

TERAPI TROMBOLISIS-ENDOGEN DENGAN DIET NATTO BERBASIS
KACANG-KACANGAN LOKAL INFERIOR PADA MODEL TIKUS
(*Rattus norvegicus*) ATEROGENIK

*Therapy of Endogenous Thrombolysis with Dietary Natto Based on
Inferior Local Beans in Atherogenic Rat (*Rattus Norvegicus*) Model*

Nur Kholis^{1*} dan Veni Ardini Dewi Yanti²

¹ Ma Chung Research Centre for Photosynthetic Pigment, Universitas Ma Chung, Malang

²CV Iswara Pakis-Malang

*Email: nurkholis_foodtech@yahoo.com Telp. + 62 8563 6161 51

ABSTRACT

Natto is a fermented food from soybean that produce nattokinase enzyme with high thrombolytic activity. Soybean as raw material for making natto, however is a kind of superior bean which is 68% of national necessary come from imported soybean. Therefore, we need to explore the potency of inferior local beans i.e. brown cowpea, white cowpea, and "komak" bean as soybean substitute for making natto. The aim of this research was to study the effects of using inferior beans as substrate of natto fermentation on in vivo thrombolytic activity. The result showed that diet of natto from inferior beans were significantly different ($P<0.05$) on decreasing of serum cholesterol, serum MDA (malonaldehyde), foam cell of aorta, and on increasing of endothelial cell of aorta compared to atherogenic rats group without natto diet. However, it was not significantly different ($P>0.05$) on all parameters compared to soy-natto diet (product control). It means that inferior beans were able to substitute soybeans as raw material for making a functional natto. White cowpea natto showed the best thrombolytic activity in atherogenic rats among other inferior beans with the highest nattokinase activity of 86.4 FU/g.

Keywords: thrombolysis therapy, natto, inferior beans, atherogenic rat

PENDAHULUAN

Stroke yang merupakan gangguan klinis yang disebabkan oleh hilangnya fungsi otak akibat terhambatnya suplai darah ke otak, telah menjadi penyebab kematian ketiga di Indonesia. Tercatat sedikitnya 650.000 kasus *stroke* baru dilaporkan setiap tahunnya dan sekitar 150.000 pasien mengalami kematian akibat penyakit ini (Kurniasih, 2003). Dari data tersebut sekitar 79,9% merupakan penderita *stroke* non hemoragik yang mengalami penyumbatan pada pembuluh darah otak akibat adanya bekuan darah (*thrombus*) dengan diawali oleh proses pengerasan pembuluh darah (aterosklerosis) (KBI Gemari, 2002).

Trombus yang menyumbat pembuluh darah tersebut dapat dihancurkan

dengan mekanisme trombolisis (fibrinolisis). Proses utama dari fibrinolisis adalah dengan mengaktifkan plasminogen menjadi enzim proteolitik plasmin. Plasmin akan mengubah bentuk *thrombus* dan membatasi pengembangan trombosis dengan mencerna proteolitik fibrin (Kumada *et al.* 1994).

Terapi trombolisis yang selama ini dilakukan masih mengandalkan penggunaan agen fibrinolitik intravena, seperti streptokinase (Akhtar *et al.*, 1976), urokinase (Duffy, 2002) dan *tissue-Plasminogen Activator* (t-PA) (Collen dan Lijnen, 2004) yang masih tergolong sangat mahal (Dewoto, 2007) dengan aktivitas biologis yang pendek dalam sirkulasi darah (Yamashita *et al.*, 2003) serta memiliki efek samping yang cukup serius. Penggunaan streptokinase pada

