



Kajian Enzim Fibrinolitik pada Mikroorganisme Asal Pangan Fermentasi Asia: Review

Study of Fibrinolytic Enzymes on Microorganisms of Fermented Food From Asia: Review

Fathma Syahbanu¹⁾ dan Setyaning Pawestri²⁾

¹⁾ Program Studi Gizi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang

²⁾ Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pangan dan Agroindustri, Universitas Mataram

email: fathma.syahbanu@fikes.unsika.ac.id

Diserahkan [03 April 2023]; Diterima [17 Mei 2023]; Dipublikasi [08 Juni 2023]

ABSTRACT

Data collected by WHO in 2019 shows an estimated 17.9 million (equivalent to 32% of global death). The total number is due to cardiovascular disease, 85% were due to heart attacks and strokes. One of the basic pathophysiologicals of stroke is athero-thromboembolic (thrombosis). The accumulation of clots formed by fibrin in blood vessels can inhibit several processes in the body system, such as blood flow, oxygen transportation, and transportation of nutritional and non-nutritional compounds needed. Fibrinolytic enzymes from food microbes have attracted attention for further research as thrombolytic agents. The *Bacillus* genus from fermented foods can produce strong fibrinolytic enzymes, such as *Bacillus natto* from natto (Japan), *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkook-jang (Korea), *Bacillus weihenstephanensis* from shrimp paste (Vietnam), *Bacillus amyloliquefaciens* MH18B1 from Hawaijar (India), *Rhizopus chinensis* 12 from Chinese wine (China), and *Bacillus pumillus* and *Bacillus subtilis* K2 from fermented soybean food products such as tempe gembus, red oncom, and moromi (Indonesia). The high protein content in soybeans can be used as a medium for the growth of proteolytic and fibrinolytic microorganisms. Studies in Asia regarding fibrinolytic enzymes from fermented foods are still limited, even though the Asian region comprises many countries rich in fermented foods. This review is relevant to healthy food ingredients from local fermented foods. Recently, microbial fibrinolytic enzymes from fermented foods have received tremendous interest in the medical field. Many local fermented foods are a potential source of fibrin-degrading enzymes, which can be further developed to treat diseases like stroke and heart attack. This article aims to review microbial fibrinolytic enzymes from various fermented foods and their impact on health, especially thrombosis. This manuscript review uses the narrative review method. From the overall discussion, it can be concluded that fermented foods have properties as fibrinolytic agents.

Keywords: *Bacillus* sp.; fibrinolytics; fermented food; thrombosis

ABSTRAK

Data WHO pada 2019 menunjukkan sekitar 17,9 juta orang meninggal (setara dengan 32% angka kematian di dunia). Jumlah dari keseluruhan tersebut dikarenakan penyakit kardiovaskular, yakni 85% kematian akibat serangan jantung dan stroke. Salah satu dasar patofisiologi dari stroke adalah atero-tromboembolik (trombosis). Adanya akumulasi bekuan yang dibentuk fibrin pada pembuluh darah dapat mengakibatkan terjadinya penghambatan aliran darah, proses transportasi oksigen, serta senyawa gizi dan non gizi yang dibutuhkan oleh tubuh. Enzim fibrinolitik dari mikroba pangan telah menarik perhatian untuk diteliti lebih jauh sebagai agen trombolitik. Genus *Bacillus* dari pangan fermentasi dapat menghasilkan enzim fibrinolitik yang kuat, seperti *Bacillus natto* dari natto (Jepang), *Bacillus subtilis* KCK-7 dari Chungkook-jang (Korea), *Bacillus weihenstephanensis* dari terasi udang (Vietnam), *Bacillus amyloliquefaciens* MH18B1 dari Hawaijar (India), *Rhizopus chinensis* 12 dari arak China (China), serta *Bacillus pumillus* dan *Bacillus subtilis* K2 dari produk pangan fermentasi kedelai seperti tempe gembus, oncom merah, dan moromi (Indonesia). Kandungan protein yang tinggi pada kedelai berpotensi digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme proteolitik dan fibrinolitik. Kajian di Asia mengenai enzim fibrinolitik dari pangan fermentasi masih terbatas, padahal wilayah Asia tersusun dari banyak negara yang kaya akan pangan fermentasi. Studi ini relevan dengan bahan baku pangan sehat yang berasal dari pangan fermentasi. Belakangan ini, enzim-enzim fibrinolitik mikroba dari pangan fermentasi sangat diminati oleh bidang medis. Banyak pangan fermentasi dianggap sebagai sumber potensial enzim pendegradasi fibrin, yang

dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mengatasi penyakit seperti stroke dan serangan jantung. Artikel ini bertujuan untuk mengulas enzim fibrinolitik mikroba dari berbagai pangan fermentasi serta dampaknya terhadap kesehatan, terutama trombosis. Ulasan naskah ini menggunakan metode *narrative review*. Dari pembahasan keseluruhan dapat ditarik kesimpulan bahwa pangan fermentasi memiliki sifat sebagai agen fibrinolitik.

