

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tempe

Tempe adalah makanan tradisional yang dibuat melalui fermentasi kedelai dengan tambahan beberapa bahan lain. Proses fermentasi ini melibatkan berbagai jenis jamur dari genus *Rhizopus*, seperti *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, dan spesies kapang *Rhizopus* lainnya. Melalui fermentasi, senyawa kompleks dalam kedelai dipecah menjadi bentuk yang lebih sederhana sehingga lebih mudah diserap oleh tubuh. Tempe juga dikenal sebagai sumber pangan yang kaya akan serat, kalsium, vitamin B, dan zat besi (Reddy, 2019).

Menurut SNI 3144:2009, tempe diartikan sebagai suatu produk pangan yang padat, berbentuk khas, berwarna putih atau agak abu-abu, dibuat dengan cara memfermentasi biji kapang tertentu. Tempe diproduksi dengan cara fermentasi atau fermentasi menggunakan kapang dari sortir *Rhizopus*. Proses fermentasi menyebabkan unsur hara kompleks pada kedelai dipecah oleh kapang melalui proses enzimatik sehingga menghasilkan senyawa yang lebih halus (Reddy, 2019). Menurut Suprpti, (2005) terdapat beberapa jenis tempe di Indonesia dengan bahan baku yang berbeda-beda, dan Tabel 1 menunjukkan perbedaan pengelompokan tempe dilakukan berdasarkan komposisi bahan dasar yang digunakan

Tabel 1. Jenis Tempe di Indonesia

No.	Jenis Tempe	Bahan Baku
1.	Tempe Kedelai	Kedelai
2.	Tempe Gembus	Ampas Tahu
3.	Tempe Menjes	Ampas Tahu dan Kelapa
4.	Tempe Bungkil	Bungkil Kacang Tanah
5.	Tempe Bongkreng	Ampas Kelapa
6.	Tempe Benguk	Koro Benguk
7.	Tempe Lamtoro	Lamtoro

B. Tempe Gembus

1. Pengertian

Tempe gembus merupakan makanan fermentasi yang berasal dari Indonesia. Tempe gembus dibuat dari sisa bahan pembuatan tahu melalui fermentasi dengan mikroorganisme yang sama dengan yang digunakan untuk membuat tempe kedelai yaitu *Rhizopus sp.* Komposisi gizi tempe gembus hampir sama dengan tempe kedelai, namun kandungannya lebih

rendah. Berdasarkan penelitian dari Inayatul *et al.*, (2018) menemukan bahwa tempe gembus dapat mendegradasi fibrin. Penelitian ini menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan selama fermentasi tempe gembus mungkin berperan dalam proses fibrinolitik. Tempe gembus terbuat dari ampas tahu dan memiliki tekstur lembut serta warna putih. Tempe gembus merupakan produk pangan fermentasi yang digunakan dalam produksi tempe kedelai, atau *Rhizopus sp.* Komposisi gizi tempe gembus mirip dengan tempe kedelai, namun kandungannya lebih rendah dan mengandung serat sehingga dapat mempengaruhi kadar lipid darah.



Gambar 1. Tempe Gembus (Valentina, 2016)

2. Kandungan Tempe Gembus

Tempe gembus adalah jenis pangan yang memiliki nilai gizi tinggi karena mengandung beragam zat penting seperti protein, karbohidrat, asam lemak esensial, vitamin, dan mineral. Kandungan gizinya mencakup sekitar 5% protein, 2% lemak, 11% karbohidrat berbentuk serat, dan 1% abu, dengan kadar air sekitar 81%. (Kwon, 1988). Informasi lengkap mengenai kandungan gizi tempe gembus disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Gizi Tempe

Zat Gizi	Kandungan	Satuan
Air	80,7	g
Energi	76	kcal
Protein	6,8	g
Lemak	0,7	g
Karbohidrat	10,6	g
Serat	5,3	g
Abu (ASH)	1,2	g
Kalsium (Ca)	76	mg
Fosfor (P)	142	mg
Besi (Fe)	16,5	mg
Thiamin (Vitamin B1)	0,79	mg
Riboflavin (Vitamin B12)	0,01	mg
Niasin (Niacin)	0,1	mg

Sumber: Tabel Komposisi Pangan Indonesia (Kementerian Kesehatan, 2017)

3. Manfaat Tempe Gembus

Manfaat tempe gembus bagi kesehatan adalah dapat digunakan sebagai sumber nabati dan sumber probiotik. Kandungan antioksidan dan isoflavon pada tempe gembus dapat digunakan untuk menjaga kesehatan jantung, kesehatan tulang, dan mencegah diabetes. Tempe gembus yang memiliki kandungan protein dan serat tinggi namun rendah lemak, berpotensi dimanfaatkan sebagai pilihan pangan untuk membantu menurunkan berat badan (Fajri *et al.*, 2024)

C. Fermentasi

Fermentasi adalah proses perubahan substrat organik secara kimiawi yang terjadi melalui aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Dalam proses ini, diperlukan pertumbuhan mikroorganisme starter di dalam substrat sebagai tahap awal fermentasi. Starter merupakan populasi besar mikroorganisme yang siap menginokulasi media fermentasi dalam kondisi fisiologis (Hidayanto, 2017).