stroke iskemik akut dapat menyebabkan pendarahan intraserebral dan resiko kematian yang cukup tinggi (Wibowo dan Gofir, 2001), urokinase dapat menyebabkan pendarahan *intracranial* (Hanaway, *et al.*, 1976), dan pemberian t-PA lebih dari 3 jam setelah serangan *stroke* dapat menyebabkan resiko komplikasi dan gangguan saraf (Wibowo dan Gofir, 2001). Sementara pemberian agen-agen fibrinolitik tersebut secara oral akan menimbulkan resiko pendarahan internal dalam saluran usus (Yong *et al.*, 2005). Oleh karena itu, perlu adanya upaya untuk mengeksplorasi model terapi alternatif yang diharapkan dapat mengurangi efek samping yang mungkin terjadi namun memiliki tingkat efektivitas yang sama. Salah satunya melalui terapi dengan diet (makanan), sebagaimana slogan yang banyak berkembang di masyarakat akhir-akhir ini, yaitu "*make your food as your medicine*". Sumi *et al.* (1987) pertama kalinya mendemonstrasikan ekstrak natto yang merupakan diet tradisional Jepang, mampu menunjukkan aktivitas trombolitik pada sirkulasi darah seperti penggunaan urokinase secara oral.

Natto sendiri merupakan produk makanan hasil fermentasi kedelai oleh *Bacillus natto* yang menghasilkan enzim nattokinase yang diketahui memiliki potensi aktivitas trombolitik yang lebih besar dibandingkan plasmin. Selain itu, nattokinase juga mampu menginduksi pelepasan prourokinase dari liver untuk mengaktifkan plasminogen dalam sirkulasi darah. Urano *et al.* (2001) menambahkan dari hasil penelitiannya bahwa nattokinase yang spesifik, yaitu subtilisin NAT, mampu menginaktifkan *plasminogen activator inhibitor* (PAI-1) menghasilkan peningkatan efek fibrinolisis pada percobaan binatang hidup. Semua itu menunjukkan bahwa enzim nattokinase bisa digunakan sebagai agen terapi trombolisis yang efektif.

Salah satu faktor yang mempengaruhi produktivitas komponen bioaktif selama proses fermentasi adalah jenis substrat yang digunakan. Diduga bahwa

penggunaan jenis kacang-kacangan selain kedelai yang digunakan sebagai substrat pada proses fermentasi natto akan menghasilkan produktivitas nattokinase dengan aktivitas trombolitik yang berbeda pula. Liu *et al.* (2004) menemukan bahwa jenis protein yang digunakan sebagai sumber nitrogen pada medium fermentasi *Bacillus natto* berkorelasi terhadap produktivitas nattokinasanya. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan protein yang berbeda pada setiap kacang-kacangan juga akan menentukan seberapa besar produktivitas nattokinase yang dihasilkan selama fermentasi natto.

Sejauh ini natto hanya diproduksi dari bahan baku kedelai, dengan 68% kebutuhan kedelai nasional masih bergantung pada produk impor dengan harga yang fluktuatif (BPPP, 2008). Indonesia memiliki berbagai jenis kacang-kacangan lokal yang masih belum banyak mendapat perhatian masyarakat (kacang inferior). Berbagai jenis kacang inferior di Indonesia seperti kacang, tunggak, kacang otok, dan kacang komak berpotensi sebagai kandidat dalam menggantikan kedelai, termasuk dalam produksi natto. Hal ini karena kacang-kacangan inferior tersebut memiliki kandungan protein yang cukup tinggi, yaitu rata-rata sebesar 22,0 – 22,8% (Utamo dan Antarlina, 1998).

Pada penelitian ini dilakukan uji efektivitas pemberian produk fermentasi natto yang terbuat dari berbagai jenis kacang inferior pada model hewan coba aterosklerotik. Harapannya penggunaan kacang inferior ini bisa meningkatkan efektivitas fermentasi natto sebagai diet untuk terapi trombolisis, sehingga masyarakat tidak hanya akan memperoleh sumber protein tinggi dari diet natto, tetapi juga alternatif pengobatan *stroke* non hemoragik yang murah dan efektif.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang-kacangan inferior meliputi kacang tunggak, kacang