Kata Kunci : *Bacillus* sp.; fibrinolitik; pangan fermentasi; thrombosis

Saran sitasi: Syahbanu, F. dan Pawestri, S. 2023. Kajian Enzim Fibrinolitik pada Mikroorganisme Asal Pangan Fermentasi Asia *Review. Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 16(1), 41-64. <https://doi.org/10.20961/jthp.v16i1.72623>

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskuler seperti penyakit stroke dan jantung adalah salah satu penyebab kematian utama di dunia, termasuk di Indonesia. Penyakit kardiovaskular merupakan penyakit tidak menular yang paling umum di dunia, serta bertanggung jawab terhadap 17.9 juta kematian, dimana lebih dari tiga perempatnya berada di negara berpenghasilan rendah dan menengah (Kaptoge *et al.*, 2019; WHO, 2021). Penyakit kardiovaskular dapat disebabkan oleh dua faktor, yaitu aterosklerosis dan trombosis. Aterosklerosis adalah pengerasan dan penyempitan arteri secara progresif akibat timbunan lemak dengan disertai peradangan, sementara trombosis merupakan suatu keadaan dimana bekuan-bekuan darah melekat dan beragregasi pada pembuluh darah yang terluka sehingga menyebabkan penyumbatan aliran darah. Adanya akumulasi bekuan darah yang dibentuk fibrin pada pembuluh darah dapat mengakibatkan terjadinya penghambatan aliran darah, proses transportasi oksigen serta senyawa gizi dan non gizi yang dibutuhkan oleh tubuh.

Salah satu dasar patofisiologi dari stroke adalah atero-tromboembolik. Menurut Ismail *et al.* (2002) sekitar 20% – 30% kasus kardiovaskular disebabkan oleh trombosis. Trombosis dapat menyebabkan terjadinya stroke iskemia dan trombosis vena dalam emboli paru. Pada tahun 2015, ketua Perhimpunan Trombosis Hemostasis Indonesia (PTHI) melaporkan bahwa penyebab kematian utama di Indonesia, yaitu stroke (11.8%) dan urutan ketiga adalah jantung (8.7%). Dari jumlah tersebut, sebanyak 80% – 85% stroke adalah stroke iskemia yang disebabkan oleh trombosis serta sebanyak 70% penyakit jantung juga terjadi akibat trombosis (Atmakusuma *et al.*, 2015).

Wong *et al.*, (2021) juga melaporkan bahwa sebagian besar negara di Asia mengalami risiko penyakit jantung koroner (PJK), dengan angka kematian bervariasi dari 103 hingga 366 per 100.000 populasi orang dewasa. Jenis kelamin pria, orang dewasa yang lebih tua, serta mereka yang memiliki dislipidemia, hipertensi, dan diabetes adalah individu yang berisiko tinggi. Selama dekade terakhir, terjadi tren peningkatan trombosis yang signifikan, terutama di Asia Timur, di mana terjadi peningkatan yang mengkhawatirkan, yaitu 117,2 dan 115,3% dari total kematian dan disabilitas yang disesuaikan dengan usia harapan hidup. Dengan demikian trombosis menjadi salah satu penyebab utama kematian di Asia, termasuk Indonesia. Pemicu terjadinya trombosis adalah perlambatan aliran darah atau stasis, kekentalan darah, dan pembuluh darah yang rusak. Menurut Kotb (2014) pada tahun 2020 penyakit kardiovaskular dapat menyebabkan sekitar 25 juta kematian per tahun, sehingga terapi antitrombotik menjadi kajian yang sangat menarik.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, agen trombolitik diklasifikasikan menjadi tiga jenis. Pertama adalah aktivator plasminogen, seperti aktivator plasminogen jaringan (t-PA) (Collen dan Lijnen, 2004) dan urokinase (Duffy, 2002), yang mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin aktif untuk mendegradasi fibrin. Jenis lainnya adalah plasmin-like protein (enzim pendegradasi fibrin) yang bekerja secara langsung mendegradasi fibrin dalam pembekuan darah, sehingga dapat melarutkan trombus dengan cepat dan sempurna, serta antitrombin yang bekerja menghambat kerja trombin dalam memotong rantai fibrinogen, sehingga pembentukan rantai fibrin dapat dihambat. Lumbrokinase dari cacing tanah dan fibrolase dari bisa ular dikenal sebagai plasmin-like

protein (Chen *et al.*, 1991; Mihara *et al.*, 1991). Meskipun, tissue Plasminogen Activator (t-PA), urokinase, serta streptokinase masih banyak digunakan dalam terapi trombolitik, harganya yang mahal (100 mg t-PA adalah \$2.750) dan adanya efek samping yang tidak diinginkan pada penggunaan streptokinase, seperti risiko pendarahan dalam usus ketika dikonsumsi secara oral (Yogesh dan Halami, 2017), mendorong berbagai penelitian untuk mencari sumber agen trombolitik yang lebih murah dan lebih aman untuk digunakan dalam aplikasi medis.