1. Proses Fermentasi

Proses fermentasi pada pembuatan beberapa jenis tempe menggunakan mikroorganisme seperti *R. oligosporus* dan *R. oryzae* yang merupakan anggota umum dari spesies *Rhizopus*. Selama proses fermentasi, *Rhizopus* menghasilkan enzim fitase yang bertanggung jawab untuk pemecahan fitat. Enzim fitase berperan dalam mengubah komponen makro pada kedelai menjadi bentuk yang lebih sederhana (komponen mikro), sehingga tempe menjadi lebih mudah dicerna dan kandungan nutrisinya lebih mudah diserap oleh tubuh. Fermentasi mengubah rasa dan aroma menjadi tempe dan meningkatkan nilai gizi (Sine dan Soetarto, 2018).

Warna putih khas pada tempe berasal dari pertumbuhan miselium jamur yang berkembang selama proses fermentasi. Dalam tahap ini, terjadi reaksi biokimia yang memecah senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dan mudah larut dalam air, sehingga meningkatkan pencernaan tempe oleh sistem pencernaan manusia (Mukhoyaroh, 2015). Selain itu, proses fermentasi juga berperan dalam memperkaya nilai gizi tempe, seperti meningkatkan ketersediaan protein dan memperbaiki profil asam amino, menjadikan tempe.

2. Jenis Mikroorganisme

Saat memfermentasi jenis mikroorganisme yang digunakan mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap hasil akhir proses fermentasi. Mikroorganisme yang umum digunakan meliputi:

2.1 Bakteri asam laktat (BAL). Mikroorganisme seperti bakteri asam laktat (BAL) termasuk dalam kelompok mikroorganisme yang melakukan fermentasi karbohidrat pada bahan pangan dan umumnya menghasilkan asam laktat dalam jumlah besar. Untuk dapat berkembang, BAL memerlukan ketersediaan asam amino serta vitamin B. Beberapa jenis BAL mampu bertahan hidup pada suhu rendah, yaitu antara 4°C hingga 5°C. Umumnya, BAL tumbuh optimal dalam kondisi lingkungan yang memiliki pH antara 4,0 hingga 4,5. Penurunan pH bahan pangan hingga di bawah pH 4 dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, termasuk mikroorganisme patogen, sehingga memperpanjang masa simpan produk pangan. (Yuliana, 2008).

2.2 Ragi. Ragi merupakan sekumpulan mikroorganisme berukuran mikroskopis. Pada ragi tempe, sebagian besar mikroorganisme yang berperan merupakan jamur dari genus *Rhizopus*. Jamur ini tumbuh dalam bentuk struktur seperti benang halus yang dikenal sebagai miselium. (Reddy, 2019). Fungsi ragi tempe dalam proses fermentasi adalah menggunakan enzim untuk menghidrolisis senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana.

2.3 Bakteri proteolitik. Bakteri proteolitik adalah jenis bakteri yang mampu menguraikan protein melalui produksi enzim protease yang disekresikan ke luar sel. Secara umum, bakteri ini termasuk dalam genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptobacillus*, dan *Staphylococcus*. Enzim protease sendiri merupakan enzim proteolitik yang berfungsi mengkatalisis pemutusan ikatan peptida dalam molekul protein, sehingga menghasilkan fragmen peptida atau asam amino yang lebih sederhana dan mudah diserap (Puspitasari *et al.*, 2012).

D. Enzim

1. Definisi

Enzim adalah biokatalis yang bertindak sebagai katalis dalam fungsi biologis. Secara umum, enzim memberikan kecepatan, spesifisitas, dan kontrol regulasi terhadap reaksi di dalam tubuh (Sana *et al.*, 2004). Enzim bertindak sebagai katalis, senyawa yang mempercepat

reaksi kimia. Enzim dapat membuat reaksi lebih cepat dibandingkan tanpa katalis (Marks *et al.*, 2000).

2. Enzim Tempe Gembus

Tempe gembus yang dihasilkan melalui proses fermentasi dengan bantuan *Rhizopus* sp. mampu memproduksi enzim-enzim ekstraseluler bersifat hidrolitik, seperti protease, amilase, dan lipase memiliki peran penting dalam proses biokimia. Protease berfungsi menguraikan protein menjadi bentuk yang lebih sederhana seperti peptida dan asam amino melalui proses hidrolisis. Selain berperan utama dalam pemecahan polipeptida kompleks, protease juga memiliki beragam fungsi fisiologis, termasuk dalam proses pencernaan, aktivasi hormon, perakitan virus, respons kekebalan tubuh, peradangan, pembuahan, pembekuan darah, pemecahan fibrin, pengaturan tekanan darah, serta berperan dalam proses pembentukan spora, perkecambahan, dan patogenesis (Rahmi *et al.*, 2020).

Amilase merupakan salah satu jenis enzim yang dapat diperoleh dari berbagai sumber, termasuk mikroorganisme, tumbuhan, maupun hewan. Enzim ini berperan dalam mengkatalisis pemecahan senyawa pati dan polisakarida kompleks menjadi monosakarida, yaitu bentuk gula sederhana yang dapat dengan mudah diserap oleh tubuh. Pada tempe gembus, enzim amilase diproduksi oleh jamur *Rhizopus oligosporus* dan berperan dalam proses degradasi karbohidrat kedelai menjadi gula sederhana. Sementara itu, enzim lipase berperan dalam proses hidrolisis lemak dan minyak. Secara fisiologis, lipase memiliki fungsi penting dalam memecah lemak kedelai menjadi asam lemak dan gliserol. (Tazkiah *et al.*, 2017).

