

Efek Anti-thrombosis Ekstrak Protease Fibrinolitik Asal Isolat *Staphylococcus hominis* HSFT-2

Afriansyah, M.A.^{1*}

¹Program Studi Diploma 4 Teknologi Laboratorium Medik, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang, Jawa Tengah
E-mail: afriansyah@unimus.ac.id

Abstrak

Latar Belakang: Gangguan trombotik menempati urutan 3 besar penyebab kematian pada kelompok penyakit non infeksi. Telah banyak kasus kematian di seluruh dunia yang disebabkan oleh trombus. Di Amerika Serikat jumlah kematian akibat penyakit trombotik tercatat sebanyak 100.000 orang setiap tahunnya dan terus meningkat 900.000 kasus per tahun. **Tujuan:** untuk menguji aktivitas protease fibrinolitik dari *Staphylococcus hominis* yang diisolasi dari jaringan otot teripang (*Holothuria scabra*) yang difermentasi sebagai agen antitrombotik. **Metode:** Uji antitrombosis dilakukan dengan metode gravimetri. crude enzim diperoleh dari isolat *S.hominis* HSFT-2 diuji aktivitasnya dalam melisis bekuan darah (anti-trombosis), dan koagulasi darah secara *in vitro*. **Hasil:** Ekstrak kasar enzim bakteri memiliki aktivitas trombolitik yang ditunjukkan dengan persentase lisis bekuan sebesar 41,94%. Ekstrak enzim dapat memperpanjang waktu pembekuan darah hingga 16 detik berdasarkan metode aPTT (*Activated Partial Thromboplastin Time*). Ekstrak enzim memiliki aktivitas retraksi bekuan darah dengan menunjukkan perbedaan 12% (lebih tinggi) dibandingkan kontrol (darah tanpa enzim). **Kesimpulan:** ekstrak enzim dapat mencegah pembekuan darah secara parsial. Kesimpulannya, ekstrak kasar protease fibrinolitik yang diisolasi dari *S. hominis* merupakan sumber potensial agen antitrombolitik.

Kata Kunci: Thrombotic disease, protease fibrinolytic, anti-thrombosis

Abstract

Background: In the group of non-infection diseases, thrombotic disorder is one of the top three causes of death. Many people have died as a result of thrombus around the world. In the United States, the number of deaths due to thrombotic disease is estimated to be 100,000 per year. **Objective:** The goal of this research is to see if the fibrinolytic protease from *Staphylococcus hominis* isolated from fermented sea cucumber (*Holothuria scabra*) muscle tissue could be used as an anti-thrombotic agent. **Method:** Anti-thrombosis test was performed by gravimetric method. crude enzyme obtained from *S.hominis* HSFT-2 isolate was tested for its activity in lysing blood clots (anti-thrombosis), and blood coagulation *in vitro*. **Result:** The crude extracts of bacterial enzyme demonstrated thrombolytic activity as measured by 41,94% clot lysis. Based on the aPTT (activated Partial Thromboplastin Time) method, the enzyme extract could increase blood clotting time by 16 seconds based on. The enzyme extract had a 12 percent difference (higher) in blood clot retraction activity than the control (blood without enzyme). **Conclusion:** The anticoagulant test results showed that the enzyme extract could prevent blood coagulation partially. In conclusion, the crude extract of fibrinolytic protease isolated from *S. hominis* from is a potential source of anti-thrombotic agents.