otok dan kacang komak, serta kacang kedelai sebagai kontrol, yang diperoleh dari pasar tradisional di Probolinggo. Starter produk natto diperoleh dari swalayan "Papaya" Surabaya. Sebagai media fermentasi digunakan jerami padi yang diperoleh dari pasar tradisional di Malang. Bahan-bahan untuk analisis meliputi etanol 80%, formalin 10%, xilo, paraffin lunak dan keras, Haris Hematoxilin, alkohol asam, larutan amonium, *counter staining*, entelan, TCA, Na-thio, HCl, dan akuades, media NA, dan NB merk Oxoid. Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berumur 3 bulan, berkelamin jantan, dengan berat badan 150-200 gram. Bahan ransum tikus disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi diet normal dan aterogenik

Komposisi diet normal		Komposisi diet aterogenik (*)	
• Comfeed PAR-S 67%		• Comfeed PAR-S 55%	
• Tepung terigu 33%		• Tepung terigu 28%	
• Air secukupnya		• Kuning telur 6%	
		• Asam kolat 0,2%	
		• Minyak kambing 10%	
		• Minyak kelapa 1%	
		• Air secukupnya	

(*) Sumber: Triana dan Nurhidayat (2006)

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah inkubator (Binder BD 53 Germany), alat bedah minor, mikroskop (Olympus), autoklaf (Model HL-36 AE, Hirayama Jepang), sentrifusa (Hettich Zentrifugen D-78532 Tuttlingen), *waterbath*, spektrofotometer (UV-1201V Shimadzu), dan alat-alat gelas.

Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *True Experimental: Post Test Only with Control Group Design*. Hewan coba tikus dikelompokkan dalam 6 perlakuan, yaitu: kontrol negatif (diet normal), kontrol positif (diet aterogenik), perlakuan 1 (diet aterogenik + natto kedelai), perlakuan 2 (diet aterogenik + natto kacang tunggak), perlakuan 3 (diet

aterogenik + natto kacang otok), dan perlakuan 4 (diet aterogenik + natto kacang komak). Masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor tikus sebagai ulangan percobaan.

Pelaksanaan Penelitian

Proses fermentasi natto metode gabungan *backslope* dan spontan (modifikasi Farnworth, 2003)

Bahan baku kacang inferior dicuci bersih dan direndam selama 12 jam. Kemudian direbus selama 6 jam atau 15 menit jika menggunakan panci presto. Setelah lunak, ditambahkan produk natto komersial 10% (b/b) yang merupakan metode fermentasi *backslope* yaitu menggunakan starter bakteri hidup dari produk yang sudah jadi. Untuk mengoptimalkan proses fermentasi, dikombinasikan dengan metode fermentasi spontan menggunakan media fermentasi jerami padi, yang merupakan habitat alami dari bakteri *Bacillus natto*. Bahan baku kacang yang telah dicampur rata dengan produk natto dibungkus dengan jerami yang sebelumnya telah direndam dalam air panas selama 15 menit. Selanjutnya difermentasi selama 3 hari pada suhu 40°C dengan kelembaban 80%, kemudian disimpan dalam lemari es.

Tahap pengujian diet natto pada tikus wistar (modifikasi Lestari, 2007)

Sampel tikus wistar diadaptasi selama 7 hari, selanjutnya dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan. Semua kelompok tikus (kecuali kontrol negatif) diberikan perlakuan diet aterogenik selama 4 minggu untuk mengkondisikan tikus mengalami ateroskelrosis. Selanjutnya dilakukan perlakuan pemberian diet natto selama 4 minggu berikutnya, sementara untuk kelompok kontrol positif tidak diberi diet natto, namun tetap diberikan diet aterogenik. Dosis pemberian natto sebesar 25 g/kg bb tikus yang telah disesuaikan dengan asupan harian natto pada manusia. Setiap minggu dilakukan penimbangan berat badan tikus

untuk memantau kondisi tikus. Setelah akhir perlakuan dilakukan pembedahan untuk pengambilan darah dari jantung dan mikrotom aorta tikus. Darah dari jantung diambil bagian serumnya untuk analisis kolesterol dan kadar MDA, sementara mikrotom aorta dibuat preparat untuk analisis hitungan sel endotel dengan metode pengecatan HE dan hitungan *foam cell* dengan metode pengecatan *Oil Red-O*.