Enzim fibrinolitik asal mikroba yang diisolasi dari pangan fermentasi memiliki potensi yang signifikan sebagai fortifikan makanan dan aplikasi nutraseutikal, sehingga penggunaannya secara efektif dapat mencegah penyakit kardiovaskular. Penelitian mengenai enzim dari mikroba pangan telah dilakukan di Jepang pada produk tofuyo, skipjack, dan natto; Korea pada produk *chungkook-jang*, *jeot-gal*, dan *doen-jang*; China pada produk *douchi*, serta Indonesia pada produk jambal roti, ikan fermentasi, moromi, oncom merah dan tempe gembus. Enzim fibrinolitik Nattokinase yang diperoleh dari *Bacillus* sp. (hasil isolasi dari natto) serta enzim-enzim yang serupa dari pangan fermentasi lainnya telah dilaporkan memiliki potensi aktivitas fibrinolitik serta bermanfaat bagi kesehatan (Kim *et al.*, 1997a).

Penelitian mengenai enzim fibrinolitik asal mikroorganisme yang diisolasi dari pangan fermentasi Indonesia seperti oncom merah, tempe gembus, moromi, tuak, jambal roti, terasi, serta tempe telah dilakukan secara *in vitro*, *in vivo*, dan *in silico*. Dari hasil penelitian yang dilakukan, baik secara *in vitro*, *in vivo*, maupun *in silico* menunjukkan adanya bakteri penghasil enzim fibrinolitik pada pangan fermentasi tersebut yang memiliki aktivitas protease fibrinolitik yang kuat, antiplatelet, antikoagulan, dan pendegradasi trombus; dapat mendegradasi rantai fibrinogen; serta bekerja secara langsung sebagai enzim pendegradasi fibrin maupun tidak langsung sebagai aktivator plasminogen sehingga semakin efektif dalam melarutkan trombus. Meskipun demikian, kajian riset di Indonesia mengenai enzim

fibrinolitik dari pangan fermentasi masih terbatas, padahal Indonesia memiliki kekayaan produk pangan fermentasi yang beragam seperti tempoyak, rusip, pakasam, dadih, tauco dan kefir. Berbagai penelitian menyebutkan beberapa bakteri *Bacillus* sp., seperti *Bacillus subtilis* dan *Bacillus coagulans* ditemukan secara luas pada produk pangan terfermentasi dan secara historik teruji aman dikonsumsi manusia. Artikel ini bertujuan untuk mengulas enzim fibrinolitik mikroba dari berbagai pangan fermentasi Asia serta dampaknya terhadap kesehatan, terutama trombosis.

METODE

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode *literature review narrative*. Langkah awal yang dilakukan adalah melakukan pencarian literatur ilmiah yang diterbitkan antara tahun 2005 – 2022 yang terindeks di dalam database jurnal ilmiah seperti Scopus, Pubmed, Google Scholar dan Sinta. Langkah selanjutnya adalah melakukan identifikasi kata kunci. Kata kunci yang digunakan berkaitan dengan enzim fibrinolitik, pangan fermentasi Asia, trombosis, *Bacillus* sp., dan sistem fibrinolisis. Langkah ketiga adalah melakukan ulasan atau review pada abstrak dan isi artikel masing-masing literatur, dimana pada langkah ini artikel yang memiliki kata kunci yang sesuai tetapi abstrak dan isi artikel tidak sesuai dengan tujuan penelitian akan dikeluarkan (exclude). Pada langkah terakhir, dilakukan sintesis temuan dari isi artikel dan diintegrasikan ke dalam naskah publikasi.

Mekanisme Pembekuan Darah dan Sistem Fibrinolisis

Pembekuan darah terjadi ketika sel darah bertemu dengan sel-sel endotelial atau jika terjadi kerusakan pada jaringan kulit. Mekanisme pembekuan darah dapat dilihat pada Gambar 1. Pembekuan darah atau prokoagulasi terjadi ketika sel darah bertemu dengan sel-sel endotelial atau jika terjadi kerusakan pada jaringan kulit. Sel-sel endotelial bersifat antikoagulan dan inert terhadap faktor-faktor pembekuan darah (Escobar 2002). Namun, adanya luka dapat

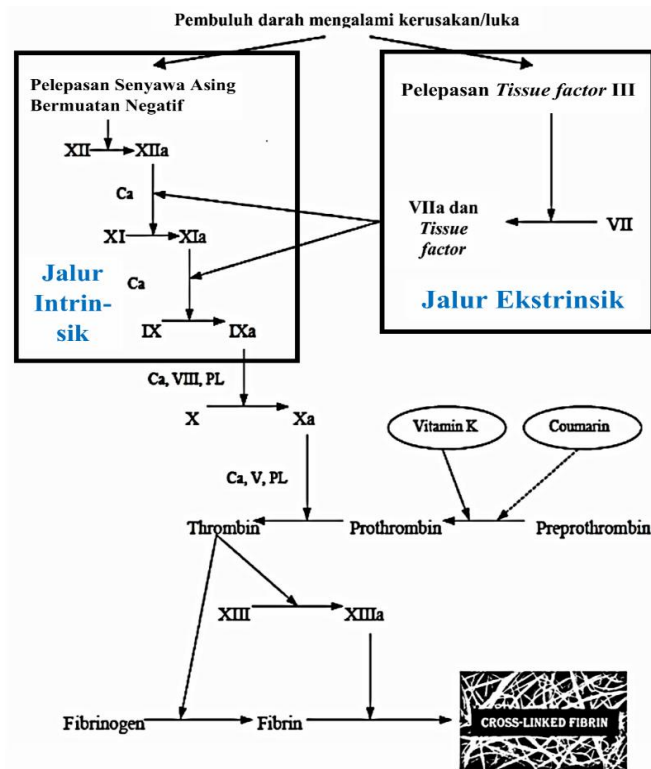
mengubah sifat sel endotelial menjadi sangat prokoagulan.

