PURIFIKASI PARSIAL ENZIM FIBRINOLITIK TEMPE KACANG KORO (*Canavalia ensiformis)* PRODUK FERMENTASI *Rhizopus oryzae* FNCC 6078

ACHMAD TOTO POERNOMO, SUDJARWO, RAISSA ARDINTA PARASATI
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

ABSTRACT

In this work, tempeh of Canavalia ensiformis that fermented by Rhizopus oryzae FNCC 6078 was used as a source of fibrinolytic enzyme. This enzyme could provide clinical application for blood clot removal. That fibrinolytic enzyme was extracted by blending and liofilization. The crude enzyme extract was assaying in fibrin plate agar showing fibrinolytic activity. Partial purification of the crude enzyme extract was performed by two steps, i.e., by ammonium sulphate fractionation followed by gel filtration chromatography using sephadex G-100 as stationary phase. The fibrinolytic activity were evaluated at each step of purification. Fibrinolytic enzyme obtained from 50-70% ammonium sulfate fraction had the highest spesific activity 6,6 x 10^{-2} U/mg; 10,0 x 10^{-2} U/mg; dan 23,8 x 10^{-2} U/mg. There was no significant difference between spesific activity of sample before and after partial purification.

***Keywords** : Chromatography filtration, Partial purification, Rhizopus oryzae, Canavalia ensiformis Tempe.*

PENDAHULUAN

Enzim fibrinolitik adalah enzim yang dapat digunakan untuk memecah fibrin pada terapi trombus (penyakit kardiovaskular). Agen terapi trombus yang saat ini digunakan secara luas umumnya mahal dan memiliki efek samping yang tidak diinginkan seperti perdarahan internal dalam saluran cerna. Karena itulah penelitian mengenai enzim fibrinolitik yang aman terus diupayakan.

Enzim fibrinolitik yang telah banyak diteliti salah satunya berasal dari mikroorganisme berstandar pangan, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai makanan fungsional dan obat yang berkhasiat untuk pencegahan maupun pengobatan suatu penyakit (Kotb., 2012; Rashad *et al*., 2012). Makanan asal Jepang, natto, yang berbahan dasar kedelai hasil fermentasi *Bacillus natto* telah terbukti mampu menghasilkan protease yang memiliki aktivitas trombolitik (Sugimoto *et al*.,2007). Sama halnya dengan natto, tempe yang juga merupakan makanan hasil fermentasi yang berbahan dasar kedelai telah terbukti memiliki efek fibrinolitik yang kuat (Yoon *et al*., 2002). Sayangnya, selama beberapa tahun telah terjadi penurunan produksi kedelai yang berakibat pada meningkatnya ketergantungan impor terhadap kedelai dimana sebanyak 80% kedelai yang tersedia dialokasikan untuk bahan baku industri tempe dan tahu (BPS., 2011). Untuk mengatasi hal tersebut maka diupayakan penggunaan kacang lain sebagai alternatif bahan baku tempe seperti kacang koro.

Kacang koro (*Canavalia ensiformis*) dapat digunakan sebagai pengganti kedelai karena memiliki nilai nutrisinya yang setara dengan kacang kedelai. Selain itu ditinjau dari segi agroekonomi, kacang koro dapat tumbuh di lahan marginal sehingga dalam proses budidaya tidak perlu bersaing memperebutkan lahan subur (Litbang, 2014).

Enzim fibrinolitik yang terkandung di dalam tempe kacang koro perlu dipurifikasi parsial untuk meningkatkan aktivitas spesifiknya. Purifikasi parsial merupakan tahap purifikasi awal dari enzim target yang bertujuan untuk pemekatan konsentrasi enzim. Purifikasi parsial enzim dapat dilakukan melalui pengendapan protein (enzim fibrinolitik) yang dilanjutkan dengan kromatografi filtrasi gel. Pengendapan protein bertujuan untuk memisahkan protein dengan komponen non protein dalam tempe kacang koro. Pengendapan protein secara *salting out* dengan penambahan ammonium sulfat sering digunakan karena ammonium sulfat tersedia dalam bentuk murninya dalam harga yang relatif terjangkau, kelarutannya yang tinggi, serta tidak menyebabkan denaturasi protein. Konsentrasi ammonium sulfat yang ditambahkan untuk mendapatkan aktivitas spesifik enzim fibrinolitik yang maksimum bervariasi untuk setiap mikroorganisme. Karenanya diperlukan optimasi kadar ammonium sulfat untuk menghasilkan aktivitas spesifik enzim fibrinolitik yang maksimum (Roe., 2001)

