandingkan dengan panjang gelombang 540 nm. Hal ini disebabkan sebagian besar kombinasi pengganggu yang juga mempertahankan cahaya pada frekuensi 270 nm. (Remawati, 2016).

Pereaksi biuret terdiri dari campuran tembaga dengan kompleks natrium. Metode ini sering digunakan dalam menentukan nilai protein total plasma, cairan otak dan tulang belakang, serta urin. Kelebihan dari metode *Biuret* sendiri adalah dinilai sederhana daripada metode *Lowry* dan *Bradford*, menggunakan pereaksi yang sedikit, dan pengujian yang relatif lebih singkat. Teknik *Biuret* memiliki berbagai kelemahan, antara lain kurang sensitif dibandingkan dengan dua lainnya, membutuhkan sampel dengan konsentrasi yang sesuai, membutuhkan lebih banyak zat, dan sedikit dipengaruhi oleh senyawa garam seperti garam amonium. (Remawati, 2016).

3.2. Metode *Bradford*, merupakan teknik yang simpel, inkubasi tidak lama, tidak mahal, cocok dengan agen produksi, dan lebih reaktif (Cheng *et al.*, 2016). Kekurangan metode Bradford adalah kurva linier rentang pendek berkisar 2–120 $\mu\text{g/ml}$, sehingga larutan pengujian perlu diencerkan terlebih dahulu sebelum melakukan analisis, dan reaksi akan terhambat bila sampel memiliki kandungan detergent (Bintang, 2010). Larutan standar yang sering digunakan dalam metode ini adalah *Bovine Serum Albumine* (BSA) karena

memiliki tingkat kemurnian yang tinggi dan harga yang relatif murah (Hermiastuti, 2013).

BSA adalah serum protein albumin yang diperoleh dari sapi yang memiliki berat molekul 66 Kda dan memiliki komposisi asam amino yang lebih lengkap dibandingkan dengan protein lainnya yakni 20 macam (Wahana *et al.*, 2014). Konsentrasi *Bovine Serum Albumine* (BSA) yang sering digunakan adalah 0,3-1,00 mg/ml Hasanah *et al.*, 2015). Semakin banyak BSA yang digunakan, maka absorbansi protein yang dihasilkan juga semakin tinggi. Persamaan yang diperoleh dari kurva standar BSA dapat digunakan untuk menghitung kadar protein dalam larutan sampel (Utami *et al.*, 2016).

3.3. Metode Lowry, berdasarkan didasarkan pada kemampuan protein untuk didapatkan intensitas warna yang berbeda berdasarkan kandungan triptofan dan tirosin dari sampel. *Folin-ciocalteu*, yang berikatan dengan protein, akan menyebabkan larutan berubah dari kuning menjadi biru saat ditambahkan. Oleh karena itu reagen Folin akan diubah menjadi *heteromolybdenum* sebagai hasilnya. Keuntungan dari pendekatan ini adalah umumnya tidak terlalu menantang, membutuhkan tes protein yang lebih sedikit, dan agak murah daripada prosedur Biuret. Kelemahan metode *Lowry* adalah ketidakmampuannya untuk mengidentifikasi protein, yang lebih rentan terhadap kontaminasi dibandingkan dua metode lainnya dan sensitif terhadap fluktuasi pH dan konsentrasi protein yang rendah.

Panjang gelombang maksimum *bovine serum albumin* (BSA) ditentukan dengan menggunakan teknik *Lowry*. Penentuan frekuensi ini dilakukan untuk menentukan durasi retensi maksimum, yang kemudian dapat digunakan untuk memajukan interaksi konsumsi susunan *Follin-Ciocalteu* dan membuat variasi biru pucat yang dapat dipindai antara frekuensi 500 dan 740 nm. Absorbansi kompleks yang dihasilkan dipantau setiap 20 nm (Hambal Muhammad *et al.*, 2016). Pendekatan *Lowry* dibuat dengan memodifikasi metode Biuret. Teknik ini diciptakan pada tahun 1951 dan menggunakan reagen deteksi folin ciocalteu.

4. Metode uji fibrinolitik

4.1. Uji Clot Lysis, uji aktivitas enzim fibrinolitik menggunakan metode clot lysis bertujuan untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik pada isolat bakteri dengan cara mengamati persen fibrinolisis berdasarkan waktu terjadinya lisis bekuan darah atau waktu

Clot Lysis (CL). Uji *clot lysis* dilakukan dengan menggunakan gumpalan darah yang dapat berasal dari darah kelinci, darah manusia, maupun dari darah vena jugularis sapi. *Clot lysis* menjadi parameter dalam mengetahui aktivitas fibrinolitik dengan prinsip pada banyak maupun pembekuan darah selama waktu inkubasi. Sedikitnya terjadi lisis proporsi (%) fibrinolitik merupakan kemampuan suatu sampel dalam melisiskan darah bekuan (Rohmah *et al.*, 2019). Metode *clot lysis* mempunyai keuntungan yaitu prosesnya tidak memerlukan waktu lama, pengerjaan mudah, dan tidak membutuhkan banyak biaya.

