

AKTIVITAS AGEN TROMBOLITIK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) HASIL FERMENTASI OLEH *Acetobacter aceti* FNCC 0016 DENGAN METODE CLOT LYSIS SECARA IN-VITRO

Submitted : 6 Oktober 2021

Edited : 6 Desember 2021

Accepted : 13 Desember 2021

Adristy Ratna Kusumo, Achmad Toto Poernomo*, Riesta Primaharinastiti

Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya,
Jawa Timur, Indonesia

Email : achmad-t-p@ff.unair.ac.id

Telepon Penulis Utama : 08165434137

ABSTRACT

Thrombolytic agents are plasminogen activators which can dissolve blood clot that caused cardiovascular disease (CVD). Thrombolytic agents can be obtained from microorganism such as Acetobacter aceti FNCC 0016 and from plants such as Centella asiatica, these thrombolytic agents are combined using fermentation method. Fermentation can improves the pharmacological properties of plants through modification of their metabolites. Fermentation mediated by microorganism has been shown to enhance the therapeutic efficacies of some plants. This research aimed to determine the increase of thrombolytic activity from the fermentation product of Centella asiatica by Acetobacter aceti FNCC 0016. Fermentation was carried out at various times (0 h, 24 h, 48 h, 72 h) at a temperature of $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. The thrombolytic activity was determined using in-vitro clot lysis method. The results showed a significant increase in thrombolytic activity after 72 hours of fermentation with thrombolytic index of 91,49 compared to Centella asiatica extract (42.93) and Acetobacter aceti FNCC 0016 (19.99). Conclusion: Thus, Centella asiatica that has undergone a fermentation process with Acetobacter aceti FNCC 0016 can increase the thrombolytic activity.

Keywords: *Thrombolytic Agent, Acetobacter aceti, Centella asiatica*

PENDAHULUAN

Trombosis atau akumulasi gumpalan fibrin di pembuluh darah merupakan salah satu faktor risiko penyakit kardiovaskular⁽¹⁾. Dalam keadaan normal, trombus atau bekuan darah akan dihidrolisis oleh plasmin sehingga trombosis tidak terjadi. Namun, dalam kondisi yang tidak seimbang atau abnormal, trombus tidak terhidrolisis sehingga terjadilah trombosis⁽²⁾. Untuk mengurangi risiko penyakit akibat penyumbatan oleh trombus, dapat digunakan agen trombolitik⁽³⁾.

Agen trombolitik berdasarkan mekanisme kerjanya dapat dibedakan menjadi dua yaitu, mengaktifkan

plasminogen menjadi plasmin untuk mendegradasi fibrin atau disebut aktivator plasminogen, seperti *tissue-type plasminogen activator* (t-PA), streptokinase (SK), dan urokinase (UK) atau secara langsung mendegradasi fibrin menjadi *fibrin degradation product* (FDP)⁽⁴⁾. Terapi fibrinolitik dengan t-PA masih populer sampai saat ini, tetapi memiliki keterbatasan diantaranya spesifisitas fibrin yang rendah dan timbul efek samping pendarahan⁽⁵⁾. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk meningkatkan efikasi dan spesifisitas dari terapi fibrinolitik⁽²⁾.

Agen trombolitik banyak ditemukan pada mikroorganisme diantaranya *Acetobacter aceti*⁽⁶⁾, *Bacillus natto*, *Bacillus amyloliquefaciens*, dan *subtilis* QK02⁽⁴⁾. Dari sumber mikroorganisme tersebut, *Acetobacter aceti* hasil isolasi ekstrak daun pinus telah dikarakterisasi aktivitas fibrinolitiknya dan memiliki aktivitas yang cukup besar⁽⁶⁾. Agen trombolitik juga dapat ditemukan pada tanaman seperti *Centella asiatica* berdasarkan penelitian Hossain (2018), diketahui daun *Centella asiatica* memiliki aktivitas trombolitik dengan indeks trombolitik sebesar 79,18⁽⁷⁾. Selain *Centella asiatica*, tanaman lain juga diteliti aktivitas trombolitiknya seperti kulit batang dan biji asam jawa (*Tamarindus indica*)⁽⁸⁾, daun *Lophopetalum javanicum*⁽⁹⁾, dan daun *Coriandrum sativum*⁽¹⁰⁾. *Centella asiatica* mengandung metabolit sekunder yang baik bagi pertumbuhan bakteri dan kandungan protein dalam *Centella asiatica* dapat memodulasi enzim melalui ikatan pada sisi allosterik enzim⁽¹¹⁾. Sehingga, *Centella asiatica* dapat dipertimbangkan sebagai media fermentasi.