Hasil dari proses pengendapan protein diperoleh endapan campuran antara garam ammonium, protein enzim dan protein non enzim lainnya. Untuk memisahkannya maka dilakukan kromatografi filtrasi gel. Melalui kromatografi filtrasi gel, kemurnian enzim akan meningkat diikuti dengan peningkatan aktivitas spesifiknya. (Roe., 2001; Wilson and walker., 2010).

Berdasarkan paparan diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai purifikasi parsial enzim fibrinolitik yang diproduksi dari tempe berbahan dasar kacang koro. Diharapkan melalui purifikasi parsial terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim fibrinolitik dari tempe kacang koro.

METODE PENELITIAN

Bahan:

Kacang Koro (*Canavalia ensiformis*) dari PT. Bio Max Java Corporation Jember, Jawa Timur, Jamur strain *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 koleksi Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada, nattokinase NSK II 100 mg Co Q-10 30 mg dari Lapo, serbuk PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) CM0139 dari Oxoid, NaCl p.a dari Merck, Aquadest, Tris HCl (Molecular Biology Grade) pH 4,2-4,9 dari Vivantis, KH_2PO_4 p.a dari Merck, K_2HPO_4 p.a dari Merck, HCl p.a dari Sigma-Aldrich, $Na_2B_4O_7$, amonium sulfat dari Sigma-Aldrich, fibrin bovine blood dari SIMAGCHEN, bradford diperoleh dari Sigma-Aldric, tyrosin dari Sigma Aldrich, sephadex G-100 dari Sigma Aldrich, agarosa dari Nacalai Tesque, BSA (*Bovine Serum Albumine*) diperoleh dari Sigma-Aldrich, TCA (Tri Chloro Acetic Acid) *for analysis* dari Merck, Metilen *blue* dari May and Baker, alkohol 70% teknis.

Alat:

Autoclave elektrik HL-340 Series Vertical Type Steam Sterilizer, timbangan Digital Sartorius type BP 221S, timbangan analitik OHAUS corp. Pine Brook, USA, kulkas, *laminar air flow cabinet* San-EI Sei Sakusho tipe PCV-750 APG no.1252, inkubator Memmert, Vortex Barnstead Thermolyne Type 37600 Mixer, spektrofoto- meter Genesys-20, kolom kromatografi, pH meter Fisher Versamix, *magnetic stirrer*, *refrigerated ultracentrifuge* Z 36 HK Hermle Labortechnik *centrifuge* Hettich Zentrifugen EBA 20, spektrofotometer HP 8452 a, *socorex* 50-200 µL Dragon Onemed, *socorex* 100-1000 µL Biohit Proline.

Metode Kerja:

1. **Determinasi Jamur *Rhizopus orizae dan determinasi kacang Koro***

Determinasi jamur yang digunakan dalam pembuatan tempe dilakukan oleh Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada.

Determinasi kacang koro sebagai bahan baku tempe dibantu oleh Unit Layanan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

2. Pengukuran Kadar Air Kacang Koro

Timbang saksama 10 g kacang, dalam wadah yang telah ditara. Keringkan pada suhu 105^{o}C selama 5 jam dan timbang. Lanjutkan pengeringan dan timbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbangan berturut – turut tidak lebih dari 0,25% (Depkes RI., 1995).

3. Pembuatan Media

Timbang sebanyak 3 g PDA serbuk, masukkan kedalam 1L aquadest dan aduk hingga larut. Panaskan larutan PDA hingga mendidih (±15 menit). Masukkan larutan PDA ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 12 mL. Tutup ujung tabung dengan kapas berlemak dan sterilisasi dengan autoclaf 121^{0}C selama 15 menit, kemudian miringkan.

4. Kultur

Sebanyak satu ose strain jamur *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 diinokulasikan pada media agar miring PDA yang kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 30^{o}C selama 72 jam. (Metode ini dimodifikasi dari Sher *et al*., 2011).