3. Isolasi Enzim Dan Pemurnian Enzim

Enzim dapat diisolasi dalam dua bentuk, yaitu secara ekstraseluler dan intraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dilepaskan ke luar sel dan berfungsi di lingkungan eksternal sel penghasilnya. Salah satu contoh enzim ekstraseluler adalah enzim yang berasal dari tumbuhan, yang berperan dalam berbagai proses biokimia di luar struktur seluler tempat diproduksi. Enzim intraseluler adalah enzim yang bekerja di dalam sel, seperti enzim yang diperoleh dari mikroorganisme. Ekstraksi enzim ekstraseluler lebih cocok untuk ekstraksi enzim intraseluler karena proses ekstraksi enzim tidak memerlukan degradasi sel dan enzim yang dilepaskan dari sel dapat dengan mudah dipisahkan dari kontaminan lain dan kecil

kemungkinannya untuk bercampur dengan zat lain Metode ekstraksi enzim biasanya ditentukan berdasarkan bahan bakunya (B. B. Li *et al.*, 2006).

Enzim yang diperoleh dari penghancuran bahan menjadi bagian-bagian yang lebih kecil beserta bagian yang akan diekstraksi, dapat dengan mudah dibuat hanya dengan melarutkan bubuk dalam pelarut yang sesuai atau menyaringnya melalui kertas saring. Teknik lain yang dapat digunakan untuk mengekstraksi enzim dari bagian tanaman adalah dengan menghomogenkannya dalam media cair menggunakan blender. Media cair yang umum digunakan adalah buffer yang dimaksudkan untuk menjaga pH larutan enzim. Salah satu jenis buffer yang umum digunakan adalah buffer fosfat.

Pemurnian enzim adalah proses pemisahan enzim dari campuran kompleks yang dihasilkan selama ekstraksi sel, sehingga diperoleh bentuk enzim yang lebih murni dan aktif. Proses pemurnian penting untuk penelitian biokimia, analisis aktivitas enzim, dan aplikasi industri. Pemurnian enzim melibatkan berbagai teknik yang umum digunakan, seperti pengaturan pH dan suhu secara cepat, penggunaan pelarut organik untuk pemisahan fase, penambahan resin penukar ion, serta penerapan metode salting-out. Pemilihan metode pemurnian disesuaikan dengan sifat-sifat enzim yang akan dimurnikan, mengingat enzim merupakan protein yang memiliki perbedaan dalam kelarutan, muatan, dan ukuran molekulnya. Proses pemurnian ini bertujuan untuk memperoleh enzim dengan aktivitas spesifik yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak mentahnya (Closs, 1983).

Pemurnian ekstrak bertujuan untuk meningkatkan kemurnian dan aktivitas biologis protein, serta memisahkan protein target dari pengotor yang tidak diinginkan seperti pigmen, tannin, karbohidrat, lilin, dan resin agar meningkatkan khasiat ekstrak. Ekstrak murni adalah ekstrak kasar yang telah dimurnikan dari senyawa inert melalui proses penghilangan lemak, penyaringan menggunakan resin atau adsorben.

3.1 Pemurnian menggunakan amonium sulfat. Pemurnian dengan menggunakan amonium sulfat biasanya dilakukan dengan menambahkan larutan garam amonium sulfat berkonsentrasi tinggi. Penambahan ini meningkatkan kekuatan ionik yang mendorong terjadinya interaksi antara ion garam, molekul air, dan enzim (Iswendi, 2010). Metode ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain

menyebabkan denaturasi enzim yang minimal, meningkatkan stabilitas enzim, serta relatif ekonomis dalam hal biaya (Golunski *et al.*, 2017).

Garam memiliki tingkat ionisasi yang lebih tinggi dibandingkan protein serta afinitas yang lebih besar terhadap protein, sehingga terjadi kompetisi antara garam dan protein dalam mempertahankan kestabilan berat molekul. Karena polaritas protein tidak mampu menandingi kekuatan polar garam, interaksi antara molekul cenderung lebih dominan terhadap garam. Akibatnya, protein tidak lagi terlindungi dengan baik dan residu asam amino yang bersifat hidrofobik menjadi terekspos di permukaan. Garam biasanya ditambahkan pada suhu rendah selama proses ini untuk menghindari denaturasi protein. Amonium sulfat kerap dimanfaatkan dalam tahap pemurnian karena larutannya yang tinggi, tingkat kemurnian yang memadai, serta kemampuannya menjaga kestabilan pH larutan protein. Ammonium sulfat memiliki konsentrasi molar yang tinggi dan kepadatan yang rendah yaitu $1,235 \text{ g.cm}^{-3}$, yang memungkinkannya mengendapkan semua protein, sehingga garam amonium sulfat tidak mengendap selama sentrifugasi protein, dan proses pelarutan menghasilkan pelarut bersuhu rendah yang tidak mengubah sifat protein. Kandungan protein tertinggi pada amonium sulfat diperoleh pada penambahan amonium sulfat pada konsentrasi 60% (Kumaunang, 2011).

3.2 Sentrifugasi. Sentrifugasi memisahkan semua jenis partikel berdasarkan sifat sedimentasinya. Sifat sedimentasi partikel dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain ukuran, kepadatan, dan bentuk partikel. Kepadatan serta bentuk partikel dapat sangat bervariasi tergantung pada komposisi larutan tempat partikel tersebut tersuspensi. Pemisahan partikel umumnya dilakukan berdasarkan kepadatan (metode pemisahan isopiknik) atau ukuran (melalui peletisasi diferensial dan pemisahan zona kecepatan). Dalam metode terakhir, meskipun kepadatan tetap memengaruhi proses sedimentasi, pengaruhnya sering kali lebih kecil dibandingkan dengan faktor ukuran. Pada pelaksanaan sentrifugasi, penting untuk membedakan antara kecepatan sentrifugal dan gaya sentrifugal relatif, karena keduanya kerap menimbulkan kebingungan. Sentrifugasi menghasilkan cairan bening di bagian atas (supernatan) dan endapan padat yang terkonsentrasi di dasar tabung, sehingga memungkinkan pemisahan keduanya secara manual. Umumnya, delapan sel mikroba diendapkan dengan menggunakan kecepatan 5000 rpm selama durasi 15 menit (Rickwood, 2001).