Keywords: Thrombotic disease; protease fibrinolytic; anti-thrombosis

I. PENDAHULUAN

Thrombotic disorder menempati peringkat 3 teratas *cardiovascular killers* dan turut berkontribusi sebagai *non-infection disease* secara global.^{1,2} Telah banyak kasus kematian diseluruh dunia yang ditimbulkan oleh sumbat *thrombosis*, di Amerika kasus kematian akibat *thrombotic disease* tercatat sebanyak 100.000 orang setiap tahunnya dan mengalami peningkatan 900.000 kasus per tahunnya.³ Pemberian agen anti trombolitik diperlukan dalam mengatasi kegagalan sistem hemostasis manusia. *Thrombotic disorder* seperti *pulmonary embolism*, *deep venous thrombolism*, dan *myocardial infarction* menjadi hal yang dapat mengancam nyawa manusia.⁴

Agen anti trombolitik yang ada saat ini yaitu *plasminogen activator* (PA) yang terdiri dari fibrin spesifik dan non spesifik. Urokinase seperti *tissue-type PA* (t-PA) adalah fibrin spesifik sedangkan Streptokinase (SK) merupakan fibrin non spesifik.⁵ Anti-trombolitik tersebut telah diketahui memiliki aktivitas dalam mendegradasi fibrin dan diketahui memiliki efek samping yang berisiko seperti reaksi alergi sehingga penelusuran sumber agen anti-trombolitik alami perlu dilakukan guna meminimalkan risiko yang mungkin akan timbul.⁶

Aplikasi protease fibrinolitik sebagai agen terapi *thrombosis* dalam *medical practice* sangat berpotensi namun masih perlu dilakukan pengujian klinis lebih lanjut agar meminimalkan risiko yang mungkin timbul.⁶ Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mencari agen anti-trombolitik yang aman untuk diaplikasikan ke manusia. Beberapa tahun terakhir telah banyak dilaporkan senyawa bioaktif yang potensial sebagai agen yang ideal untuk terapi *thrombotic disease*. Penelitian ini, melaporkan komponen bioaktif enzim protease fibrinolitik yang diperoleh dari metabolit sekunder *Staphylococcus hominis*

yang berpotensi dijadikan sebagai agen anti-trombolitik.

Thrombolytic agents diaplikasikan sebagai agen terapi penyakit yang disebabkan oleh pembentukan trombus. Agen anti trombosis yang ada saat ini yaitu *plasminogen activator* (PA) bekerja melalui jalur intrinsik yang memaksa sistem pembuluh darah mengeluarkan *thrombo resistance defense mechanism* dengan cara mengkonversi *inactive plasminogen* menjadi *active plasmin* yang merupakan agen fibrinolitik alami sehingga menghidrolisis atau mendegradasi fibrin yang berperan dalam pembentukan bekuan darah (trombus).⁷

Thrombolytic agents dikategorikan berdasarkan sumber agen penghasilnya. Metode yang digunakan dalam memperoleh agen tersebut menjadi hal yang tidak kalah pentingnya dalam memproduksi agen anti-trombolitik yang ideal. Kecenderungan metode klasifikasi enzimatik pada fibrin berdasarkan pada mekanisme aksi dan atau kesesuaian dari sumbernya dapat membantu dalam mengkarakterisasi sifat beragam dari *activator plasminogen* namun semua dilakukan dengan tujuan akhir yang sama yaitu konversi plasminogen inaktif menjadi plasmin aktif.³

Staphylokinase merupakan enzim biokatif yang diproduksi oleh bakteri dari keluarga *Staphylococcus* yang ditumbuhkan pada media kultur.⁸ Penelitian ini berhasil mengisolasi senyawa bioaktif Staphylokinase dari bakteri *Staphylococcus hominis* dan telah diuji terhadap aktivitas fibrinolisis secara *in-vitro*. *S.hominis* merupakan bakteri simbiosis berasal dari hasil fermentasi jaringan otot teripang pasir (*H.scabra*). Enzim tersebut diketahui memiliki aktivitas antitrombosis.⁹

Kemampuan dalam mendegradasi fibrin ini dikaitkan dengan kemampuan enzim tersebut dalam mengkonversi *inactivate plasminogen* menjadi *proteolytic anzyme plasmin*.