5. Pembuatan Suspensi Spora

Sebanyak10 mL NaCl 0,9% steril ditambahkan kedalam tabung inokulum, kemudian divortex sampai spora jamur terlepas dari medianya (± 45 menit), dan didiamkan hingga terpisah antara endapan dan suspensi jernih di atasnya. Proses ini dilakukan dibawah kondisi steril (Metode ini dimodifikasi dari Sher *et al*., 2011).

6. Pembuatan Tempe secara Aseptis

Kacang koro di sortir terlebih dahulu, dicuci dengan aquadest steril yang bersih, rendam dengan aquadest (1:3 b/v) selama 24 jam. Setelah kulit kacang koro lunak, kupas (*dehuled)* dengan tangan, dan potong sama besar. Setelah dicuci, kacang koro direbus kembali dengan air (1:4, b/v) selama 15 menit untuk membuat suasana asam. Selanjutnya dikeringkan dan didinginkan pada suhu kamar. Timbang sebanyak 500 gram per wadah, tambahkan suspensi dari inokulum *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 sebanyak 20 mL dengan cara disemprotkan ke dalam petri disk. Inkubasi dalam inkubator bersuhu 30^0C selama 46 jam (Metode ini dimodifikasi dari Egounlety, *et al*., 2003).

7. Pembuatan Ekstrak Kasar

Sebanyak 500,0 g tempe ditimbang dan diekstraksi dengan buffer phospat 0,05 M pH 5 sebanyak 1 liter menggunakan *blender*. Ekstrak selanjutnya disentrifugasi 9000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4^0C. Kumpulkan supernatan, yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas *crude enzyme*, dan parsial purifikasi (Metode ini dimodifikasi dari Michail, *et al*., 2012).

8. Uji Aktivitas Fibrinolitik (Fibrin Plate)

Fibrin plate dibuat dengan mencampur 0,3 gram fibrin dan 1,7 gram agar dalam 100 mL asam borat pH 7,8. Tambahkan 200 µL metilen blue pada cawan petri (diameter 5,5 cm). Tuang sebanyak 10 mL larutan pada cawan petri. Plate didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang hingga agar memadat. Buat sebanyak 5 lubang (diameter 7 mm), tuang 30 µL sampel ke dalam lubang, inkubasi pada 32ºC selama 24 jam (Metode ini dimodifikasi dari Ashipala *et al*., 2007).

9. Purifikasi Parsial Ekstrak Kasar (Pengendapan dengan Amonium Sulfat)

Crude enzyme diendapkan dengan menambahkan amonium sulfat ($(NH_4)_2S0_4$) pada berbagai tingkat kejenuhan yaitu 0-30 %, 30-50 %, dan 50-70 %. Tambahkan amonium sulfat ($(NH_4)_2S0_4$) sedikit demi sedikit sembari terus diaduk. Proses ini dilakukan pada suhu 0-4^0C selama 1 jam. Fraksi yang telah diaduk tersebut, kemudian didiamkan selama 24 jam di dalam refrigerator pada suhu ± 4^0C. Fraksi selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 30 menit pada suhu 4^0C. Endapan yang terbentuk dilarutkan kembali dengan buffer fosfat 0,05 N pH 5,0. (Modifikasi dari Moore dan Stein., 1954 diacu dalam Kim *et al*., 2002)

10. Purifikasi Parsial dengan Kromatografi Gel Filtrasi

Metode pengembangan matriks sephadex G-100, packing, dan pencucian kolom sesuai dengan metode yang tertera pada GE Lifescience., 2014

11. Uji Aktivitas Enzim

Dua tabung reaksi disediakan untuk pengujian yang terdiri atas blanko dan sampel. Kedalam setiap tabung dimasukkan 1 mL 0,05 M bufer fosfat pH 5,0 , kemudian dimasukkan substrat yang berupa 1 mL fibrin (3% b/v). Untuk sampel ditambahkan 1 mL enzim, blanko diisi dengan 1ml buffer fosfat 0,05M pH 5,0. Campuran dikocok sampai homogen lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Reaksi enzim dihentikan dengan penambahan 2 mL asam trikloro asetat (TCA) 10%. Sentrifuse 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diukur absorbannya pada panjang gelombang 280 nm. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan dalam kurva standard tirosin untuk menentukan unit aktivitas enzim yang terkandung dalam sampel enzim. (Modifikasi dari Metode Walter., 1984)