Fermentasi dapat meningkatkan sifat farmakologis tanaman melalui modifikasi metabolitnya. Fermentasi yang dimediasi oleh mikroorganisme telah terbukti meningkatkan khasiat terapeutik dari beberapa tanaman⁽¹²⁾. Fermentasi dapat memproduksi produk dengan kualitas yang lebih baik. Lebih spesifiknya proses fermentasi menggunakan mikroba untuk memecah substrat yang tidak diinginkan menjadi komponen yang sesuai, sehingga menghasilkan komponen bioaktif yang bermanfaat. Selain itu, fermentasi juga dapat meningkatkan nilai nutrisi dalam makanan⁽¹²⁾. Banyaknya manfaat yang dihasilkan pada proses fermentasi maka pada penelitian ini dilakukan proses fermentasi daun *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* yang juga memiliki aktivitas fibrinolitik dan

merupakan salah satu mikroba yang banyak digunakan dalam proses fermentasi.

Fermentasi *Centella asiatica* belum pernah dilaporkan menghasilkan aktivitas trombolitik. Untuk mengetahui aktivitas trombolitik, digunakan metode *clot lysis* dengan persen lisis bekuan darah sebagai parameter pengamatan, kemudian aktivitasnya ditentukan menggunakan indeks trombolitik. Diharapkan terjadi peningkatan aktivitas trombolitik dari hasil fermentasi daun *Centella asiatica* dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016.

METODE PENELITIAN

Bahan

Acetobacter aceti FNCC 0016 yang diperoleh dari *Food and Nutrition Culture Collection* Universitas Gadjah Mada, daun *Centella asiatica* koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu, darah vena jugularis sapi dari Rumah Potong Hewan Surabaya. Bahan untuk media pertumbuhan bakteri yaitu *glucose* (PUDAK Scientific), *yeast*, pepton, agar. Bahan untuk peremajaan bakteri yaitu *Glucose Yeast Peptone broth*, bahan untuk uji proteolitik adalah susu skim (PT. Nutrifood Indonesia), bahan untuk uji fibrinolitik fibrin adalah fibrin *bovine blood* (Simagchem®), dan bahan lain yang digunakan adalah aquades, agarose (Pijar Samudera), NaCl 0,9%, metilen biru (MERCK), dapar fosfat K₂HPO₄ dan KH₂PO₄ (SIGMA), dan fibrinase (Dipa Pharmalab Intersains).

Alat

Cawan petri, Beaker glass, gelas ukur, autoclave HL-340 Series Vertical Type Steam Sterilizer, vortex maxi mixII IKA®, centrifuge Hettich Zentrifugen EBA 20, mikropipet Eppendorf® research plus, inkubator Memmert IN110 genius 3, timbangan digital Sartorius Type BP 221S®.

Preparasi Media dan Pemeliharaan Bakteri

Melarutkan 2,0 g glukosa, 0,5 g *yeast*, 0,5 g pepton dan 1,5 g agar dalam 100 mL aquadest, kemudian dipanaskan. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 mL dan disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, setelah itu tabung reaksi dimiringkan dan biarkan memadat. *Acetobacter aceti* FNCC 001 digesekkan secara aseptis ke dalam GYP Agar miring. diinkubasi pada suhu 37±1°C selama 24 jam^(13,14).

Preparasi Inokulum *Glucose Yeast Peptone*

Melarutkan 3,0 g glukosa, 0,75 g *yeast*, dan 0,75 g pepton dalam 125 ml aquadest kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Media GYP agar miring berisi *Acetobacter aceti* FNCC 0016 yang telah diinkubasi selama 24 jam ditambahkan dengan 10 mL media cair GYP. Suspensi tersebut kemudian divortex selama ± 5 menit sampai bakteri terlepas dari media. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer hingga didapatkan 25% transmittan pada panjang gelombang 580 nm. 10 ml suspensi tersebut dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 ml berisi media cair GYP. Kemudian, inkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan penggojokan 100 rpm selama 24 jam pada suhu 30 ± 1°C.