Darah kelinci sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam 10 tabung *Eppendorf* steril, yang ditimbang sebelum diolah pada suhu 370°C selama 45 menit untuk menyebabkan koagulasi, sebagai bagian dari uji lisis bekuan *in vitro*. Segera setelah gumpalan terbentuk, bagian cairan dari tabung dibuang. Dengan mengukur setiap bekuan darah dalam tabung *Eppendorf*, berat bekuan ditentukan (berat bekuan darah = berat tabung *Eppendorf* yang berisi bekuan darah dikurangi berat tabung *Eppendorf* kosong). Sampel enzim kasar dimasukkan ke dalam 3 tabung *eppendorf* dengan volume maksimum 100 mililiter. Enzim kasar yang dihasilkan dimasukkan ke dalam *eppendorf* dalam jumlah hingga 100 µl. Untuk dua tabung *eppendorf* yang tersisa, isi dengan kontrol positif dan negatif untuk nattokinase.

Eppendorf yang mengandung leburan gumpalan darah kembali dilakukan penimbangan untuk menentukan perbedaan berat setelah bekuan darah mengalami lisis. Perbedaan yang diperoleh dengan menimbang sebelum dan sesudah leburnya bekuan dinyatakan sebagai persentase lisis bekuan, persentase lisis dapat dihitung dengan rumus: Lisis gumpalan darah (%) = (berat bekuan darah lisis / berat bekuan darah sebelum lisis) x 100 (Drjayaraj, 2014)

4.2. Uji lempeng fibrin (Plat fibrin), aktivitas fibrinolitik dapat diukur dalam menentukan kemampuan enzim fibrinolitik degradasi fibrin. Uji aktivitas enzim fibrinolitik menggunakan metode plat fibrin bertujuan untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik pada isolat bakteri yang positif menghasilkan enzim proteolitik.

Uji lempeng cakram fibrin banyak digunakan dalam penelitian tentang agen fibrinolitik. Dalam cawan petri ditambahkan 1,7% agar dan 3% fibrin yang diperoleh dari mekanisme pemurnian serum darah kelinci dan dilarutkan dalam larutan dapar borat pH 7,8. Kemudian setelah dilakukan penambahan agar, dilakukan pemanasan terhadap

campuran larutan media tersebut. Setelah selesai dilakukan pemanasan, diambil campuran larutan media sebanyak 12 ml dan dituang ke dalam tabung reaksi lalu ditutup dengan kapas untuk dilakukan sterilisasi dengan suhu 121°C dalam kurun waktu 30 menit. Media yang telah disterilisasi dituang pada cawan petri lalu ditambahkan sebanyak 400 ml metilen blue dengan tujuan agar zona jernih fibrinolitik nantinya dapat tampak secara jelas. Saat media sudah memadat maka lubang menggunakan *boor prop*, pelubangan media ini dilakukan untuk aplikasi sampel dan juga kontrol positif maupun kontrol negatif. Sampel yang telah diaplikasikan pada media akan diinkubasi dengan suhu 37°C dalam pH 7 selama kurun waktu 24 jam.

Potensi fibrinolitik ekstrak kasar enzim limbah cair industri kecap dapat diketahui dengan adanya zona jernih di daerah sekitar lubang. Zona jernih yang menandai bahwa sampel yang diuji mampu untuk mendegradasi fibrin dalam bekuan darah. Aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim limbah cair industri kecap dapat ditentukan dengan cara mengukur indeks aktivitas enzim (IAE) fibrinolitik, rumus yang digunakan ketika menghitung IAE adalah diameter zona jernih dibagi dengan diameter koloni (Aishpala *et al.*, 2007). Indikasi degradasi fibrin dapat dilihat dari zona transparan yang jelas dan diameternya sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik (Rovati *et al.*, 2009).

H. Landasan Teori

Serangan jantung, juga dikenal sebagai infark miokard akut, adalah penyakit medis yang disebabkan oleh bekuan darah (trombus) yang menyumbat satu atau lebih arteri koroner. Tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi berhubungan dengan kondisi jantung koroner yang dikenal sebagai IMA (Rampengan, 2015).