12. Pengukuran Konsentrasi Protein (Metode Bradford) (Hamnond dan Krager 1988 diacu dalam Walker 1988)

Pengukuran konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford dengan mereaksikan 20 µL larutan sampel enzim yang kemudian ditambahkan 1 mL larutan Bradford, dan selanjutnya diinkubasi selama lima belas menit. Ukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan ke dalam kurva standar BSA untuk menentukan konsentrasi protein yang terkandung dalam sampel enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tempe yang baik akan dihasilkan dari bahan baku yang bermutu. Menurut Herawati (2008), penurunan mutu biji kacang dapat terjadi melalui

mekanisme penyerapan uap air yang dapat menyebabkan peningkatan kadar air pada biji kacang. Kadar air akan mempengaruhi perubahan kandungan kimia serta jumlah mikroba yang terkandung didalamnya. Selain itu, kadar air dapat menjadi indikator ketahanan kacang koro selama penyimpanan jangka lama dan selama proses pengangkutan (Abitogun *et al*., 2012). Pada penelitian ini uji kadar air (Tabel 1) kacang koro dilakukan sebelum pembuatan tempe. Dari hasil penelitian, diperoleh nilai rata – rata kadar air sebesar 10,0500 ± 0,2624 % b/b. Gandjar et al (1977) membuat tempe yang sama dari kacang koro (*Canavalia ensiformis*) dengan kadar air sebesar 10,8 % b/b. Perbedaan nilai kadar air dari kacang koro yang digunakan dapat disebabkan oleh faktor lingkungan pada saat penanaman yang sangat berpengaruh pada mutu tanaman (Heliati., 1999). Faktor lingkungan tersebut diantaranya adalah iklim dan kesuburan tanah.

Tabel 1 Uji kadar air kacang koro

Replikasi	Berat kacang koro awal (g)	Berat susut pengeringan (g)	Kadar air kacang koro (% b/b)
I	10,0619	1,0104	10,0418
II	9,9666	1,0282	10,3164
III	10.2810	1,0067	9,7918
	SD		0,2624
Rata – rata kadar air kacang koro			10,0500 ± 0,2624

Jamur pemfermentasi merupakan salah satu komponen penting dalam pembuatan tempe. Dari hasil penelitian, biakan jamur *Rhizopus oryzae* yang ditumbuhkan pada media agar miring PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) menghasilkan koloni jamur dengan bentukan miselia seperti kapas yang berwana putih yang tumbuh pada permukaan agar miring PDA (Gambar 1). Bentukan tersebut sudah dapat teramati setelah 24 jam inkubasi pada 32^{o}C. Sama halnya dengan penelitian Wang, P (2013) yang melakukan pengamatan morfologi jamur *Rhizopus oryzae*, dimana jamur tersebut memiliki warna putih terang pada media PDA setelah 22 jam inkubasi. Dalam penelitian tersebut juga disebutkan bahwa dibandingkan pada media lain (media ekstrak gandum, *Czapek Bran Medium*, Czapek Medium, dan media tunas kacang) jumlah koloni dan morfologi *Rhizopus oryzae* paling baik tumbuh pada media PDA.

Gambar 1. Kultur *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 setelah diinkubasi selama 72 jam

Pada penelitian ini, proses fermentasi dilakukan selama 46 jam untuk mendapatkan massa tempe yang baik dengan bentukan yang padat (Gambar 2). Massa tempe yang baik ditandai dengan tumbuhnya jamur diseluruh permukaan kacang, sehingga butiran kacang saling merekat satu sama lainnya dan tidak mudah rapuh. Bentukan tersebut telah sesuai dengan massa tempe yang dihasilkan dari kacang kedelai yang difermentasi oleh *Rhizopus oryzae*. Pada tempe kedelai difermentasi dengan *Rhizopus oligosporus*, masa tempe kedelai yang padat dihasilkan pada 24 jam fermentasi, namun bentukan yang lebih kompak terjadi setelah 48 jam fermentasi (Handoyo et al., 2006). Perbedaan lama fermentasi tersebut dapat disebabkan karena media fermentasi serta spesies jamur yang digunakan berbeda. Lama fermentasi sangat tergantung dari karakteristik protein sebagai sumber energi jamur serta enzim proteolitik yang dihasilkan oleh jamur yang memfermentasi. Jumlah dan jenis substrat yang terkandung dalam media fermentasi akan menentukan kecepatan penyebaran miselia jamur dan pembentukan produk hasil hidrolisis protein oleh enzim (Handoyo et al., 2006).