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik menggunakan analisis ragam. Apabila dari hasil uji menunjukkan adanya pengaruh, maka dilakukan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan selang kepercayaan 5%. Analisis data dilakukan dengan program SPSS 13,0 for Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Diet Natto Kacang Inferior terhadap Profil Serum dan Aorta Tikus

Profil serum yang diamati meliputi kadar kolesterol total dan kadar MDA. Kedua parameter ini merupakan faktor resiko penting yang menjadi indikasi awal proses terbentuknya trombus. Menurut Price dan Wilson (2005) akumulasi MDA dalam darah akan menyebabkan perlukaan pada endotel pembuluh darah, yang selanjutnya berkembang menjadi trombus. Terbentuknya trombus dan adanya efek trombolisis akan diperkuat dengan analisis profil aorta yang meliputi hitungan jumlah *foam cell* dan jumlah sel endotel.

Tabel 2 menunjukkan bahwa diet natto memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap penurunan kadar kolesterol dan MDA serum. Penurunan kolesterol serum tersebut diduga disebabkan kandungan senyawa-senyawa bioaktif dalam kelompok kacang-kacangan yang dapat menekan jumlah kolesterol, seperti asam lemak rantai ganda, fosfolipid, dan golongan flavonoid,

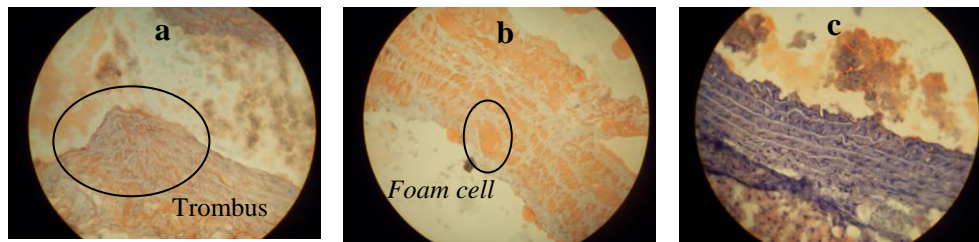
terutama isoflavon (Pawiroharsono, 2001). Dalam hal ini isoflavon dapat menekan angka kolesterol dengan memperkecil ukuran partikel LDL kolesterol (Kanazawa *et al.*, 1993) sehingga lebih mudah dimetabolisme. Selain itu, isoflavon juga memiliki kemiripan struktur dengan $17-\beta$ estradiol, yang diketahui berperan dalam metabolisme kolesterol dalam tubuh (Suherman, 2007). Selain itu, komponen isoflavon yang diduga terkandung di dalam produk natto kacang inferior ini juga efektif dalam menghambat modifikasi oksidatif LDL oleh makrofag (Kapiotis, *et al.*, 1997), meningkatkan resistensi LDL terhadap reaksi oksidasi (de Walley, *et al.*, 1990), dan mengurangi peroksidasi lipid (Wiseman, *et al.* 2000). Efek antioksidatif inilah yang mampu mencegah terjadinya reaksi oksidasi kolesterol, sehingga pembentukan MDA dapat dihambat.

Perlakuan diet natto mampu menurunkan kadar kolesterol dan MDA tikus aterogenik sampai pada kondisi yang sama dengan tikus normal (tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif). Selain itu, diet natto kacang inferior juga tidak memberikan pengaruh terhadap kolesterol dan MDA yang signifikan dibandingkan dengan produk natto kontrol (kedelai). Hal ini menunjukkan bahwa kacang inferior dapat menggantikan kedelai sebagai bahan baku natto yang memiliki efek penurunan kolesterol dan MDA yang sama.