Sifat prokoagulan sel endotelium menyebabkan penempelan trombosit atau keping darah pada dinding pembuluh darah (Katzung, 2018). Matriks-matriks subendotel yang bersifat prokoagulan, diantaranya kolagen, faktor von Willebrand (vWF), fibrinogen (FBG), laminin, dan fibronektin, akan terekspos dan matriks protein subendotelium akan terikat pada reseptor glikoprotein (GP) di trombosit (Repetto dan De Re, 2017). Gaya gesek pada lokasi terjadinya luka akan menyebabkan faktor vWF terurai menjadi konfigurasi berbentuk benang dan mengekspos titik ikatan dari platelet GPIb α dan memfasilitasi ikatan antara trombosit dengan vWF (Thielemans *et al.* 2019). Faktor vWF akan berperan sebagai jembatan antara kolagen endotelium dengan reseptor GPIb di permukaan trombosit dan mendorong terjadinya adhesi (pelekatan) trombosit. Penempelan trombosit ini diikuti oleh perubahan bentuk trombosit dan pelepasan adenosin difosfat (ADP).

Pelepasan adenosin difosfat menyebabkan pecahnya trombosit-trombosit lain dan mulai menyumbat lubang pada pembuluh darah. Trombosit yang telah aktif akan menyediakan permukaan fosfolipida yang bertindak sebagai perantara kedua yang akan mengaktifkan faktor-faktor koagulasi darah, baik pada sistem intrinsik maupun ekstrinsik. Seiring dengan terjadinya kerusakan pembuluh darah, sistem hemostasis juga akan mengalirkan darah melalui pembuluh darah lain di sekitar pembuluh yang rusak untuk mempercepat proses pembekuan darah (Escobar 2002). Bekuan darah merupakan trombosit yang saling terangkai melalui sejumlah reaksi biokimia dan membentuk agregat trombosit (Escobar 2002). Asam arakidonat dalam trombosit akan diubah menjadi tromboksan A₂ (TXA₂) yang berfungsi sebagai pengaktif trombosit dan vasokonstriktor bersama ADP dan serotonin (5-HT) (Olson dan Bjork, 1994; Escobar, 2002).

Pengaktifan trombosit mengubah konformasi pada reseptor α IIB β III integrin (glikoprotein IIB/IIIa) sehingga mudah mengikat fibrinogen dan membentuk ikatan silang antarmolekul trombosit sehingga terbentuk agregat trombosit. Agregat trombosit terdiri dari fibrin, trombosit, dan sisa-sisa eritrosit yang tidak larut. Agregat yang pembentukannya tidak terkendali dapat menyumbat pembuluh darah, serta dapat menyebabkan iskemia jaringan (Olson dan Bjork, 1994; Katzung, 2018). Serangkaian proses ini disebut hemostasis primer (Tortora dan Derrickson, 2014). Hemostasis primer terdiri dari pelekatan trombosit, aktivasi trombosit, dan pembentukan sumbatan trombosit (Tortora dan Derrickson, 2014).

Hemostasis sekunder didasarkan pada reaksi berantai (*cascade*) koagulasi melalui faktor koagulasi yang mendorong terjadinya pembentukan bekuan fibrin sehingga dapat memperkuat trombus. Hemostasis sekunder terjadi melalui dua jalur yaitu jalur ekstrinsik dan jalur intrinsik, yang keduanya akan mengaktifkan jalur umum (Escobar, 2002; Tortora dan Derrickson, 2014). Kedua jalur tersebut bertujuan untuk membentuk ikatan silang fibrin yang tidak larut dengan mengaktifkan berbagai faktor terutama trombin. Jalur pembentukan bekuan yang paling singkat dimulai dengan pengaktifan jalur ekstrinsik. Jalur ekstrinsik adalah jalur yang melalui aktivasi faktor pembekuan darah yang dipicu oleh kerusakan dinding endotelial pembuluh darah serta melepaskan faktor jaringan III (tromboplastin). Selanjutnya, jalur ini diaktivasi oleh faktor jaringan VII dari faktor jaringan subendothelial III (TF III) pada fibroblas dan sel otot halus yang terekspos oleh luka pada saluran darah sehingga disebut juga jalur TF. Faktor III dan ion Ca²⁺ mengaktifkan faktor VII menjadi VIIa. Faktor VIIa bersama dengan faktor III dan ion Ca²⁺ dapat memproduksi trombin dalam jumlah kecil dengan sangat cepat yang bertujuan untuk mempercepat pembentukan



Gambar 1. Diagram *caescade* penggumpalan darah.