Gambar 2. Tempe kacang koro setelah inkubasi 46 jam

Adanya aktivitas fibrinolitik dari enzim yang dihasilkan dari tempe kacang koro dapat dilihat dengan melakukan uji fibrin plate (Gambar 3). Dari hasil uji (Tabel 2), ketiga ekstrak kasar tempe menghasilkan zona jernih pada fibrin plate dengan diameter zona jernih yang dihasilkan oleh ketiga ekstrak kasar tersebut berturut –turut adalah 3,40 mm; 3,20 mm; dan 2,80 mm. Sedangkan pada nattokinase sebagai kontrol positif, diameter zona jernih yang dihasilkan adalah 20,0 mm. Perbedaan pada zona jernih yang dihasilkan tersebut salah satunya dapat disebabkan karena perbedaan pada tingkat kemurnian enzim yang digunakan, dimana enzim nattokinase yang digunakan lebih murni dibandingkan dengan ekstrak kasar tempe. Pada penelitian Rovati, *et al* (2009) yang menggunakan metode yang sama pada pengukuran aktivitas enzim fibrinolitik pada isolat enzim dari jamur *Bionectria* sp zona jernih yang dihasilkan dari uji fibrin plate adalah 66,7 mm^2; 21,9 mm^2; dan 58,3 mm^2. Zona jernih enzim fibrinolitik dari jamur Bionectria sp lebih besar dibandingkan dengan enzim pada ekstrak kasar tempe. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas fibrinolitik isolat enzim dari jamur *Bionectria* sp lebih besar dibandingkan dengan aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim fibrinolitik dari tempe koro hasil fermentasi *Rhizopus sp*. Perbedaan tersebut lumrah terjadi karena mikroorganisme yang berbeda akan menghasilkan enzim fibrinolitik dengan potensi aktivitas yang berbeda pula.

Gambar 3. Hasil uji fibrin plate ekstrak kasar tempe *Canavalia ensiformis* hasil fermentasi *Rhizopus oryzae* FNCC 6078, dimana (1) Sampel ekstrak kasar 1 (2) Sampel ekstrak kasar 2 (3) Sampel ekstrak kasar 3 (4) Kontrol negatif (ekstrak kacang koro) (5) Kontrol positif (Nattokinase)

Tabel 2. Uji fibrin plate

Lubang	Diameter zona jernih (mm)	Diameter lubang (mm)	Diameter lisis enzim proteolitik (mm)
1	10,40	7,00	3,40
2	10,20	7,00	3,20
3	9,80	7,00	2,80
4	-	7,00	-
5	20,00	7,00	13,00

Selain menggunakan metode fibrin plate, aktivitas enzim fibrinolitik dapat diekspresikan sebagai jumlah tirosin yang dilepaskan dari klot fibrin (Rovati *et al*., 2009). Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang membebaskan satu mikromol tirosin per mL enzim per menit dibawah kondisi pengujian (Rashad *et al*., 2012). Pada penelitian ini, kurva baku tirosin dijadikan standar pada pengujian aktivitas fibrinolitik. Dari hasil penelitian, diperoleh persamaan regresi y = 0,007x + 0,009 dengan nilai koefisien korelasi (r) = 0.997 (p= 0,000; p< 0,001). Penentuan aktivitas enzim didasarkan pada perubahan spesifik baik pada enzim itu sendiri maupun pada produk yang terbentuk (Roe.,2001). Kecepatan reaksi enzim diukur dari banyaknya substrat yang di ubah menjadi produk dan mengukurnya dalam satuan unit waktu dibawah kondisi yang spesifik. Nilai aktivitas spesifik enzim didapatkan dengan membandingkan aktivitas enzim terhadap kadar protein total dalam ekstrak. Kadar protein diukur dengan metode bradford menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumine*) sebagai standar. Dari hasil penelitian diperoleh

persamaan regresi y= 0,001x + 0,174 dan nilai koefisien korelasi (r) = 0,991 (p =0,000; p<0,01). Melalui perhitungan aktivitas spesifik akan didapatkan informasi penting mengenai banyaknya substrat yang diubah menjadi produk yang dinyatakan dalam satuan konsentrasi (µmol), waktu reaksi, dan jumlah protein (mg) dalam campuran. Untuk analisis kemurnian, aktivitas spesifik merupakan indikator kemurnian disetiap tahapan pemurnian. Proses pemurnian yang efektif akan menghasilkan peningkatan yang tinggi pada nilai aktivitas spesifiknya.