Pembuatan Infusa Daun

Centella asiatica koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional di Kota Tawangmangu, diperoleh bulan Februari 2021. Simplisia daun kering dibuat menjadi serbuk dengan cara dimasukkan ke dalam blender yang telah steril. Serbuk tersebut disaring dengan ayakan mesh 500 dan dapat disimpan dalam wadah gelas dan terhindar dari matahari. Pada saat penyiapan ekstrak, sebanyak 32,5 gram serbuk *Centella asiatica* ditambah 650

ml aqua demineralisata, kemudian disaring menggunakan kertas Whatman dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit⁽¹⁵⁾.

Fermentasi Media Tanaman

Pada media fermentasi, inokulum *Acetobacter aceti* FNCC 0016 yang ditambahkan yaitu sebanyak 10 ml. Fermentasi dilakukan dalam 12 labu Erlenmeyer 250 ml berisi ekstrak *Centella asiatica*, Erlenmeyer pertama sampai ketiga diberi label 0 jam (R1,R2,R3) , Erlenmeyer keempat sampai keenam diberi label 24 jam (R1,R2,R3), Erlenmeyer ketujuh sampai kesembilan diberi label 48 jam (R1,R2,R3), dan Erlenmeyer kesepuluh sampai kedua belas diberi label 72 jam (R1,R2,R3). Erlenmeyer diinkubasi pada suhu 30°C selama 0, 24, 48, dan 72 jam. (modifikasi metode Rosada 2018)⁽¹⁶⁾.

Uji Aktivitas Proteolitik dengan Susu Skim Agar

Dengan melarutkan 1 gram serbuk susu ke dalam 10 ml aquadest (10% b/v). Selanjutnya, ditambahkan 1,5% larutan agar dan dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Menuang 20 mL ke dalam cawan petri serta diratakan dan biarkan hingga media memadat sempurna. Dibuat sumuran untuk tempat sampel. Pada media susu skim agar, dibuatkan sumur dengan diameter 7 mm menggunakan logam pelubang steril dan masing-masing lubang diberi 15 µL ekstrak *Centella asiatica*, larutan starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016, kontrol positif yaitu nattokinase dan kontrol negatif yaitu dapar fosfat pH 7. Setelah itu media uji aktivitas enzim proteolitik diinkubasi pada suhu 37±1°C selama 24 jam. Jika bakteri menimbulkan zona jernih di sekitar koloni maka bakteri tersebut menghasilkan enzim proteolitik. Kemudian dilakukan pengukuran diameter zona jernih dengan menggunakan jangka sorong dan ditentukan indeks

proteolitiknya (IP) yaitu dengan membandingkan antara rata – rata diameter zona jernih (mm) dan diameter lubang (mm).

Uji Aktivitas Enzim Fibrinolitik dengan Fibrin Plate

Fibrin plate dibuat dengan melarutkan 0,3% b/v fibrin dalam 100 mL dapar fosfat 0,1 M pH 7 kemudian ditambah dengan 1,7% b/v agarosa lalu disterilkan dengan cara pasteurisasi pada suhu 80°C selama 3 menit. Kemudian larutan tersebut ditambahkan 800 µL metilen biru pada plate agar zona jernih pada uji aktivitas enzim fibrinolitik terlihat dengan jelas. Setelah itu dituang sebanyak 20 mL ke dalam cawan petri yang telah disterilkan (Modifikasi metode Ashipala and He, 2008 dan Poernomo, Isnaeni, and Purwanto, 2013)⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾. Dibuat sumuran dengan logam pelubang steril dengan diameter 7 mm pada masing-masing fibrin plate. Kemudian masing-masing lubang diberi 15 µL ekstrak *Centella asiatica*, larutan starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016, hasil fermentasi *Centella asiatica*, kontrol positif yaitu nattokinase dan kontrol negatif yaitu dapar fosfat pH 7 dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jika bakteri menghasilkan enzim fibrinolitik akan memberikan zona jernih disekitar koloni. Kemudian diukur zona jernihnya dan ditentukan aktivitas fibrinolitiknya yang dinyatakan dalam Indeks Fibrinolitik (IR) yaitu perbandingan antara rata – rata diameter zona jernih (mm) dan diameter lubang (mm). Zona jernih diartikan sebagai hasil degradasi fibrin dan diameternya sebanding dengan potensi aktivitas fibrinolitik.