Keterangan: Tanda \longrightarrow menunjukkan pengaktivasian suatu komponen; tanda \dashrightarrow menunjukkan penghambatan suatu komponen. Keterangan: XII (faktor Hageman, protease serin), XI (tromboplastin plasma), IX (faktor Christmas, protease serin), VII (faktor stabil, protease serin), XIII (faktor penstabil fibrin, enzim transglutaminase), PL (fosfolipid membran platelet), Ca^{2+} (ion kalsium), a (komponen dalam bentuk aktif) (Sumber : (Kotb, 2014))

fibrin melalui pelepasan trombosit. Faktor VIIa ini juga akan mengaktifkan faktor XI dan IX pada jalur intrinsik (Escobar, 2002). Palta *et al.* (2014) melaporkan bahwa jalur intrinsik diaktivasi karena adanya kontak dengan dinding sel endotelium yang terluka dan tereksposnya kolagen sehingga jalur intrinsik ini juga disebut dengan jalur aktivasi kontak. Jalur intrinsik diinisiasi dengan adanya pelepasan senyawa asing yang bermuatan negatif seperti kolagen, dinding subendotelial, atau fosfolipida yang disekresikan oleh trombosit sehingga mengaktifkan faktor XII menjadi XIIa. Faktor XIIa bersama dengan faktor Fitzgerald (*high molecular weight kininogen* (HMWK)) dan faktor Fletcher (prekallikrein) akan mengaktifkan faktor XI menjadi Xia. Selanjutnya, faktor Xia dan ion Ca^{2+} akan mengaktifkan faktor IX menjadi Ixa. Ion kalsium juga berperan dalam tahap selanjutnya pada jalur intrinsik ini, yaitu ketika bersama faktor Ixa, VIIa, dan fosfolipida faktor keping darah 3 (*platelet*

factor 3 (PF3)) mengaktifkan jalur umum (faktor X menjadi faktor Xa) (Escobar 2002).

Pertemuan jalur intrinsik dan ekstrinsik adalah pembentukan faktor Xa (jalur umum). Faktor koagulasi ini mengkatalisis perubahan protrombin menjadi trombin (faktor Iia) pada jalur akhir dengan bantuan faktor Va, PF3, dan ion Ca^{2+} (Escobar, 2002). Trombin mengaktifkan faktor XIII menjadi XIIIa serta memotong fibrinopeptida dari fibrinogen yang larut air menjadi monomer fibrin yang masih larut air. Selanjutnya, faktor XIIIa membentuk ikatan silang polimer fibrin sehingga menjadi polimer fibrin yang tidak larut air. Inisiasi reaksi berantai pembentukan bekuan fibrin ini dipengaruhi oleh pengaktifan faktor-faktor pembekuan darah yang prosesnya berbentuk reaksi berantai (Olson dan Bjork 1994; Katzung 2018). Setiap reaksi merupakan akibat dari reaksi sebelumnya. Jika satu di antara faktor-faktor tersebut tidak dapat diaktifkan, maka akan mengakibatkan pembekuan darah semakin

TAFI, pendegradasian fibrin juga diregulasi (PAI-1) yang menghambat t-PA dan oleh penghambat dari aktivator plasminogen, urokinase, seperti penghambat aktivator plasminogen-1

Tabel 1. Pangan fermentasi beserta mikroorganisme GRAS penghasil enzim fibrinolitik di wilayah Asia