Mekanisme ini mirip dengan proses fibrinolisis yang terjadi didalam tubuh. Dalam meminimalkan risiko yang terjadi saat penggunaan protease fibrinolitik, beberapa penelitian telah dilakukan salah satunya *gene recombinant*, dalam hal ini dapat mengurangi patogenitas enzim.¹⁰

II. BAHAN DAN METODE

Crude enzim protease fibrinolitik diperoleh dari isolat *S.hominis* HSFT-2. Uji aktivitas anti-trombosis menggunakan metode gravimetri. Crude enzim diuji aktivitas dalam melisiskan bekuan darah (anti trombosis) secara *in vitro*. Sampel darah dalam mikrotube didiamkan sampai terbentuk gumpalan. Crude enzim fibrinolitik ditambahkan kedalam mikrotube.⁹

A. UJI KOAGULASI DARAH

Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

APTT bertujuan untuk mengetahui efektivitas enzim dalam menghalangi atau menghambat proses pembekuan darah secara *in vitro* menggunakan reagen aPTT. Masa pembekuan yang terjadi ditandai dengan terbentuknya bekuan dan waktu yang dibutuhkan darah sampai terbentuk bekuan diukur menggunakan alat *stopwatch*.¹¹

B. RETRAKSI BEKUAN

Retraksi bekuan berfungsi untuk mengukur sejauh mana enzim bekerja dalam melisiskan trombosit yang terbentuk pada saat proses pembekuan bekuan darah. Darah tanpa antikoagulan yang sudah ditambah crude enzim fibrinolitik didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam kemudian dihitung persentase volume serumnya. Persentasi volume serum menunjukkan kemampuan enzim dalam melisiskan gumpalan darah.¹²

C. UJI AKTIVITAS SEBAGAI ANTIKOAGULAN

Uji aktivitas antikoagulan dengan metode *Lee-White*. Pengukuran waktu pembekuan metode *Lee-White* menggunakan tabung reaksi yang berisi EDTA (*Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*) dan enzim fibrinolitik. Waktu pembekuan diukur menggunakan *stopwatch*.⁹

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Protease enzyme plasmin merupakan senyawa biokatif yang diproduksi oleh bakteri dari strain *Staphylococcus* yang ditumbuhkan pada media kultur minimal fibrin. *Proteolytic enzyme plasmin* mirip seperti *active plasmin*.¹³ Enzim tersebut memiliki aktivitas antitrombosis dengan mekanisme kerja mirip seperti proses fibrinolisis yang terjadi secara alami pada tubuh manusia yaitu mengubah *inactive plasminogen* menjadi *active plasmin* sehingga akan menguraikan benang-benang fibrin yang terbentuk saat terjadinya pembekuan darah.¹⁴

A. UJI AKTIVITAS FIBRINOLISIS/TROMBOLISIS

Aktivitas trombolisis ditujukan untuk mengetahui daya aktivitas enzim fibrinolitik terhadap melisiskan gumpalan darah tanpa memperhatikan mekanisme fibrinolitik. Hasil pengujian menunjukkan hasil yang positif seperti yang distampilkan pada Gambar 1 dan dapat dikatakan bahwa enzim memiliki kemampuan dalam melisiskan gumpalan darah dengan persentase lisis bekuan sebesar 41, 94% seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.



GAMBAR 1. HASIL UJI AKTIVITAS ENZIM FIBRINOLITIK TERHADAP MELISISKAN GUMPALAN DARAH. KET: KONTROL POSITIF (PENAMBAHAN 100M NATTOKINASE); KONTROL NEGATIF (TANPA PERLAKUAN), E.1: PENAMBAHAN 100 μ ENZIM.