Dalam penelitian ini, purifikasi parsial bertujuan untuk meningkatkan kemurnian enzim fibrinolitik tempe sehingga didapatkan nilai aktivitas spesifik yang lebih tinggi dari ekstrak kasarnya. Berdasarkan hasil perhitungan (Tabel 3), aktivitas spesifik enzim fibrinolitik paling besar diperoleh pada fraksi pengendapan ammonium sulfat dengan kadar kejenuhan 50-70% dengan aktivitas spesifik sebesar 6,6 x 10^{-2} U/mg; 10,0 x 10^{-2} U/mg; dan 23,8 x 10^{-2} U/mg. Aktivitas spesifik tersebut cenderung mengalami peningkatan bila dibandingkan dengan ekstrak kasarnya yang memiliki aktivitas spesifik sebesar 5,3 x 10^{-2} U/mL; 8,8 x 10^{-2} U/mL; dan 7,8 x 10^{-2} U/ mL. Walaupun demikian, berdasarkan olah statistik menggunakan SPSS 20, tidak terjadi peningkatan yang bermakna antara ekstrak kasar dengan hasil pengendapan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 50-70% (p = 0,271 ; p>0,05). Berbeda dengan penelitian yang dilakukan Kim *et al*., 2006 yang memurnikan tempe kacang kedelai hasil fermentasi *Bacillus subtilis* TP-6, aktivitas fibrinolitik hasil purifikasi parsial menggunakan ammonium sulfat pada tingkat kejenuhan 40-70% meningkat 12 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Peningkatan aktivitas spesifik yang signifikan mencerminkan proses purifikasi yang efisien. Selain itu, aktivitas enzim juga sangat tergantung dengan stabilitas dari enzim target. Selama proses purifikasi berlangsung, faktor yang mempengaruhi stabilitas enzim seperti pH dan suhu harus diperhatikan untuk menghindari hilangnya aktivitas enzimatis selama proses.

Tabel 3 Uji aktivitas spesifik

Sampel	Replikasi	Aktivitas fibrinolitik (X10^{-2}U/ml)	Konsentrasi Protein Total (mg/ml)	Aktivitas spesifik (X10^{-2}U/mg)	Rata- Rata (X10^{-2}U/mg)
Ekstrak Kasar 1	1	3,1	0,5	6,2	5,3
	2	3,5	0,8	4,4	
Ekstrak Kasar 2	1	3,2	0,3	10,7	8,8
	2	3,0	0,4	6,8	
Ekstrak Kasar 3	1	2,7	0,4	6,8	7,8
	2	3,5	0,4	8,8	
A_1	1	3,1	0,5	6,2	8,1
	2	4,0	0,4	10,0	
A_2	1	2,3	0,5	4,6	4,4
	2	2,1	0,5	4,2	
A_3	1	1,8	0,5	3,6	3,6
	2	2,1	0,6	3,5	
B_1	1	0,6	0,1	6	0,8
	2	0,7	0,8	0,9	
B_2	1	0,3	0,6	0,5	0,6
	2	0,3	0,5	0,6	
B_3	1	1,7	0,4	4,2	4,2
	2	1,7	0,4	4,2	
C_1	1	3,3	0,7	4,7	6,6
	2	3,4	0,4	8,5	
C_2	1	5,3	1,0	5,3	10,0
	2	4,4	0,3	14,7	
C_3	1	4,6	0,4	11,5	23,8
	2	3,6	0,1	36	

Pada penelitian ini, suhu lingkungan selama proses pengendapan sangat sulit dikendalikan sehingga aktivitas enzim menjadi rendah. Selain itu, rendahnya peningkatan nilai aktivitas spesifik enzim juga dapat disebabkan karena penambahan kadar kejenuhan ammonium sulfat yang belum optimal.