Mikroorganisme	Pangan	Enzim	Referensi
<i>Bacillus subtilis</i> var natto	<i>Vegetable cheese, Natto</i> , Jepang	Nattokinase	(Sumi <i>et al.</i> , 1987)
<i>Bacillus natto</i> , NK	<i>Natto</i> , Jepang	Nattokinase	(Fujita <i>et al.</i> , 1993)
<i>Bacillus</i> sp. DJ-4	<i>Doen-jang</i> , Korea	Subtilisin DJ-4	(Kim dan Choi, 2000)
<i>Bacillus subtilis</i> IMR-NK1	<i>Natto</i> , Jepang	Nattokinase	(Chang <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus</i> sp. KDO-13	<i>Soybeanpaste</i> , Korea	-	(Lee <i>et al.</i> , 2001)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Tempe</i> , Indonesia	<i>E. faecalis</i> BRCA-5	(Yoon <i>et al.</i> , 2002)
<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	<i>Fermented soybean, Douchi</i> , China	Subtilisin DFE	(Peng <i>et al.</i> , 2003)
<i>Bacillus subtilis</i> KCK-7	<i>Chungkook-jang</i> , Korea	Serine protease KCK-7	(Paik <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bacillus</i> sp. DJ-	<i>Doen-jang</i> , Korea	bpDJ-2	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Rhizopus chinensis</i> 12	Arak China, China	-	(Xiao-lan <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bacillus subtilis</i> TP-6	<i>Tempe</i>	Tpase	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus subtilis</i> DC 33	<i>Babao Douchi</i> , China	Subtilisin DC33	(Wang <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus vallismortis</i> Ace02	<i>Chungkook-jang</i> , Korea	Ace02	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
<i>Fusarium</i> sp. BLB	<i>Tempe</i> , Indonesia	-	(Sugimoto <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. amyloliquefaciens</i> CH51	<i>Fermented soy, Cheonggukjang</i> , Korea	AprE51	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
<i>Staphylococcus</i> sp. AJ	<i>Fermented Anchovy-jeot</i> , Korea	AJ	(Choi <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. amyloliquefaciens</i> CH86-1	<i>Fermented soy, Cheonggukjang</i> , Korea	BacillopeptidaseF AprE86-1	(Lee <i>et al.</i> , 2010; Kwon <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Fermented chickpeas</i> , China	-	(Wei <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> MJ5-41	<i>Fermented soy, Meju</i> , Korea	-	(Jo <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	<i>Fermented soybean, Douchi</i> , China	Subtilisin DFE	(Wang <i>et al.</i> , 2008; Yuan <i>et al.</i> , 2012)
<i>Bacillus pumillus</i>	<i>Gembus</i> , Indonesia	-	(Afifah <i>et al.</i> , 2014a)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Soy flour</i>	-	(Gad <i>et al.</i> , 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> MH12B1, <i>B. subtilis</i> MH12B3, <i>B. subtilis</i> MH10B5, dan <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MH18B1	<i>Fermented soybean, Hawaii</i> , India	-	(Singh <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. amyloliquefaciens</i> FCF-11	Tepung jagung fermentasi	FCF-11	(Kotb, 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> ZA400	<i>Kimchi</i> , Korea	BsfA	(Ahn <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	<i>Vietnamese fermented shrimp paste</i> , Vietnam	-	(Anh <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus cereus</i> 13 BN	<i>Fermented shrimp paste, Belacan</i> , Malaysia	-	(Zakaria <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bacillus subtilis</i> HK176	<i>Fermented soybean, Cheonggukjang</i> , Korea	AprE176	(Jeong <i>et al.</i> , 2015)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Vietnamese fermented soybean paste, miso dan cabai hijau</i>	-	(Huy <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus megaterium</i> KSK-07	<i>Kishk</i>	-	(Kotb, 2015)
<i>Bacillus subtilis</i> K2	<i>Moromi</i> Indonesia	-	(Syahbanu <i>et al.</i> , 2020a, Syahbanu <i>et al.</i> , 2020b, Syahbanu <i>et al.</i> , 2022)

penghambat aktivator plasminogen-2 (PAI-2) hanya bekerja menghambat urokinase, serta α 2- penghambat plasmin (α 2-PI) yang bekerja menghambat plasmin (Cesarman-Maus dan Hajjar, 2005).

Enzim Fibrinolitik

Enzim fibrinolitik merupakan kelompok protease serin yang mampu menghancurkan bekuan darah (fibrin) dalam berbagai penyakit trombosis. Dalam keadaan normal, secara seimbang tubuh mengalami pembentukan bekuan darah dan fibrinolisis dengan menghasilkan plasmin untuk menghidrolisis fibrin. Selain dihasilkan langsung oleh tubuh manusia (urokinase, aktivator plasminogen jaringan), enzim fibrinolitik juga telah berhasil diperoleh dari berbagai sumber, yaitu dari hewan (cacing tanah (lumbrokinase) (Nakajima *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007), venom ular (fibrolase) (Randolph *et al.*, 1992)), pangan fermentasi (*natto* (Nattokinase) (Fujita *et al.*, 1993) dan *skipjack* (*katsuwokinase*) (Sumi *et al.*, 1995)), dan mikroorganisme, seperti *Actinomyces* (Uesugi *et al.*, 2011), bakteri (Chang *et al.*, 2012). Enzim-enzim tersebut telah diproduksi secara komersial untuk pengobatan yang dapat menghancurkan bekuan darah pada trombosis pembuluh darah serta infark miokardium maupun embolisme paru. Pengobatan oleh enzim ini biasanya melalui intravena yang diberikan segera setelah serangan jantung untuk menghancurkan bekuan darah dalam arteri.

Enzim fibrinolitik yang bersumber dari bahan pangan diharapkan dapat digunakan sebagai fortifikan makanan dan nutrasetikal yang mencegah terjadinya pengentalan maupun pembekuan darah sehingga mencegah terjadinya penyakit kardiovaskuler (Kotb, 2012). Protease fibrinolitik yang diperoleh dari mikroorganisme mempunyai kelebihan, yaitu dapat diproduksi dalam jumlah besar, produktifitasnya mudah ditingkatkan dan mutunya lebih seragam, serta harganya lebih murah (Rao *et al.* 1998; Stanbury *et al.* 2003). Hal ini menyebabkan meluasnya penggunaan mikroorganisme sebagai penghasil enzim.