Menurut World Health Organization (WHO), sekitar 17,9 juta orang meninggal dunia pada tahun 2019 akibat penyakit kardiovaskular seperti jantung koroner, serangan jantung, angina pectoris, jantung rematik, dan stroke. Mayoritas kematian ini terjadi di negara-negara dengan tingkat pendapatan rendah dan menengah. Di Indonesia, belum ada data yang spesifik mengenai insiden serangan jantung (IMA). Namun, laporan riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2018 menyebutkan bahwa prevalensi penyakit jantung secara umum di Indonesia mencapai 1,5%, termasuk IMA. Enzim fibrinolitik melisis gumpalan fibrin darah dan mencegah penggumpalan trombosit (Ji *et al.*, 2008).

Fibrinolisis bekerja dengan mengaktifkan plasminogen menjadi enzim proteolitik plasmin. Plasmin akan mengubah bentuk trombus dan membatasi perkembangan trombosis dengan mencerna proteolitik fibrin (Kumada *et al.*, 1994).

Dengan menghidrolisis fibrin, enzim fibrinolitik menghancurkan gumpalan darah menjadi komponen yang dapat dikeluarkan dari sirkulasi. Ini memulai proses perbaikan dinding pembuluh darah dan membersihkan pembuluh darah dari gumpalan darah (Escobar *et al.*, 2002).

Enzim ini kemungkinan besar digunakan sebagai pengobatan trombolitik karena memiliki aksi yang mirip dengan plasmin dan memiliki kemampuan untuk memecah fibrin dan menghambat perkembangan bekuan fibrin. Berbagai sumber alami termasuk enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik memiliki karakteristik serta ciri khas antara lain fibrinolisis, fibrinogenolisis efek proteolitik, mengubah keseimbangan antara koagulasi dan antikoagulasi serta menghasilkan berbagai macam aplikasi terapeutik (Chung-Lu *et al.*, 2012).

Produk pangan yang telah berhasil diisolasi bakteri penghasil enzim fibrinolitiknya yaitu *chungkook-jang*, pangan fermentasi tradisional korea, dengan bahan pokok kacang kedelai (Kim *et al.*, 1996), tempe (Kim *et al.*, 2006), pangan fermentasi kedelai dari Thailand (Chantawannakul *et al.*, 2001), dan *Natto*, pangan tradisional jepang (Sumi *et al.*, 1987).

Menurut penelitian Nadea *et al.* (2022) kadar protein dari ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam yang ditentukan menggunakan metode Lowry berturut-turut adalah 140,15 µg/mL untuk ekstrak kasar enzim sebelum dilakukan pemurnian dan 245,76 µg/mL untuk ekstrak kasar enzim yang sudah dimurnikan menggunakan ammonium sulfat. Pengaruh penambahan ammonium sulfat 80% menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzim semakin meningkat, sehingga kadar protein ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam yang dihasilkan semakin tinggi. Konsentrasi optimum ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam (*Glycine soja* (L) Merr) yang memiliki aktivitas sebagai obat fibrinolitik secara in vitro adalah konsentrasi 100% dengan persentase lisis sebesar 59%.

Menurut Madaniyah (2013) Hasil skrining terhadap 12 isolat bakteri asal tanah aliran pembuangan limbah tahu diperoleh 1 isolat

bakteri hanya memiliki aktivitas proteolitik saja dan 9 isolat memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik.

Menurut Bimantara *et al* (2022) bakteri *B. cereus* dari air hutan Mangrove Maroon Edupark Semarang menghasilkan ekstrak kasar enzim fibrinolitik dengan kadar sebesar 19,63 mg/mL. Ekstrak kasar enzim memiliki aktivitas fibrinolitik yang ditunjukkan dengan zona bening pada media plat fibrin. Aktivitas fibrinolitik pada konsentrasi 20, 40, 80% berturut-turut sebesar 2,54; 6,11; dan 7,94 mm.

Peneletian mengenai potensi fibrinolitik menggunakan isolat bakteri dari limbah cair industri kecap untuk mengetahui potensi sebagai agen fibrinolitik secara *in vitro*. Penentuan potensi fibrinolitik bakteri limbah cair industri kecap menggunakan metode *clot lysis* yang akan dilakukan dengan cara mengukur persentase (%) lisis bekuan darah.

I. Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah penelitian dapat disusun hipotesis sebagai berikut:

Pertama, pada limbah cair industri kecap diduga terdapat bakteri penghasil enzim protease yaitu menyerupai genus *Pseudomonas sp*, genus *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp*.

Kedua, ekstrak kasar enzim yang berasal dari bakteri limbah cair industri kecap memiliki aktivitas fibrinolitik.

Ketiga, isolat bakteri dari limbah cair industri kecap yang memiliki aktivitas fibrinolitik tertinggi adalah isolat dengan konsentrasi tertinggi.