Uji Aktivitas Trombolitik dengan Metode Clot Lysis

Media yang digunakan untuk uji aktivitas agen trombolitik adalah darah vena jugularis sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Kota Surabaya. Darah

tersebut disimpan dalam wadah yang berisi es batu dengan suhu 2°C – 6°C agar tidak terjadi penggumpalan. Selanjutnya darah diletakkan pada tabung mikrosentrifus dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Setelah diinkubasi kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah proses tersebut, akan terbentuk gumpalan darah. Untuk memisahkan serum dari gumpalan tersebut adalah dengan mendekantasi dan tabung ditimbang kembali untuk menentukan berat gumpalan darah. Kemudian hasil fermentasi *Centella asiatica*, *Centella asiatica* non-fermentasi dan starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016 dimasukkan pada masing- masing tabung mikrosentrifus dan diberi label sebagai penanda. Kontrol yang digunakan pada uji aktivitas ini adalah streptokinase sebagai kontrol positif dan dapar fosfat sebagai kontrol negatif. Selanjutnya semua tabung diinkubasi pada suhu 37±1°C selama 90 menit. Setelah diinkubasi, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit sampai cairan dan gumpalan darah terpisah. Apabila cairan tidak terpisah, maka lakukan orientasi pada proses trombolitik selama 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit. Setelah proses orientasi, cairan yang berasal dari hasil lisis bekuan darah dibuang secara hati – hati dan kemudian tabung ditimbang kembali sebagai berat tabung setelah lisis. Pengukuran aktivitas trombolitik diukur berdasarkan % *clot lysis* yang dinyatakan dalam indeks trombolitik yang dibandingkan dengan standar streptokinase⁽¹⁹⁾.

Analisis Statistik

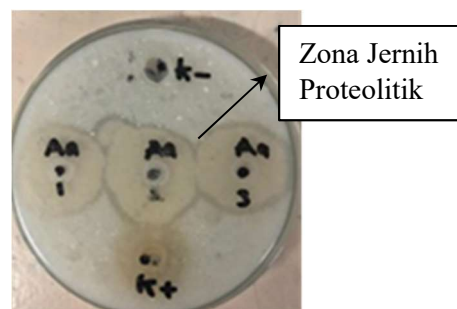
Data rata-rata 3 pengulangan dan 3 paralel untuk setiap pengulangan. Nilai rata-rata dan standar deviasi dihitung menggunakan perangkat lunak Microsoft Excel (Office 2013, Microsoft). Nilai rata-rata dibandingkan dengan menggunakan software statistik SPSS (SPSS versi 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Selanjutnya

dilakukan uji lanjut Duncan pada taraf kebermaknaan 0,05 untuk melihat perbedaan yang bermakna pada aktivitas trombolitik dan variasi waktu fermentasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Proteolitik pada Media Susu Skim Agar

Starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016, ekstrak *Centella asiatica*, dan hasil fermentasi *Centella asiatica* dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016 pada variasi waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam terlebih dahulu dilakukan uji aktivitas enzim proteolitiknya. Sampel diinokulasikan ke dalam media susu skim agar yang telah dilubangi masing-masing sebesar 7 mm, kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$ selama 24 jam dan diamati zona jernih di sekitar sumuran. Adanya aktivitas proteolitik ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih di sekitar sumuran (Gambar 1) yang menunjukkan kemampuan bakteri dalam menghidrolisis substrat menjadi peptida dan asam amino.



Gambar 1. Contoh hasil pengamatan zona jernih aktivitas enzim proteolitik pada *Acetobacter aceti* FNCC 0016

(Keterangan: Aa: *Acetobacter aceti*; + = kontrol positif; - = kontrol negatif).