Aktivitas Enzim Fibrinolitik pada Pangan Fermentasi

Produk pangan fermentasi dihasilkan dengan melibatkan aktivitas mikroba dalam produksinya. Kandungan senyawa aktif dalam berbagai pangan fermentasi diduga dapat mempengaruhi sirkulasi darah adalah enzim protease yang mempunyai aktivitas fibrinolitik. Data mengenai penelitian yang melaporkan adanya aktivitas fibrinolitik pada berbagai pangan fermentasi Asia ditunjukkan pada Tabel 1.

Pemanfaatan Enzim Fibrinolitik

Enzim fibrinolitik Nattokinase dari *natto* memiliki banyak kelebihan diantaranya aman dikonsumsi secara oral, stabil dalam gastrointestinal, memiliki kemampuan untuk melewati sistem intestinal, efek sistemik yang berkepanjangan, serta peningkatan produksi endogen plasmin dan agen penghancur bekuan darah lainnya (Fujita *et al.*, 1995a). Konsumsi Nattokinase baik secara oral (Sumi *et al.*, 1990; Yamashita *et al.*, 2003) maupun aplikasi melalui intravena (Kamiya *et al.*, 2010) terbukti meningkatkan aktivitas fibrinolitik plasma pada model tikus tanpa menyebabkan terjadinya reaksi alergi, mengaktifkan produksi *tissue-plasminogen activator* (tPA) (Fujita *et al.*, 1995b), serta dapat menghambat *plasminogen activator inhibitor* I (PAI-1) (Urano *et al.*, 2001). Suplemen pangan fermentasi kedelai juga dapat membantu pencegahan kondisi pembekuan darah dalam sistem sirkulasi (Suzuki *et al.*, 2003; Kamiya *et al.*, 2010). Pangan fermentasi biasanya dikaitkan atau diasosiasikan dengan bakteri asam laktat, khamir, *Bacillus* spp., dan kapang, tetapi jarang diasosiasikan dengan *Actinomyces*. Sebagian besar enzim-enzim fibrinolitik (yang telah dilaporkan dari berbagai studi) dihasilkan dari berbagai strain *Bacillus* spp. dari beragam jenis produk pangan fermentasi kedelai maupun ikan (Tabel 1).

Kondisi saat ini agen trombolitik yang digunakan dalam mengatasi penyakit trombosis adalah streptokinase yang berasal dari bakteri *Streptococcus hemolyticus* dan Stafilokinase dari *Staphylococcus aureus*. Dua agen trombolitik tersebut yang lebih dahulu diketahui efektif untuk terapi trombolitik (Collen dan Lijnen, 2004). Mikroba penghasil enzim fibrinolitik yang

tergolong kategori GRAS (*Generally Recognized As Safe*) telah menarik banyak perhatian karena memiliki efek samping yang lebih sedikit. Respon imun yang tidak diinginkan seperti reaksi alergi yang disebabkan oleh mikroba penghasil enzim fibrinolitik dapat diatasi dengan memilih mikroba asal pangan fermentasi. Pada umumnya, mikroba yang berasal dari pangan fermentasi tergolong GRAS serta terbukti aman digunakan sebagai agen trombolitik (Yoon *et al.*, 2002; Mine *et al.*, 2005; Simkhada *et al.*, 2010; Afifah *et al.*, 2014a; Kurnia *et al.*, 2017; Stephani *et al.*, 2017)

Mikroba khususnya bakteri merupakan salah satu sumber enzim fibrinolitik. *Bacillus* spp. merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang terkenal dapat memproduksi enzim fibrinolitik. Penemuan Nattokinase dari produk natto, pangan fermentasi dari Jepang (Sumi *et al.*, 1987; Fujita *et al.*, 1993) yang memiliki efek positif bagi kesehatan menyebabkan para peneliti melakukan eksplorasi, baik pada enzim fibrinolitik maupun spesies *Bacillus* penghasil enzim fibrinolitik dari berbagai pangan fermentasi. Sebagian besar dari enzim fibrinolitik telah dilaporkan berasal dari berbagai *Bacillus* spp. dari beragam sumber (termasuk dari sumber perairan tertentu (Mahajan *et al.*, 2010)), seperti *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. firmus*, *B. sphaericus* (Fujita *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2003; Seo dan Lee, 2004). Enzim-enzim fibrinolitik umumnya tersebut tergolong ke dalam kelompok protease subtilisin (Peng *et al.* 2005). Enzim fibrinolitik yang berhasil

diisolasi dari spesies *Bacillus* tersebut memiliki bobot molekuler yang beragam (Tabel 2). Berdasarkan pada Tabel 2, bobot molekul enzim fibrinolitik yang diproduksi oleh genus *Bacillus* memiliki kisaran 14-63 kDa.