E. Analisa Kadar Protein

Protein total mencakup seluruh jenis protein yang ada di dalam serum maupun plasma. Analisis kadar protein merupakan metode pengukuran jumlah protein dalam suatu sampel dan penting dalam berbagai studi biokimia, bioteknologi, serta aplikasi industri seperti pemantauan kualitas produk dan analisis aktivitas enzim. Metode yang umum digunakan untuk mengukur kadar protein, memiliki kelebihan dan kekurangan tergantung pada jenis sampel dan sensitivitas yang diperlukan.

1. Metode Biuret

Metode Biuret merupakan teknik yang lebih sederhana dan digunakan untuk menganalisis kandungan protein sampel dengan konsentrasi protein lebih tinggi. Pada metode ini, protein bereaksi dengan ion tembaga (Cu^{2+}) dalam larutan basa menghasilkan warna ungu yang terbentuk dapat dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Metode ini tidak sesensitif metode Lowry atau Bradford, namun metode Biuret dapat digunakan sebagai metode yang efisien dan hemat biaya untuk analisis protein rutin (Koeswara *et al.*, 2024).

2. Metode Bradford

Metode Bradford merupakan salah satu teknik yang paling sering dipakai untuk mengukur konsentrasi protein, dengan prinsip pewarnaan menggunakan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB). Terdapat dua jenis pengujian dalam metode ini, yaitu microassay yang digunakan untuk mendeteksi protein dalam rentang 1–10 μg , dan assay untuk konsentrasi antara 10–100 μg . Pewarna yang digunakan adalah CBB G-250. Dalam kondisi asam sebelum bereaksi dengan protein, reagen ini berwarna merah karena adanya asam ortofosfat. Setelah dicampurkan dengan larutan protein, warna berubah menjadi biru sebagai hasil ikatan antara pewarna dan asam amino protein. Tingkat kecerahan warna biru ini dapat diukur pada panjang gelombang 595 nm untuk menentukan jumlah protein secara kuantitatif. (Hadinoto dan Syukroni, 2019)

3. Metode Lowry

Metode *Lowry* merupakan metode yang lebih sensitif dibandingkan metode Bradford dan sering digunakan untuk sampel dengan konsentrasi protein rendah. Prinsip dasar metode ini adalah mereaksikan protein dengan campuran asam folat asam fosfomolibdat dan pereaksi Cu^{2+} , sehingga menghasilkan perubahan warna yang bisa

dianalisis menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Keunggulan metode ini adalah lebih sensitif terhadap protein dengan komposisi asam amino berbeda, namun lebih sensitif terhadap zat lain dalam sampel (Sari, 2020).

Penambahan reagen Folin-Ciocalteu mengikat protein, mereduksi reagen Folin secara perlahan dan mengubah warna kuning menjadi biru. Metode ini umumnya dianggap lebih sederhana dan relatif lebih ekonomis. Namun, metode Lowry memiliki kelemahan berupa sensitivitas yang tinggi terhadap senyawa pengganggu yang lebih banyak dibandingkan dengan metode Biuret dan Bradford, serta sensitif terhadap fluktuasi pH dan kurang tepat dalam mengukur protein pada konsentrasi rendah. Untuk mengatasi masalah ini, penggunaan sampel dalam jumlah yang sangat kecil dianjurkan agar tidak memengaruhi jalannya reaksi. (Lowry *et al.*, 1951).

F. Fibrinolitik

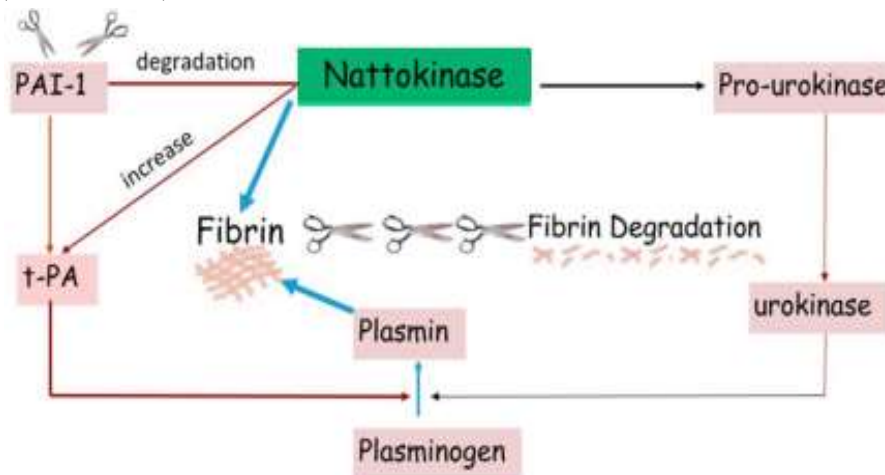
Fibrinolitik, juga dikenal sebagai trombolitik, merupakan jenis obat yang berfungsi untuk melarutkan trombus atau bekuan darah dengan cara mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin, enzim yang bertugas memecah fibrin sebagai komponen utama dalam proses pembekuan darah. Terapi fibrinolitik telah terbukti memberikan berbagai manfaat dalam penatalaksanaan pasien yang mengalami *ST-Elevation Myocardial Infarction* (STEMI). Namun demikian, efektivitas terapi ini pada pasien STEMI masih menjadi perdebatan dan belum dapat disimpulkan secara pasti. Fibrinolisis adalah proses enzimatik yang diatur secara ketat yang mencegah akumulasi fibrin intravaskular yang tidak diperlukan dan memungkinkan pembuangan bekuan darah. Permukaan fibrin merupakan tempat aktivasi penting untuk fibrinolisis dan mengatur pengikatan plasminogen dan plasmin (Cesarman-Maus dan Hajjar, 2005).