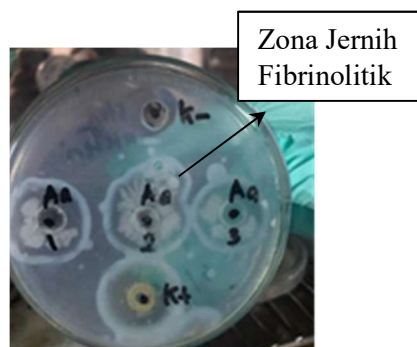
Dari hasil pengukuran diameter zona jernih (Tabel 1), diketahui bahwa seluruh sampel memiliki aktivitas proteolitik, aktivitas terbesar dimiliki oleh Starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016 dengan indeks proteolitik sebesar 3,99, sedangkan indeks trombolitik terbesar diantara hasil fermentasi *Centella asiatica* dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016 pada berbagai variasi waktu diperoleh pada waktu 0 jam sebesar 3,71.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas enzim proteolitik

Sampel	Rata-rata diameter zona jernih (mm) $\pm$ SD	Indeks Proteolitik
Starter <i>Acetobacter aceti</i> FNCC 0016	27,95 $\pm$ 2,63	3,99
Nattokinase	26,00	3,71
Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	14,91 $\pm$ 0,57	2,13
Fermentasi 0 jam	25,93 $\pm$ 1,24	3,71
Nattokinase	26,30	3,76
Fermentasi 24 jam	20,65 $\pm$ 1,26	2,95
Nattokinase	22,30	3,18
Fermentasi 48 jam	11,00 $\pm$ 0	1,57
Nattokinase	24,175	3,45
Fermentasi 72 jam	17,58 $\pm$ 2,07	2,51
Nattokinase	22,30	3,18

Uji Fibrinolitik pada Media *Fibrin Plate* Agar

Uji fibrinolitik dilakukan dengan menggunakan fibrin plate agar dalam dapar fosfat pH 7 dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu $37 \pm 1^\circ\text{C}$ untuk mengetahui aktivitas enzim fibrinolitik dari starter *Acetobacter aceti* FNCC 0016, ekstrak *Centella asiatica*, dan hasil fermentasi *Centella asiatica* dengan *Acetobacter aceti* FNCC 0016. Aktivitas enzim fibrinolitik dapat ditentukan oleh kemampuannya dalam menghidrolisis substrat fibrin yang ditunjukkan dengan adanya zona jernih di sekitar lubang (Gambar 2).



Gambar 2. Contoh hasil pengamatan zona jernih aktivitas enzim fibrinolitik pada *Acetobacter aceti* FNCC 0016

(Keterangan: Aa: *Acetobacter aceti*; + = kontrol positif; - = kontrol negatif).

Semakin besar aktivitas fibrinolitik, semakin besar zona jernih yang terbentuk⁽¹⁴⁾. Zona jernih dapat terlihat karena penambahan zat warna metilen biru, tanpa penambahan zat warna zona jernih hampir tidak terlihat pada media fibrin. Hasil uji aktivitas enzim fibrinolitik dinyatakan dalam indeks fibrinolitik (Tabel 2).

Uji Clot Lysis

Setelah diketahui memiliki enzim fibrinolitik, dilakukan uji clot lysis untuk mengetahui aktivitas agen trombolitik

sampel. Aktivitas agen trombolitik dinyatakan dalam indeks trombolitik. Indeks trombolitik adalah kekuatan agen trombolitik yang diukur berdasarkan perbandingan antara % clot lysis sampel dengan clot lysis standar yaitu nattokinase. Gambar 3 menunjukkan hasil fermentasi, terjadi lisis pada gumpalan darah sehingga menunjukkan adanya aktivitas trombolitik.



Gambar 3. Contoh hasil uji aktivitas trombolitik pada *Centella asiatica* hasil fermentasi oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016 selama 72 jam dengan metode clot lysis

(Keterangan K- = kontrol negatif; K+ = kontrol positif; 1 = replikasi 1; 2 = replikasi 2 dan 3 = replikasi 3).