Enzim yang dihasilkan dari mikroorganisme yang berbeda akan memiliki kelarutan yang berbeda dan dapat diendapkan dengan penambahan kadar garam (ammonium sulfat) yang berbeda pula. Protein hidrofobik akan mengendap pada penambahan ammonium sulfat pada kadar rendah. Sebaliknya, protein yang lebih hidrofil akan mengendap dengan penambahan kadar ammonium sulfat yang lebih tinggi (Roe., 2001; Scopes., 2002).

Enzim fibrinolitik hasil pengendapan dengan ammonium sulfat masih perlu dimurnikan lagi menggunakan kromatografi filtrasi untuk menghilangkan sisa garam dari fraksi. Dari hasil penelitian setelah dilakukan fraksionasi selama 600 menit (10 jam), fraksi hasil kromatografi memiliki panjang gelombang maksimum pada 256 nm. Panjang gelombang tersebut terlampau jauh bila dibandingkan dengan panjang gelombang tirosin (276 nm) sebagai standar, sehingga hasil yang diperoleh tidak dapat dikuantifikasi. Hal ini memunculkan dugaan bahwa fraksi yang tereluasi bukanlah enzim fibrinolitik yang dimaksud. Pada penelitian Chen et al (2013) yang memurnikan enzim fibrinolitik yang berasal dari makanan tradisional Cina, douche, dengan teknik kromatografi filtrasi didapatkan bahwa enzim fibrinolitik dapat tereluasi pada menit ke-480 (8 jam). Pada penelitian tersebut, sephadex G-50 digunakan sebagai fase diam. Berbeda dengan penelitian tersebut, pada penelitian ini fase diam yang digunakan untuk kromatografi filtrasi fraksi hasil pengendapan tempe kacang koro adalah sephadex G-100. Sephadex G-100 memiliki pori yang lebih besar dibandingkan dengan sephadex G-50. Sebagai akibatnya, molekul enzim fibrinolitik yang dikromatografi filtrasi menggunakan fase diam sephadex G-100 terjebak di dalam pori fase diam. Hal tersebut menyebabkan diperlukannya waktu yang lebih lama untuk eluasi dengan penggunaan sephadex G-100 sebagai fase diam. Enzim fibrinolitik yang dihasilkan dari tempe kacang koro akan memiliki sifat dan ukuran molekul yang berbeda dengan enzim fibrinolitik dari douche. Pemilihan rentang fraksionasi dan fase diam yang salah akan menyebabkan proses pemisahan enzim menjadi buruk. Semakin besar ukuran pori fase diam maka semakin besar kemungkinan protein terjebak didalam pori. Faktor lain yang mungkin berpengaruh pada pemisahan enzim fibrinolitik melalui kromatografi filtrasi adalah tingginya kadar garam dalam sampel yang menyebabkan enzim fibrinolitik terendapkan, packing kolom yang buruk, serta komponen sampel (enzim fibrinolitik) yang dapat berubah (rusak) atau terendapkan selama penyimpanan di dalam kolom (Ahmed., 2005). Pada penelitian ini kromatografi filtrasi dilakukan pada suhu ruang (± 25^{o}C). Sementara itu proses eluasi yang dilakukan selama 10 jam memungkinkan terjadinya kerusakan enzim selama proses. Kebanyakan enzim yang berasal dari sel memiliki karakteristik yang labil. Hilangnya aktivitas enzim akan sejalan dengan peningkatan suhu dan lamanya paparan. Karena itulah bekerja secara cepat pada ruangan bersuhu dingin (*cold room*) sangat diperlukan dalam penanganan enzim. Penggunaan suhu rendah (5^{o}C) dapat memperlambat proses degradasi enzim (Roe., 2001)

KESIMPULAN

Tempe kacang koro (*Canavalia ensiformis*) hasil fermentasi *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 menghasilkan enzim fibrinolitik.

Tidak terjadi peningkatan aktivitas spesifik enzim fibrinolitik tempe kacang koro (*Canavalia ensiformis*) hasil fermentasi *Rhizopus oryzae* FNCC 6078 setelah dilakukan purifikasi parsial (pengendapan ammonium sulfat).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA BOPTN Tahun Anggaran 2013 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi No : 7673/UN3/KR/2013, tanggal 2 Mei 2013.