1. Jenis Fibrinolitik

1.1 Enzim fibrinolitik. Enzim fibrinolitik memiliki aktivitas fibrinolitik, lipolitik, dan proteolitik yang memengaruhi keseimbangan antara proses pembekuan darah (koagulasi) dan pencegahannya (antikoagulasi), sehingga memungkinkan penggunaannya dalam berbagai terapi medis (Lu dan Che, 2012).

1.1.1 Nattokinase. Aktivitas protease pertama kali dilaporkan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sawamura pada tahun 1906

dan Oshima pada tahun 1925 menunjukkan bahwa nattokinase memiliki kemampuan fibrinolitik. Nattokinase sendiri merupakan enzim fibrinolitik yang berasal dari makanan hasil fermentasi, yaitu natto (Gadis, 2015).



Gambar 2. Mekanisme Nattokinase (Sumi et al., 2004)

Nattokinase memiliki aktivitas fibrinolitik *in vivo* yang lebih kuat daripada plasmin, dan bahkan dapat menghidrolisis fibrin secara langsung. Secara oral, nattokinase tidak hanya meningkatkan pelepasan aktivator plasmin jaringan dari sel endotel vaskular, tetapi juga menghambat kadar inhibitor aktivator plasminogen. Baru-baru ini, para peneliti juga memberikan wawasan baru bahwa nattokinase dapat mencegah arteriosklerosis dan trombosis dengan memberikan efek antiinflamasi, anti stres dan antioksidan (X. Li et al., 2023).

Penelitian telah menunjukkan bahwa nattokinase mudah diserap ke dalam saluran usus bila diberikan secara oral. Hal ini karena nattokinase memiliki aktivitas fibrinolitik yang kuat setelah diserap ke dalam duodenum. Sifat ini menjadikan nattokinase enzim fibrinolitik serbaguna dan kuat yang dapat digunakan untuk memecah bekuan darah. Berdasarkan tinjauan Kotb, (2012) nattokinase seperti plasmin, dapat mendegradasi fibrin secara langsung, namun juga dapat menginisiasi kerja agen trombolitik seperti urokinase. Oleh karena itu, enzim fibrinolitik yang terdapat pada tempe kedelai dapat bersaing dengan nattokinase sebagai agen trombolitik alternatif (Gadis, 2015).

1.1.2 Enzim fibrinolitik dari tempe gembus. Enzim fibrinolitik pada makanan fermentasi diproduksi oleh mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi, seperti protease yang terdapat pada tempe. Protease adalah enzim yang berperan dalam memecah protein

menjadi molekul yang lebih kecil, seperti peptida dan asam amino, melalui reaksi hidrolisis. Selain berperan dalam degradasi polipeptida kompleks, protease juga memiliki beragam fungsi fisiologis penting, antara lain dalam proses pencernaan, aktivasi hormon, perakitan partikel virus, respons imun, inflamasi, proses fertilisasi, pembekuan darah, fibrinolisis, regulasi tekanan darah, serta terlibat dalam mekanisme sporulasi, germinasi, dan pathogenesis (Rahmi *et al.*, 2020).

1.2 Streptokinase. Streptokinase merupakan agen fibrinolitik yang telah memperoleh persetujuan dari FDA dan terbukti efektif dalam penanganan berbagai kondisi medis yang berhubungan dengan kelainan pada sistem peredaran darah. Obat ini juga termasuk dalam daftar obat esensial. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), streptokinase berperan dalam meningkatkan peluang hidup pasien dengan melarutkan bekuan darah dan memulihkan aliran darah ke jaringan jantung yang mengalami kerusakan. Namun g, antara lain rasa mual, muntah, penurunan maupun peningkatan tekanan darah, peradangan pada pembuluh darah (flebitis), rasa nyeri di area yang ditekan, perdarahan, denyut jantung yang melambat (bradikardia), denyut jantung yang meningkat (takikardia), gangguan pada irama jantung (aritmia), serta munculnya demam (Taheri *et al.*, 2015).

1.3 Alteplase (rt-PA). Alteplase adalah enzim alami (plasminogen spesifik) yang dihasilkan dari kultur jaringan manusia melalui teknologi DNA rekombinan. Alteplase adalah “trombus selektif.” Alteplase bekerja dengan cara berikatan langsung pada fibrin yang terdapat di permukaan bekuan darah, kemudian mengaktivasi plasminogen yang juga terikat pada fibrin tersebut. Aktivasi ini menghasilkan plasmin, yaitu enzim yang terbentuk dari plasminogen terikat fibrin, yang selanjutnya berperan dalam degradasi fibrin dan pelarutan bekuan darah (Lal, 2017).