Berdasarkan uji clot lysis, didapatkan indeks trombolitik hasil fermentasi *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016 pada variasi waktu 0 jam sebesar 43,89. Nilai tersebut menunjukkan adanya peningkatan dibanding indeks trombolitik ekstrak *Centella asiatica* yang hanya 42,93. Namun, pada fermentasi variasi waktu 24 jam, didapatkan penurunan indeks trombolitik menjadi 40,68, kemungkinan karena terjadi perubahan kondisi lingkungan yang menyebabkan stress pada bakteri, sehingga jumlah sel yang aktif mengalami penurunan. Fermentasi pada variasi waktu 48 jam kembali menunjukkan peningkatan menjadi 42,13

walaupun masih lebih kecil daripada fermentasi pada waktu 0 jam. Peningkatan pada waktu 48 jam menunjukkan bakteri sudah menyesuaikan diri dengan lingkungan dan berupaya mengembalikan pola metabolisme. Indeks trombolitik tertinggi didapatkan setelah fermentasi dilakukan selama 72 jam yaitu sebesar

91,49. Pada waktu fermentasi 72 jam bakteri berada di akhir fase logaritmik dan mulai memasuki fase stasioner, sehingga kemungkinan yang berperan tidak hanya enzim namun juga metabolit sekunder menyebabkan nilai indeks trombolitik naik secara signifikan.

Tabel 2. Hasil Uji Fibrinolitik

Sampel	Rata-rata diameter zona jernih (mm) $\pm$ SD	Indeks Fibrinolitik
Starter <i>Acetobacter aceti</i> FNCC 0016	24,32 $\pm$ 1,15	3,47
Nattokinase	22,10	3,16
Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	12,92 $\pm$ 1,48	1,84
Fermentasi 0 jam	23,48 $\pm$ 1,99	3,35
Nattokinase	22,00	3,14
Fermentasi 24 jam	17,29 $\pm$ 1,15	2,47
Nattokinase	19,10	2,73
Fermentasi 48 jam	11,75 $\pm$ 1,09	1,68
Nattokinase	21,08	3,01
Fermentasi 72 jam	17,95 $\pm$ 7,28	2,56
Nattokinase	28,05	4,00

Tabel 3. Hasil Uji Clot Lysis

Sampel	Rata-rata % Clot Lysis $\pm$ SD	Rata-Rata Indeks Trombolitik
<i>Acetobacter aceti</i> FNCC 0016	9,43 $\pm$ 1,74	19,99
Ekstrak <i>Centella asiatica</i>	20,24 $\pm$ 0,78	42,93
Hasil Fermentasi <i>Centella asiatica</i> 0 jam	20,69 $\pm$ 1,93	43,89
Hasil Fermentasi <i>Centella asiatica</i> 24 jam	19,18 $\pm$ 1,44	40,68
Hasil Fermentasi <i>Centella asiatica</i> 48 jam	19,87 $\pm$ 6,00	42,13
Hasil Fermentasi <i>Centella asiatica</i> 72 jam	43,14 $\pm$ 1,79	91,49
Nattokinase	47,15 $\pm$ 3,54	100,00

Data statistik

One way anova test dilakukan untuk mengetahui terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok data. Dari uji tersebut didapatkan bahwa data terdistribusi normal. Hasil menunjukkan adanya perbedaan bermakna rerata persen clot lysis *Acetobacter aceti* FNCC 0016, ekstrak *Centella asiatica*, dan hasil fermentasi *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016 pada berbagai variasi waktu. Dari hasil tersebut diketahui bahwa hasil fermentasi pada waktu 72 jam memiliki perbedaan yang paling signifikan dibanding hasil fermentasi pada variasi waktu lainnya.