DAFTAR PUSTAKA

Abitogun., Olasehinde, E.F., 2012. Nutritional evaluation of seed and characterization of crude jack bean (*Canavalia ensiformis*) oil. ***IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSRJAC)***, Vol. 1, Issue 6, pp. 36-40

Ahmed, H. 2005. ***Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization***. United States of America: CRC Press

Anbu, P., Gopinath, S. B. C., Cihan, A.C., Chaulagain, B. P., 2013. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. ***BioMed Research International***, Vol 2013 (2013), Article ID 204014

Badan Pusat Statistik. Data Strategis BPS. Diakses dari http://www.bps.go.id/65tahun/data_strategis_2012.pdf, pada tanggal 16 Agustus 2014

Badan Standarisasi Nasional. 2012. ***Tempe: Persembahan untuk Indonesia***. Badan Standarisasi Nasional

Chen, B., Huo, J., He, Z., He, Q., Hao, Y., Chen, Z., 2013. Isolation and identification of an effective fibrinolytic strain Bacillus subtilis FR-33 from Chinese doufuru and primary analysis of its fibrinolytic enzyme. ***African Journal of Microbiology Research***, Vol. 7 (19), pp.2001-2009

Gandjar, I., Slamet, D. S., Sukiswati, D., Somali, L., 1979. A Preliminary study on fermentation of *Canavalia ensiformis* seeds. ***Bulletin of Health Research***, Vol. 7, No. 1, ISSN: 0125-9695

Handoyo, T., Morita, N., 2006. Structural and functional properties of fermented soybean (tempeh) by using *Rhyzopus oligosporus.* ***International Journal of Food Properties***,9, pp. 347-355

Heliati, I., 1999. ***Kandungan Protein dan Fosfor pada Spesies Leguminosa (Kacang – Kacangan) yang Ditanam pada Tanah Ciawi, Kupang, dan Grati***. Bogor: Balai Penelitian Ternak Ciawi

Herawati, H., 2008. ***Penentuan Umur Simpan pada Produk Pangan***. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Tengah

Koro pedang (*Canavalia ensiformis*) mampu damping kedelai. Diakses dari http://pascapanen.litbang.deptan.go.id/index.php/id/berita/257, pada tanggal 18 Agustus 2014

Kotb, E., 2012. ***Fibrinolytic Bacterial Enzyme with Trombolytic Activity***. Springer Heidelberg Dordrecht

Mine, Y., Wong, K.H.A., Jiang, B., 2005. Fibrinolytic enzymes in asian traditional fermented foods. ***Food Research International***, vol 38, pp. 243-250

Rashad, M.M., Mahmoud, A.E., Al-Kashef, A.S., Nooman, M.U., 2012. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme by *Candida guilliermondii* grown on sun flower oil cake. ***Journal of Applied Science Research*** 8 (2), pp. 635 – 645

Roe, S., 2001. ***Protein Purification Techniques***, Ed. 2nd. New York : Oxford University Press

Rovati, J.L., Delgado, O.D., Figueroa, L.I.C., Farifia, J.I., 2009. A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria sp* an unconventional enzyme-producing fungus isolated from las yungas rainforest (tucuman, argentina). ***World J. Microbiol Biotechnol*** 26, pp. 55-62

Scopes, R.K., 2002. ***Enzyme Activity and Assays***. Mcmillan Publishers Ltd

Sugimoto, S., Fuji, T., Morimiya, T., Johdo, O., Nakamura, T., 2007. The Fibrinolytic Activity of a Novel Protease Derived from Tempeh Producing Fungus, *Fusarium* sp. BLB.***Biosci Biotechnol Biochem.,*** 71, 70153-1-6

Wang, P., Zhang, F.Y., MaohuaQu., 2013. Study on the novel strain *Rhizopus oryzae* ATCC 2809's growth and fermentation. ***International Journal of Scientific Engineering and Research***, Vol 1, Issue 3

Wilson., Walker., 2010 ***Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology***. 7th Ed. New York: Cambridge University Press, pp. 307-326, 462-465

Yoon., Joo, S., Yu, M., Sim, G., Kwon, S., Hwang, J., Shin, J., Yeo, I., Pyun, Y., 2002. Screening and characterization of microorganisms with fibrinolytic activity from fermented foods. ***J. Microbiol Biotechnol*** 12 (4), pp.649-656