Pada pengujian histopatologi dengan pengecatan *Oil Red-O* dapat diketahui jumlah *foam cell* pada aorta. Menurut Lestari dkk (2007) *foam cell* digambarkan sebagai sel yang menyerupai busa dengan inti sel di bagian tengahnya yang akan menunjukkan warna merah pada pengecatan *Oil Red-O*. *Foam cell* merupakan massa utama pembentuk trombus. Dari hasil pengamatan dengan mikroskop perbesaran 400 kali, terlihat bentukan trombus pada kelompok tikus kontrol positif yang menunjukkan tikus

Tabel 2. Profil serum (kolesterol dan MDA) dan aorta (*foam cell* dan sel endotel) tikus

Kelompok perlakuan	Parameter			
	Kadar kolesterol (mg/dl)	Kadar MDA (mg/ml)	Jumlah <i>foam cell</i>	Jumlah endotel
Kontrol negatif	79,3 a	0,010 a	1,4 a	45,9 c
Kontrol positif	125,7 b	0,049 b	11,8 d	22,5 a
Diet natto kacang kedelai	76,3 a	0,008 a	4,3 ab	34,2 b
Diet natto kacang tunggak	85,3 a	0,013 a	6,6 bc	30,6 b
Diet natto kacang otok	85,7 a	0,013 a	5,6 bc	31,0 b
Diet natto kacang komak	92,3 a	0,019 a	8,6 cd	25,1 a



Gambar 1. Penampang aorta tikus hasil pengecatan *Oil Red-O*: bentukan trombus (a), kelompok kontrol positif (b), kelompok kontrol negatif (c)

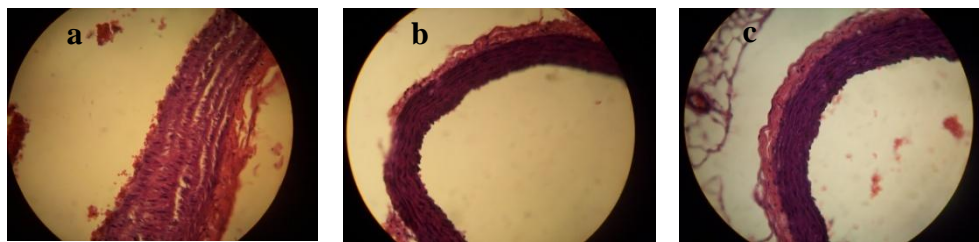
telah mengalami aterosklerosis seperti pada Gambar 1a. Pada kelompok tikus perlakuan diet natto, bentukan trombus tidak terlihat secara jelas. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan diet natto kacang inferior memiliki efek trombolitik atau penghancuran terhadap trombus.

Semakin banyak jumlah hitungan *foam cell* menunjukkan trombus yang terbentuk semakin besar atau banyak. *Foam cell* terbentuk karena berkembangnya makrofag di dalam lapisan intima pembuluh darah (Lestari dkk, 2007). Efek trombolisis terlihat jika jumlah hitungan *foam cell* semakin menurun yang berarti bahwa terdapat penurunan ukuran dan jumlah trombus yang terbentuk (Gambar 1b-c). Pada Tabel 2 terlihat bahwa pemberian natto berpengaruh signifikan ($P < 0,05$) terhadap penurunan jumlah *foam cell* dibandingkan kontrol positif, kecuali natto kacang komak. Efek trombolitik ini diduga disebabkan karena adanya enzim nattokinase yang diproduksi oleh bakteri *Bacillus natto* selama fermentasi natto. Menurut Zheng *et al.* (2005) nattokinase merupakan salah satu produk metabolit sekunder selama fermentasi natto, dimana enzim ini memiliki

aktivitas dalam mendegradasi benang fibrin (fibrinolitik) sehingga trombus bisa dihancurkan (Sumi *et al.* 1987). Selain itu, nattokinase juga mampu mengaktifkan pengeluaran t-PA dan pro-urokinase yang berperan sebagai aktivator plasminogen menjadi plasmin (Kumada *et al.* 1994). Plasmin merupakan enzim proteolitik endogenous yang spesifik terhadap protein fibrin atau bersifat fibrinolitik (Fujita *et al.*, 1995).