TABEL 1. PERSENTASE UJI AKTIVITAS TROMBOLISIS

Kode Sampel	Persentase Lisis Bekuan (%)
Kontrol Positif	59.98 %
E.1	41.94 %

Darah yang didiamkan tanpa pemberian antikoagulan akan membeku dan terjadi mekanisme koagulasi yang melibatkan faktor-faktor koagulasi salah satunya adalah fibrin. Fibrin merupakan komponen protein utama bekuan darah. Darah yang mengalami koagulasi disebabkan oleh terbentuknya benang-benang fibrin. Pemberian enzim fibrinolitik akan melarutkan gumpalan fibrin melalui mekanisme fibrinolisis dengan mengkonversi inaktif plasminogen menjadi *proteolytic enzyme plasmin*.¹⁵

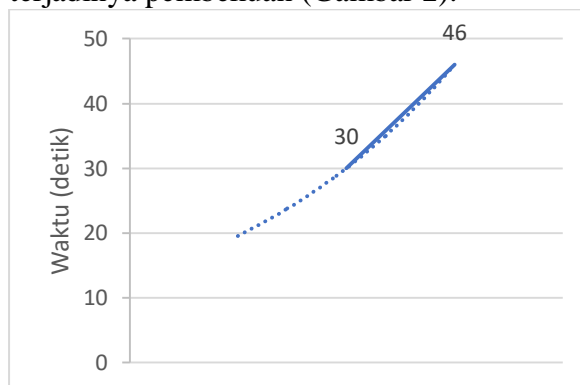
B. UJI KOAGULASI DARAH

Aktivitas enzim dalam menghambat pembekuan darah diukur berdasarkan waktu yang dibutuhkan darah sampai terjadi pembekuan. Uji aktivitas inhibisi enzim fibrinolitik dalam menghambat proses pembentukan bekuan darah menggunakan metode aPTT.¹⁵ Hasil pengujian menunjukkan adanya aktivitas dalam menghambat faktor pembekuan darah sehingga waktu yang dibutuhkan darah untuk membeku menjadi lebih lama 16 detik dibandingkan dengan kontrol seperti yang ditampilkan pada Tabel 2.

TABEL 2. CATATAN WAKTU APTT

Kode Sampel	Waktu (Detik)	Selisih Waktu (Detik)
Kontrol	30 Detik	16 detik
Sampel	46 Detik	

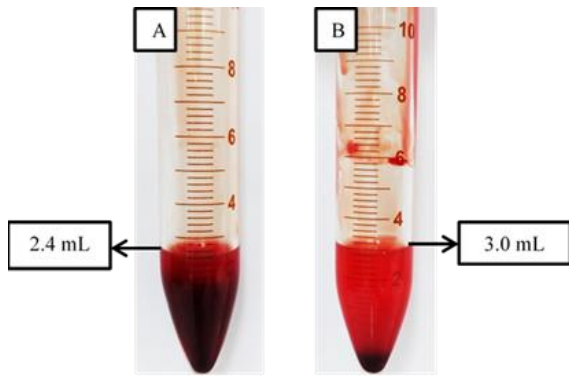
Hasil menunjukkan setelah penambahan enzim fibrinolitik terdapat perpanjangan waktu selama 16 detik yang dibutuhkan sampai terjadinya pembekuan (Gambar 2).



GAMBAR 2. GRAFIK PEMANJANGAN WAKTU PEMBEKUAN

Hasil ini menunjukkan adanya efek dari enzim protease fibrinolitik dalam menghambat proses pembekuan darah. Dalam plasma masih terkandung faktor koagulasi yang bisa aktif jika ditambahkan faktor pemicu. Pemeriksaan aPTT menggunakan reagen tromboplastin yang berfungsi mengaktifkan faktor pembekuan jalur intrinsik yaitu fibrinogen yang akan menjadi fibrin yang menyebabkan terjadinya pembekuan.¹⁶ Pemberian enzim protease fibrinolitik akan mendegradasi fibrin sehingga proses pembekuan darah menjadi terhambat ataupun terhentikan.¹⁷

Retraksi bertujuan menilai stabilitas trombus yang melibatkan kemampuan trombosit sebagai reseptor permukaan saat terbentuknya benang fibrin.¹⁸ Hasil pengujian menunjukkan terdapat perbedaan pada volume serum antara kontrol dan sampel sebesar 0,6 mL seperti yang tampak pada Gambar 2.