1.4 Tenecteplase. Tenecteplase (TNK) adalah versi alteplase yang dimodifikasi secara genetik dengan tiga zat asam amino. Hal ini mengurangi waktu eliminasi, meningkatkan waktu paruh, dan meningkatkan spesifisitas fibrin dan resistensi terhadap PAI-1. Tenecteplase menunjukkan kemungkinan perdarahan yang lebih kecil serta lebih sedikit memerlukan transfusi darah dibandingkan dengan alteplase. Selain itu, kemudahan dalam pemberiannya melalui satu kali suntikan (bolus) menjadikan tenecteplase sebagai alternatif yang

menjanjikan untuk terapi STEMI di ruang instalasi gawat darurat (Lal, 2017).

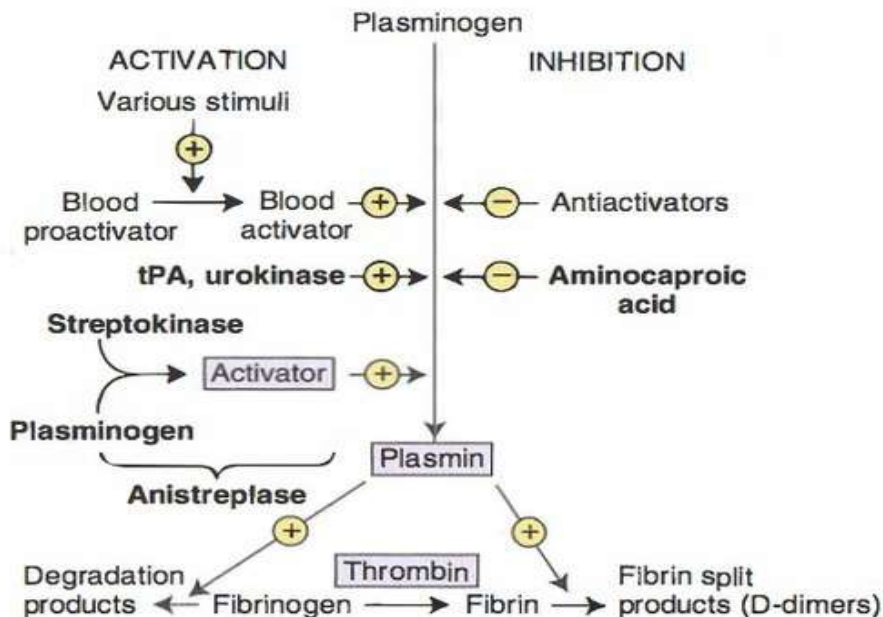
1.5 Reteplase. Reteplase (rPA) merupakan varian modifikasi dari alteplase yang telah direkayasa dengan menghilangkan beberapa domain, termasuk kringle 1, domain jari, domain faktor pertumbuhan, serta sebagian rantai samping karbohidrat. Modifikasi ini memungkinkan reteplase memiliki waktu paruh yang lebih panjang. Oleh karena itu, pemberiannya dilakukan dalam dua kali injeksi bolus intravena masing-masing sebesar 10 U, dengan interval waktu minimal 10 hingga 30 menit antara tiap pemberian (Fox *et al.*, 2008). Dibandingkan dengan alteplase, reteplase memiliki keunggulan berupa durasi kerja yang lebih lama dan kemudahan pemberian karena tidak memerlukan infus kontinu. Meskipun demikian, spesifisitasnya terhadap plasminogen yang terikat fibrin tetap sebanding dengan alteplase (Lal, 2017).

2. Mekanisme Kerja Fibrinolitik

Obat-obatan fibrinolitik memiliki mekanisme kerja yang berbeda dalam mengaktivasi sistem fibrinolitik. Streptokinase bekerja dengan cara membentuk kompleks dengan plasminogen, yang kemudian diubah menjadi plasmin. Sementara itu, obat-obatan seperti alteplase, urokinase, reteplase, dan tenekteplase bekerja dengan cara mengubah plasminogen secara langsung menjadi plasmin, enzim yang bertugas menghancurkan gumpalan darah yang mengandung banyak fibrin menjadi fragmen-fragmen hasil penguraian fibrin. Berbeda dari mekanisme tersebut, altimeplase bekerja secara langsung terhadap fibrin, memecahnya dan menghasilkan produk degradasi fibrin tanpa melalui aktivasi plasminogen terlebih dahulu. (Baskin *et al.*, 2012).

Pengukuran aktivitas fibrinolitik dilakukan untuk menilai kemampuan enzim protease dalam mendegradasi fibrin. Aktivitas ini menunjukkan kemiripan dengan kerja enzim tripsin, terutama dalam pemotongan rantai β -fibrinogen, sementara pemotongan terhadap rantai γ -fibrinogen terjadi dengan kecepatan yang lebih rendah. Tujuan utama dari terapi trombolitik adalah mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin yang berperan dalam pemecahan fibrinogen dan fibrin. Beberapa agen seperti tissue plasminogen activator (t-PA), urokinase (UK), dan streptokinase diketahui mampu mengaktivasi sistem fibrinolitik. Sebaliknya, asam aminokaproat merupakan inhibitor fibrinolisis plasmin yang saat ini telah tersedia untuk penggunaan klinis.