Pada hasil uji histopatologi aorta dengan pengecatan Hematoxilin-Eosin (HE) terlihat bahwa integritas aorta pada kelompok tikus yang diberi diet natto kacang inferior (Gambar 2c) lebih baik dibandingkan tikus yang hanya diberi diet aterogenik (Gambar 2a), dan secara visual mikroskopis integritasnya mendekati kelompok kontrol negatif (tikus normal) (Gambar 2b).

Integritas aorta yang baik menunjukkan tingkat kerusakan sel endotel semakin kecil (Lestari dkk, 2007). Pada kelompok tikus yang diberi diet natto, integritas aorta yang baik menunjukkan adanya perbaikan lapisan endotel yang sebelumnya telah rusak pada saat perlakuan diet aterogenik.



Gambar 2. Penampang aorta tikus hasil pengecatan HE: kelompok kontrol positif (a), kelompok kontrol negatif (b), kelompok natto kacang inferior (kacang otok) (c)

Hal ini didukung dengan jumlah hidupan sel endotel. Semakin sedikit jumlah sel endotel menunjukkan tingkat kerusakan aorta yang lebih tinggi karena proses trombogenesis, begitu juga sebaliknya. Pada Tabel 2 terlihat bahwa jumlah sel endotel pada kelompok perlakuan natto (kecuali kacang komak) berbeda signifikan ($P < 0,05$) dibandingkan kontrol positif yang berarti bahwa aorta tikus mengalami perbaikan lapisan endotel yang efektif pasca aterosklerosis. Hal ini diduga karena adanya peranan dari isoflavon dalam natto yang dapat memperbaiki fungsi endotel melalui pengaktifan sistem enzim nitrit oksida sintase pada endotel dalam waktu yang singkat (Rathel *et al.*, 2005).

Efek penurunan jumlah *foam cell* dan peningkatan jumlah endotel natto dari kacang tunggak dan otok tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) dengan produk kontrol (natto kedelai). Dengan demikian kedua jenis kacang inferior ini mampu secara efektif menggantikan kedelai sebagai bahan baku natto dengan efek trombolisis yang sama.

Prediksi Aktivitas Enzim Nattokinase

Keberadaan enzim nattokinase di dalam produk natto dapat diprediksi dari adanya bakteri *Bacillus natto* yang masih

hidup dalam bahan. Pendekatan yang digunakan adalah semakin besar jumlah bakterinya, maka produksi dan aktivitas enzim nattokinasenya diasumsikan semakin besar pula. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh hitungan jumlah bakteri *Bacillus natto* dalam produk dan aktivitas nattokinase yang ditunjukkan Tabel 3.

Semua sampel produk natto (kecuali natto kacang otok) tidak memberikan hasil yang berbeda signifikan terhadap jumlah bakteri natto yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa kacang inferior dapat menggantikan kacang kedelai sebagai bahan baku natto dilihat dari kualitas mikrobiologi natto. Namun, natto kacang otok menghasilkan jumlah bakteri natto yang paling besar, sehingga diasumsikan aktivitas nattokinase yang dihasilkan juga paling besar (Tabel 3). Aktivitas nattokinase tersebut terlihat pada efek trombolitik yang dihasilkan pada natto kacang otok paling besar. Indikasinya adalah dengan jumlah sel endotel yang banyak dan jumlah *foam cell* yang sedikit. Pada Tabel 2 terlihat bahwa jumlah sel endotel dan *foam cell* jaringan aorta tikus pada pemberian diet natto kacang otok memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dengan kacang inferior yang lainnya.