GAMBAR 2. VOLUME SERUM KONTROL DAN SAMPEL.

KET:

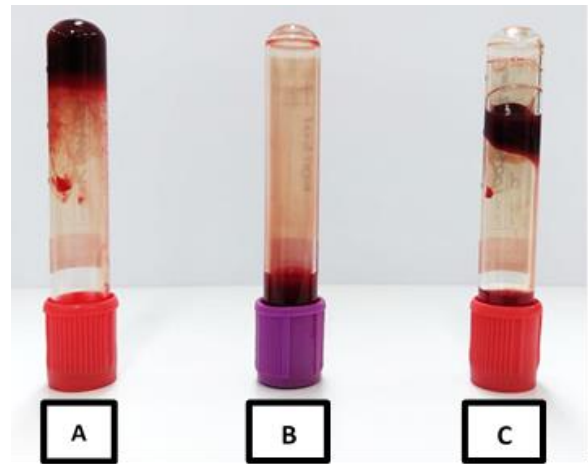
A: KONTROL (TANPA ENZIM),

B: SAMPEL (PENAMBAHAN 500 μ ENZIM)

Aktivitas enzim protease mempengaruhi jumlah bekuan darah yang terbentuk. Retraksi terjadi akibat adanya trombosit yang menempel pada benang fibrin menjadi satu lalu trombosit melepaskan zat prokoagulan sehingga terjadi ikatan satu sama lain antara benang fibrin kemudian pemberian enzim protease fibrinolitik dapat menghambat proses retraksi karena enzim ini bekerja melarutkan fibrin dalam darah saat akan terjadinya pembekuan darah.¹⁷

C. UJI AKTIVITAS SEBAGAI ANTIKOAGULAN

Hasil pengujian menunjukkan bahwa enzim memiliki potensi sebagai antikoagulan meskipun tidak sepenuhnya mengurai koagulasi pada darah seperti yang tampak pada Gambar 3. Hasil ini menunjukkan enzim memiliki aktivitas dalam melarutkan koagulasi darah namun kemampuannya tidak sebaik antikoagulan EDTA.



GAMBAR 3. HASIL UJI AKTIVITAS SEBAGAI ANTIKOAGULAN.

KET:

A: KONTROL NEGATIF (TANPA ENZIM),

B: KONTROL POSITIF (DARAH EDTA);

C: DARAH DITAMBAH 100 μ ENZIM.

Antikoagulan berfungsi untuk mengencerkan darah agar tidak terjadi pembekuan atau koagulasi. Antikoagulan yang biasa dipakai sampai saat ini adalah EDTA, Heparin, dan Natrium Citrat.¹⁸ Protease fibrinolitik memiliki mekanisme kerja yang mirip dengan antikoagulan yaitu melarutkan komponen fibrin yang merupakan komponen protein utama yang terlibat dalam proses koagulasi darah. Setelah darah keluar dari dalam tubuh, mekanisme pembekuan darah secara alami akan terjadi.¹⁹ Kasus ini mirip dengan perdarahan yang kemudian mengaktifasi plasminogen memicu terbentuknya bekuan fibrin. Keberadaan protein C pada enzim protease dan interaksi dengan *plasminogen activator inhibitor (PAI)* dapat menghambat atau mencegah terbentuknya formasi bekuan darah.²⁰

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Crude Enzim protease fibrinolitik asal *Staphylococcus hominis* HSFT-2 memiliki aktivitas trombolisis dan menghambat proses pembekuan darah sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai kandidat antitrombosis.

Purifikasi ekstrak protease fibrinolitik perlu dilakukan untuk memperoleh ekstrak enzim yang murni dan analisis zimografi guna

mengetahui berat molekul enzim protease fibrinolitik.

V. UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Muhammadiyah Semarang yang telah memberikan hibah untuk mendukung pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Konstantinides S V, Mccumber M, Ozaki Y, et al. Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden G.E. Raskob, P. Angchaisuksiri, A.N. Blanco, H. Buller, A. Gallus, B.J. Hunt, E.M. Hylek, A. Kakkar, S.V. Konstantinides, M. McCumber, Y. Ozaki, A. Wendelboe and J.I. Weitz Arterioscler Thromb Vasc . Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1111/jth.12698.This.
- [2] Ram KS, Jb P, Kumar A, et al. STAPHYLOKINASE : A BOON IN MEDICAL SCIENCES – REVIEW.
- [3] Kumar A, Ram KS. Evolutionary Trend of Thrombolytics. 2010; 2: 51–68.
- [4] WIMAN B, COLLEN D. Purification and Characterization of Human Antiplasmin, the Fast-Acting Plasmin Inhibitor in Plasma. *Eur J Biochem* 1977; 78: 19–26.
- [5] Altaf F, Wu S, Kasim V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. 2021; 8: 1–17.
- [6] Morello S, Caiazzo E, Turiello R, et al. Thrombo-Inflammation : A Focus on NTPDase1 / CD39. 2021; 1–13.
- [7] Matsuo O, Okada K, Fukao H, et al. Thrombolytic Properties of Staphylokinase. 1990; 925–929.
- [8] Fuad H. Isolasi dan Analisis Biodiversitas Bakteri Penghasil Enzim Fibrinolitik pada Produk Rusip Jaringan Otot Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) sebagai Agen Antitrombosis.
- [9] Weiss E, Roux O, Catherine JM, et al. Fibrinolysis Resistance : A Potential Mechanism Underlying COVID-19 Coagulopathy. 2020; 1343–1345.
- [10] Kurniawan LB, Arif M. Hemostasis Berlandaskan Sel Hidup (in Vivo). *Indones J Clin Pathol Med Lab* 2016; 19: 204.
- [11] Samson AL, Alwis I, Maclean JAA, et al. Endogenous fi brinolysis facilitates clot retraction in vivo. 2017; 130: 2453–2462.
- [12] Kaminogawa S, Mizobuchi H, Yamauchi K. Comparison of Bovine Milk Protease with Plasmin. 1369. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1080/00021369.1972.10860538.
- [13] Review I. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. 2015; 13: 98–105.
- [14] Umar I, Sujud RW. Hemostasis dan Disseminated Intravascular Coagulation (DIC). *J Anaesth Pain* 2020; 1: 19–32.
- [15] Simko Rj, Tsung Ffw, Stanek Ej. Activated Clotting Time Versus Activated Partial Thromboplastin Time Fortherapeutic Monitoring Of Heparin. 1995; 29: 1015–1021.
- [16] Kusnugroho D, Pardede B. Uji Koagulasi Point-of-Care Perioperatif. 2017; 44: 367–374.
- [17] Penelitian L, Pengabdian DAN, Masyarakat K. Pedoman Teknik Pemeriksaan Laboratorium Klinik by Gilang Nugraha.
- [18] Ferdiani D, Zilda DS, Afriansyah MA, et al. Characteristics and Substrate Specificity of Semi-Purified Bacterial Protease of *Bacillus thuringiensis* HSFI-12 with Potential as Antithrombotic Agent. *Sci Technol Indones* 2023; 8: 9–16.
- [19] Suganda H, Ardi Afriansyah M, Rahmawati Sulistyningtyas A, et al. Isolation and Molecular Identification of Proteolytic Bacteria in Wadi Fermentation Products of Digestive Organs of Eel (*Anguilla* Sp.) Based on 16Srrna Gene. *Int J Adv Res* 2022; 10: 1254–1260.
- [20] Islamiyah N, Ethica SN, Afriansyah MA, et al. The Importance of Purification and Activity Analysis of the Purified Product of Thrombolytic Protease from *Bacillus* sp. HSFI-12– A Review . *Proc 7th Int Conf Biol Sci (ICBS 2021)*; 22. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.2991/absr.k.220406.052.