Proses hidrolisis fibrin menjadi bentuk terlarut dalam sistem fibrinolitik dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme kerja agen fibrinolitik dalam sistem fibrinolisis

(Katzung, 2018)

3. Uji Potensi Fibrinolitik

3.1 Uji *clot lysis*. Metode *clot lysis* digunakan untuk mengukur kemampuan fibrinolitik dengan mengamati tingkat lisis bekuan darah setelah perlakuan. Berdasarkan penelitian Nadea *et al.*, (2023) tujuan pengujian menggunakan metode ini adalah untuk mengkonfirmasi keberadaan aktivitas fibrinolitik dalam sampel. Keunggulan metode *clot lysis* meliputi waktu pengerjaan yang singkat, kebutuhan sampel yang relatif sedikit, serta biaya yang terjangkau.

Setiap sampel enzim sebanyak 100 μL larutan dengan konsentrasi 20%, 40%, dan 80% dimasukkan ke dalam tiga tabung Eppendorf yang berbeda. Sebagai kontrol, dua tabung Eppendorf lainnya diisi dengan air suling, yang berfungsi sebagai kontrol positif dan negatif untuk nattokinase. Untuk menyiapkan suspensi nattokinase, sebanyak 100 mg bubuk dari kapsul nattokinase dilarutkan dalam labu takar 10 mL menggunakan air suling hingga mencapai volume yang ditentukan. Selanjutnya, seluruh tabung Eppendorf diinkubasi pada suhu 37 °C selama 90 menit guna mengamati proses pelarutan bekuan darah. (Michail *et al.*, 2006). Percobaan diulang sebanyak tiga kali. Tabung Eppendorf yang berisi gumpalan darah ditimbang, lalu selisih berat

sebelum dan sesudah perlakuan dihitung, kemudian setelah proses lisis dihitung untuk menentukan tingkat pelarutan bekuan. Persentase lisis bekuan dihitung berdasarkan perbedaan berat tersebut. Kecepatan lisis dimanfaatkan untuk menentukan isolat bakteri yang menunjukkan aktivitas enzim fibrinolitik paling tinggi. Nilai laju lisis dihitung menggunakan rumus berikut: $\text{Lisis (\%)} = (\text{berat bekuan yang lisis} / \text{berat bekuan sebelum lisis}) \times 100\%$.

3.2 Uji lempeng fibrin (fibrin plate). Prinsip dari teknik fibrin plate dish berlandaskan pada pemanfaatan kombinasi fibrinogen dan trombin yang dicampurkan ke dalam media agar. Pendekatan ini memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi terhadap aktivitas fibrinolisis, meskipun proses pengerjaannya memerlukan waktu yang lebih lama. Pengujian menggunakan pelat cakram fibrin umumnya banyak diterapkan dalam penelitian terkait obat-obatan fibrinolitik.

Agar 1,7% dan fibrin 3% yang diperoleh dari fasilitas pemurnian serum kelinci ditambahkan ke cawan Petri dan dilarutkan dalam buffer borat pada pH 7,8. Campuran larutan media kemudian dipanaskan. Setelah pemanasan, 12 ml larutan media campuran dikeluarkan, dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah dilapisi dengan kapas berlemak, kemudian disterilkan dengan pemanasan pada suhu 121°C selama 30 menit. Media steril dituangkan ke dalam cawan Petri dan ditambahkan 400 ml metilen biru agar zona fibrinolitik bening terlihat jelas. Setelah media mengeras, bor lubang dengan batang bor dan lakukan perforasi pada media ini untuk aplikasi dan pengelolaan sampel. Sampel yang diaplikasikan pada media akan diinkubasi pada suhu 37 °C dan pH 7 selama 24 jam. Kemampuan fibrinolitik ekstrak enzim tempe gembus mentah dapat dibuktikan dengan adanya zona bening yang terbentuk. Area transparan menandakan bahwa isolat bakteri menggunakan protein dalam media tumbuh sebagai bahan nutrisi. Area transparan yang berhasil membentuk sampel yang diuji degradasi fibrin di dalam bekuan darah. Aktivitas fibrinolitik ekstrak enzim tempe dapat dilakukan dengan menentukan indeks aktivitas enzim fibrinolitik (IAE). IAE dihitung menggunakan rumus yaitu perbandingan antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Ashipala & He, 2008).

Ekstrak protein (ECP) dan PP diuji aktivitas fibrinolitiknya secara semi-kuantitatif menggunakan teknik fibrin plate. Media fibrin dibuat dengan mencampurkan 100 µL trombin ke dalam larutan 0,5 M CaCl₂ serta 4 mL agarosa cair steril yang mengandung 900 µL

fibrinogen 0,1% dalam PBS dengan pH 7,4. Setelah media mengeras, sampel sebanyak 10 μ L diletakkan pada membran berukuran 0,55 cm yang ditempatkan di atas piringan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas fibrinolitik terlihat dari terbentuknya area bening di sekitar membran tersebut.

G. Landasan Teori

Menurut Kotb, (2012) penyakit kardiovaskular (CVDs) merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia. Salah satu faktor yang berkontribusi terhadap terjadinya CVDs adalah pembentukan bekuan darah di dalam pembuluh darah, di mana fibrin yang mengeras dapat menghalangi aliran darah. Berbagai agen trombolitik seperti aktivator plasminogen dan urokinase telah digunakan untuk melarutkan trombus, namun penggunaannya sering kali disertai efek samping berupa perdarahan internal serta biaya pengobatan yang tinggi. Oleh karena itu, penelitian terkait enzim fibrinolitik terus dikembangkan sebagai alternatif terapi yang lebih aman dan terjangkau, makanan fermentasi tradisional menyimpan potensi besar sebagai sumber mikroorganisme yang menghasilkan enzim fibrinolitik (Prihanto *et al.*, 2013). Contohnya adalah natto, salah satu jenis makanan fermentasi yang diketahui memiliki aktivitas fibrinolitik, sedangkan di Indonesia, tempe merupakan makanan fermentasi tradisional yang paling umum dikonsumsi.