SIMPULAN

Terdapat perbedaan bermakna rerata persen clot lysis *Acetobacter aceti* FNCC 0016, Ekstrak *Centella asiatica*, dan hasil fermentasi *Centella asiatica* oleh *Acetobacter aceti* FNCC 0016 pada berbagai variasi waktu. Dapat disimpulkan bahwa hasil fermentasi pada waktu 72 jam memiliki perbedaan yang paling signifikan dibanding hasil fermentasi pada variasi waktu lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini telah dipaparkan pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Ikatan Apoteker Indonesia tahun 2021.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chandrasekaran, S.D., Vaithilingam, M., Shanker, R., Kumar, S., Thiyur, S., Babu, V., Selvakumar, J.N., Prakash, S., 2015, Exploring the in vitro thrombolytic activity of nattokinase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS. *Jundishapur J Microbiol.*, Volume 8, pp. 1-7.
2. Kotb, E., 2013, Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Volume 97, pp. 6647-6665
3. Ali, R., Hossain, M.S., Islam, A., Arman, S.I., Golam, S.R., Prianka, D., Noshin, T.F., 2014, Aspect of thrombolytic therapy: A review. *ScientificWorldJournal.*, Volume 2014, pp. 1-6.
4. Peng, Y., Yang, X. and Zhang, Y., 2005, Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Volume 69, pp. 126-132.
5. Narasimhan, M. K., Chandrasekaran, M. and Rajesh, M.. 2015, Fibrinolytic enzyme production by newly isolated *Bacillus cereus* SRM-001 with enhanced in-vitro blood clot lysis potential. *Adv Appl Microbiol.*, volume 61, pp. 157-164.
6. Park, J., Yoon, S., Kim, S., Lee, B., Cheong, H., 2012, Characterization and fibrinolytic activity of *Acetobacter* sp. FP1 isolated from fermented pine needle extract. *J Microbiol Biotechnol.*, Volume 22, pp. 215-219.
7. Hossain, S., Islam, R., Sultana, S., Rahman, H., Bhowmick, A., 2018, Investigation of Thrombolytic and Antioxidant Potentials of *Centella Asiatica*. *Galore International Journal of Health Sciences and Research*, Volume 3, pp. 52-58.
8. Biswas, K., Azad, A. K., Sultana, T., Khan, F., Hossain, S., Alam, S., Chowdhary, R., Khatun, Y., 2017, Assessment of in-vitro cholinesterase inhibitory and thrombolytic potential of bark and seed extracts of *Tamarindus indica* (L.) relevant to the treatment of Alzheimer's disease and clotting disorders. *J Intercult Ethnopharmacol.*, Volume 6, pp. 115-19.
9. Ferdous, R.U., Azam, G., Hossain, D., 2014, Phytochemical Screening , in-Vitro Membrane Stabilizing and Thrombo- Lytic Activities of

- Lophopetalum Javanicum. *Int J Pharm Sci Res., Volume 5, pp. 350-353.*
10. Shahriar, M., Islam, Md.S., Islam, SM.A., Parvin., S., Afrin, N., 2013, Thrombolytic activity of Coriandrum sativum. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences. Volume 36, pp. 245-247.*
 11. Lopina, O. D., 2016, Enzyme Inhibitors and Activators Provisional chapter Enzyme Inhibitors and Activators. *InTech. Chapter 11.*
 12. Hussain, A., Bose, S., Wang, J.H., Kumar, M., Mahajan, G.B., Kim, H., 2016, Fermentation , a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. *Food Res Int., Volume 81, pp. 1-16.*
 13. Salamah, A., Srihardyastutie, A., Prasetyawan, S., Safitri, A., 2019, Influence of mixed cultures of saccharomyces cerevisiae and acetobacter aceti for hydrolysis of tannins in the cabbage fermentation (brassica oleracea l.var.capitata). *IOP Conference Series: Materials. Science and Engineering, Volume 546, pp. 1-6.*
 14. Zahoor, T., Siddique, F. and Farooq, U., 2006, Isolation and characterization of vinegar culture (Acetobacter aceti) from indigenous sources. *British Food Journal, Volume 108, pp. 429-439.*
 15. Madhusudhan, N. CH., Neeraja, P. and Devi, P., 2014, Comparative analysis of active constituents in centella asiatica varieties (Majjaposhak and Subhodak). *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, Volume 4, pp. 105-108.*
 16. Rosada, K. K., 2018, Enhanced acetic acid production from manalagi apple (Malus sylvestris mill) by mixed cultures of Saccharomyces cerevisiae and Acetobacter aceti in submerged fermentation. *J Phys Conf Ser., Volume 1013, pp. 1-7.*
 17. Ashipala, O.K., He, Qian., 2008, Optimization of fibrinolytic enzyme production by Bacillus subtilis DC-2 in aqueous two-phase system (polyethylene glycol 4000 and sodium sulfate). *Bioresour Technol., Volume 99, pp. 4112-19.*
 18. Poernomo, T. A., Isnaeni and Purwanto., 2013. Kajian potensi enzim fibrinolitik tempe hasil fermentasi Rhizopus oligosporus sebagai agen trombolitik dan antitrombotik. pp. 1-61.
 19. Ratnasooriya, W. D., Fernando, T. S. P. and Madubashini, P. P., 2008. In vitro thrombolytic activity of Sri Lankan black tea, Camellia sinensis (L.) O. Kuntze. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, Volume 36, pp. 179-181.*