Tabel 3. Jumlah *Bacillus natto* metode SPC dan aktivitas nattokinase

Sampel	Jumlah bakteri (cfu/ml)	Aktivitas nattokinase (FU/g)
Natto komersial	$5,9 \times 10^9$ a	30 (*) a
Natto kacang kedelai	$4,4 \times 10^9$ a	22,4 a
Natto kacang tunggak	$3,9 \times 10^9$ a	19,8 a
Natto kacang otok	$1,7 \times 10^{10}$ b	86,4 b
Natto kacang komak	$3,0 \times 10^9$ a	15,25 a

(*) Sumber: US Patent 7018630 (Takaoka, 2006)

Kualitas mikrobiologi dan aktivitas nattokinase tersebut sangat dipengaruhi oleh karakteristik bahan baku kacang. Liu *et al.* (2004) menemukan bahwa jenis protein yang digunakan sebagai sumber nitrogen pada medium fermentasi *Bacillus natto* memiliki korelasi terhadap produktifitas nattokinasanya. Karakteristik bahan baku kacang-kacangan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakteristik kacang inferior

Jenis kacang	% Protein	Ukuran (cm ³)
Kacang kedelai	31,85 b	0,238 b
Kacang tunggak	21,86 a	0,185 ab
Kacang otok	21,70 a	0,106 a
Kacang komak	20,01 a	0,449 c

Pada Tabel 4 terlihat bahwa kadar protein kacang otok tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) dengan kacang inferior lainnya, sehingga kualitas mikrobiologi natto di sini tidak dipengaruhi oleh jenis dan kandungan protein dari bahan bakunya. Namun dari segi ukurannya, kacang otok memiliki ukuran yang paling kecil. Hal ini kemungkinan berpengaruh terhadap kualitas mikrobiologi natto. Ukuran kacang yang lebih kecil akan mengefektifkan proses fermentasi karena bakteri natto akan lebih mudah dalam mencapai bagian dalam kacang, sehingga aktivitas bakteri dalam menfermentasi kacang akan lebih optimum. Dampaknya pertumbuhan bakteri natto juga akan semakin pesat.

SIMPULAN

Diet natto kacang inferior berpengaruh ($P < 0,05$) pada penurunan kadar kolesterol serum, MDA serum, jumlah foam cell aorta dan peningkatan jumlah sel endotel aorta. Efek trombolitik natto kacang inferior tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) dibandingkan natto kacang kedelai, sehingga kacang inferior efektif menggantikan kedelai untuk pembuatan natto. Jenis kacang inferior yang memberikan efek trombolitik paling baik di dalam produk natto adalah kacang otok,

dengan prediksi nilai aktivitas nattokinase sebesar 84,6 FU/g.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhtar T.M, C.S. Goodchild, and M.K. Boylan. 1976. *Reversal of streptokinase-induced bleeding with aprotinin for emergency cardiac surgery*. *Anaes.* 47: 226-8
- Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. 2008. Mutu Kedelai Nasional Lebih Baik dari Kdelai Impor. Siaran Pers Edisi 12 Januari 2008
- Collen, D. and H.R. Lijnen. 2004. *Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account*. *J Thromb Haemost* 2(4): 541-546
- de Walley C.V., S.M. Rankin, J.R.S. Hoult, W. Jessup, and D.S. Leake. 1990. *Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages*. *Biochem. Pharmacol.* 39:1743-1750
- Dewoto, H.R. 2007. Antikoagulan, Antitrombotik, Trombolitik, dan Hemostatik dalam Tim Dokter FK-UI, Farmakologi dan Terapi. Gaya Baru, Jakarta
- Duffy, M.J. 2002. *Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies*. *Clin Chem* 48(8): 1194-1197
- Farnworth, E. R. 2003. *Handbook of Fermented Functional Foods*. CRC Press, USA
- Fujita M, K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, Kariya K, Nishimuro S. 1995. *Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat*. *Biol Pharm Bull* 18(10): 1387-1391.
- Hanaway, J., R. Torack, A.P. Fletcher, and W.M. Landau. 1976. *Intracranial bleeding associated with urokinase therapy for acute Ischemic hemispherical stroke*. *Stroke* 7: 143-7
- Kanazawa, T., M. Tanaka, and T. Uemura. 1993. *Antiatherogenicity*