Menurut Fajri *et al.*, (2024) manfaat tempe gembus bagi kesehatan adalah dapat digunakan sebagai sumber nabati dan sumber probiotik. Kandungan antioksidan dan isoflavon pada tempe gembus dapat digunakan untuk menjaga kesehatan jantung, kesehatan tulang, dan mencegah diabetes. Tempe gembus yang tinggi protein dan serat namun rendah lemak dapat dimanfaatkan untuk menurunkan berat badan. Menurut penelitian Nadea *et al.*, (2023) pengujian menggunakan metode clot lysis dilakukan untuk mengonfirmasi keberadaan aktivitas fibrinolitik dalam sampel. Metode ini memiliki kelebihan berupa waktu pengerjaan yang relatif singkat, kebutuhan sampel yang minimal, serta biaya yang ekonomis.

Kadar protein pada tempe dapat berhubungan dengan peningkatan aktivitas enzim, terutama enzim proteolitik yang dihasilkan oleh jamur tempe. Menurut penelitian Nadea *et al.*, (2023) tentang pengukuran kadar protein setelah proses purnian dengan

menggunakan ammonium sulfat, konsentrasi protein dalam sampel ekstrak tempe kedelai hitam diperoleh sebesar 245,76 µg/mL.

Enzim fibrinolitik termasuk dalam kelompok enzim protease yang berfungsi memecah fibrin dan digunakan dalam terapi penyakit kardiovaskular. Enzim ini dapat diperoleh dari berbagai sumber mikroorganisme, salah satunya adalah jamur *Rhizopus* sp., yang secara luas dimanfaatkan dalam proses pembuatan tempe (Kotb, 2012). Menurut penelitian Nadea *et al.*, (2023) ekstrak tempe kedelai hitam diuji pada berbagai konsentrasi yaitu 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Hasil pengujian mengindikasikan bahwa tingkat lisis bekuan darah tertinggi dan paling efektif terjadi pada konsentrasi 100% dari sampel yang sudah dimurnikan, dengan persentase mencapai 59%.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Afifah, (2014) , berhasil diisolasi bakteri penghasil enzim protease fibrinolitik yang berasal dari makanan fermentasi tradisional Indonesia, seperti oncom merah dan tempe gembus, telah diisolasi. Dua isolat unggulan yang berhasil diperoleh adalah *Bacillus licheniformis* RO3 dari oncom merah dan *Bacillus pumilus* 2.g dari tempe gembus, yang kemudian diidentifikasi melalui kit API 50 CHB serta analisis sekuens 16S rRNA. Hasilnya, *B. licheniformis* RO3 teridentifikasi dengan kemiripan 99,9%, sedangkan *B. pumilus* 2.g teridentifikasi dengan kemiripan 99,7%. Enzim fibrinolitik yang diproduksi oleh *B. pumilus* 2.g menunjukkan aktivitas kuat dalam menghidrolisis fibrinogen dan substrat sintetik, serta memiliki karakteristik stabil di pH 5 hingga 9 dan suhu di bawah 60°C. Identifikasi lebih lanjut menunjukkan bahwa enzim ini tergolong dalam kelompok protease serin, dengan aktivitas yang lebih spesifik terhadap rantai α dan β fibrinogen, namun tidak mempengaruhi rantai γ fibrinogen.

Pemurnian enzim protease fibrinolitik dilakukan melalui penambahan amonium sulfat pada berbagai konsentrasi, yaitu 10%, 20%, 40%, dan 80%, yang dipilih berdasarkan tinjauan literatur sebelumnya. Variasi konsentrasi amonium sulfat tersebut bertujuan untuk menentukan konsentrasi optimal yang paling efektif dalam proses pemurnian enzim protease fibrinolitik yang berasal dari tempe kedelai (Febriana, 2016). Menurut penelitian Mitha Alviyulita *et al.*, (2014) hasil menunjukkan bahwa kondisi optimum diperoleh pada penambahan ammonium sulfat dengan konsentrasi 90% selama perendaman selama 36 jam, dengan aktivitas enzim sebesar 18,81%. Penambahan

ammonium sulfat pada larutan protein enzim menyebabkan sebagian besar molekul air berikatan dengan ion garam, sehingga mengurangi jumlah air yang tersedia untuk berikatan dengan protein dan mengakibatkan pengendapan protein. Proses ini dapat meningkatkan aktivitas enzim karena jumlah kontaminan yang menghambat sisi aktif enzim dalam berikatan dengan substrat berkurang.

Pengujian aktivitas fibrinolitik ekstrak tempe gembus dilakukan untuk mengetahui potensi enzim sebagai agen fibrinolitik. Tes ini dilakukan *secara in vitro* menggunakan lisis bekuan darah. Parameter dalam uji sebagai agen fibrinolitik ini antara lain berapa kombinasi darah yang berhasil dilisiskan sampel.

H. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis yang dapat diambil adalah:

Pertama, kadar protein ekstrak enzim tempe gembus lebih tinggi pada sampel setelah pemurnian dari pada sebelum pemurnian.

Kedua, ekstrak enzim tempe gembus memiliki aktivitas fibrinolitik lebih tinggi setelah pemurnian.

Ketiga, konsentrasi paling optimum dari ekstrak enzim tempe gembus adalah konsentrasi 100% dan telah melalui proses pemurnian.