- of soybean protein*. Ann N Y Acad Sci. 676: 202-214
- Kapiotis, S., M. Hermann, I. Held, C. Seelos, H. Ehringer, and B.M.K. Gmeiner. 1997. *Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 2868-2874
- KBI Gemari. 2002. Stroke Sebabkan 10% dari 5,5 Juta Kematian. (Online); <http://www.kbi.gemari.or.id>. Tanggal akses 23 April 2009.
- Kumada, K., T. Onga, and H. Hoshino. 1994. *The effect of natto possessing a high fibrinolytic activity in human plasma*. Seibutsugaku 128(3): 117-119
- Kurniasih, R. 2003. Penanda Biokimia untuk Stroke. Pustaka Abadi, Solo
- Lestari, B., G. Aprivita., dan W.A. Putri. 2007. *Potensi ekstrak kasar lintah (Hirudo medicinalis) dalam penanganan aterosklerosis sebagai fase awal stroke iskemik pada tikus putih (Rattus norvegicus) diet aterogenik*. Laporan PKM Penelitian, Dikti
- Liu, J-G, J-M. Xing, T-S. Chang, Z-Y. Ma, C-L. Yang, H-Z. Liu, and J-Y. Chen. 2004. *Optimization of medium composition for the production of nattokinase by Bacillus natto NLSSE*. Journal of AlChE
- Pawiroharsono, S. 2001. Prospek dan Manfaat Isoflavon untuk Kesehatan. Direktorat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
- Price, S. A. dan L. Wilson. 2005. Patofisiologi: Konsep Dasar Proses Penyakit. Alih bahasa oleh Brahm, Pendit. Edisi 6. EGC, Jakarta
- Rathel, T.R., J.F. Leikert, A.M. Vollmar, and V.M. Dirsch. 2005. *The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro*. Br J. Pharmacol. 144: 394-399
- Suherman, S.K. 2007. Estrogen dan Progesterin, Agonis dan Antagonisnya. Dalam Tim Dokter FK-UI. Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Gaya Baru, Jakarta
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, and H. Muraki. 1987. *A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a typical and popular soybean food in the Japanese diet*. Experientia 43: 1110-1111
- Urano, T., H. Ihara, K. Umemura, Y. Suzuki, M. Oike, S. Akita, Y. Tsukamoto, I. Suzuki, and A. Takada. 2001. *The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from Bacillus subtilis cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1*. J. Biol Chem 276: 24690-24696
- Utamo, J. S. dan Antarlina. 1997. *Kajian sifat fisikokimia pati umbi-umbian lain selain ubi kayu*. ProsSem. Tekn. Pangan. Hal 241-248.
- Triana, E. dan N. Nurhidayat. 2006. *Pengaruh pemberian beras yang difermentasi oleh Monascus purpureus terhadap darah tikus putih (Rattus Sp.) hiperkolesterolemia*. J. Biodiversitas 7(4): 317-321
- Wibowo, S. dan A. Gofir. 2001. Farmakoterapi dalam Neurologi. Salemba Medika, Jakarta
- Wiseman H., J.D. O'Reilly, and H. Adlercreutz. 2000. *Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of LDL to oxidation in humans*. Am J.Clin Nutr.72: 395-400
- Yamashita T., E. Oda, J.C. Giddings, and J. Yamamoto. 2003. *The effect of dietary bacillus natto productive protein on in vivo endogenous thrombolysis*. Pathophysiol Haemost Thromb 33: 138-143
- Zheng, Z-L., S-Y Zuo, Z-G Liu, K-C Tsai, A-F Liu, and G-L. Zou. 2005. *Construction of 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme of Bacillus natto, a novel nucleophilic catalytic mechanism of nattokinase*. Journal of Molecular Graphics and Modelling 23: 373-380