Enzim dari *Bacillus* umumnya mendegradasi fibrin secara langsung karena bersifat sebagai *plasmin-like protein*. Banyak *Bacillus* probiotik yang tersedia komersial di pasaran serta memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim fibrinolitik yang merupakan suatu nilai tambah fungsional untuk bakteri probiotik. Hal ini disebabkan, beberapa genus dari *Bacillus* spp. yang bersifat *food grade* yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim fibrinolitik tersebut dapat digunakan dalam formulasi pangan fungsional. Oleh karena itu, strain *Bacillus* probiotik perlu dipilah untuk kemampuan dalam menghasilkan enzim fibrinolitik sebagai nilai tambah yang menguntungkan (Duc *et al.* 2004; Yogesh dan Halami 2017). Enzim fibrinolitik mendegradasi fibrin melalui proses enzimatik dan biokimia. Ada berbagai enzim yang saat ini digunakan sebagai pengobatan untuk CVD, seperti streptokinase, nattokinase, staphylokinase, dan urokinase. Selain sebagai agen anti-trombosis, berdasarkan hasil *in vitro* dari beberapa peneliti juga menunjukkan bahwa enzim fibrinolitik seperti nattokinase berpotensi sebagai anti-hipertensi, anti-aterosklerosis, antiplatelet, dan pelindung saraf (Chen *et al.*, 2018), anti-alzheimer (Fadl *et al.*, 2013), anti-diabetes (Araki *et al.*, 2020), dan antioksidan (Amin *et al.*, 2020).

Tabel 2. Spesies *Bacillus* dengan enzim fibrinolitik beserta metode produksi enzim, bobot molekuler, nilai pI dan pH optimum, serta suhu optimum

<i>Bacillus</i> sp.	Enzim Fibrinolitik	Metode Produksi Enzim Fibrinolitik	Bobot Molekul, pI, pH, dan Suhu Optimum	Referensi
<i>Bacillus subtilis</i>	Nattokinase	Media produksi: Tryptic Soy broth Lama fermentasi: 48 jam pada <i>shaking incubator</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 370C	27.7 kDa, pI 8.6	(Sumi <i>et al.</i> 1987)

<i>Bacillus</i> sp.	Enzim Fibrinolitik	Metode Produksi Enzim Fibrinolitik	Bobot Molekul, pI, pH, dan Suhu Optimum	Referensi
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Vpr dan Wpr	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 12 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	63 kDa dan 52 kDa	(Park <i>et al.</i> 2002)
<i>Bacillus subtilis</i> QK-02	QK1 dan QK2	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 12 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	42 kDa dan 28 kDa, pH 8.5, 55 °C	(Ko <i>et al.</i> 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> A26	Subtilisin BSF1	Media produksi: ST medium (5 g Bacto-tryptone, 5 g NaCl and 5 g Na HPO per liter of soybean extract solution, pH 7.5) Lama fermentasi: 24-48 jam pada <i>rotary shaker</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	pH 9.0, 60 °C	(Agrebi <i>et al.</i> 2009a; Agrebi <i>et al.</i> 2009b)
<i>Bacillus subtilis</i> KCK-7	KCK-7	Media produksi: culture broth (5% soluble starch, 0.5% cellobiose, 0,3% beef extract, 0.5% pepton, 0.02% Na ₂ HPO ₄ , 2% raw soybean meal) Lama fermentasi: 48 jam pada <i>rotary shaker</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 37°C	45 kDa, pH 7.0, 60 °C	(Paik <i>et al.</i> 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> TP-6	TPase	Media produksi: <i>nutrient broth</i> (pH 7.0) terdiri dari 5 soytone, 5 beef extract, dan 20 g xylose Lama fermentasi: 48 jam pada <i>fermentor</i> 1,000 rpm, laju aerasi 1 vol/vol/menit Suhu fermentasi: 37°C	27.5 kDa	(Kim <i>et al.</i> 2006)
<i>Bacillus subtilis</i>	DC33	Media produksi: 14 g/l tryptone, 2 g/l galactose, 1 g/l KH ₂ PO ₄ , 2 g/l Na ₂ HPO ₄ , 0.2 g/l MgSO ₄ , 3 g/l CaCO ₃ , 0.01 g/l FeCl ₃ , dan 0.01 g/l LiSO ₄ ; pH 7.2 Lama fermentasi: 72 jam pada <i>shaking incubator</i> 140 rpm Suhu fermentasi: 37°C	pI 8.7, pH 8.0, 55 °C	(Wang <i>et al.</i> 2006)
<i>Bacillus subtilis</i> LD-8547	LD8547	Media produksi: <i>rice powder</i> 5%, <i>soybean powder</i> 4%, NH ₄ NO ₃ 0.5%, CaCl ₂ 0.01%, MgSO ₄ 0.7%, K ₂ HPO ₄ 0.4%, KH ₂ PO ₄ 0.2%; pH 7.0 Lama fermentasi: 72 jam pada <i>shaking incubator</i> 400 rpm Suhu fermentasi: 35°C	pH 8.0, 50 °C	(Wang <i>et al.</i> 2008)

<i>Bacillus</i> sp.	Enzim Fibrinolitik	Metode Produksi Enzim Fibrinolitik	Bobot Molekul, pI, pH, dan Suhu Optimum	Referensi
<i>Bacillus subtilis</i> K42	Co ²⁺ Metalloprotease K42	Media produksi: 1% galactose, 0.5% NaCl, 0.5% CaCO ₃ , 0.5% tryptone, 0.3% soybean, 0.15% MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.08% KH ₂ PO ₄ , 0.02% K ₂ HPO ₄ , 0.005% CuSO ₄ dan 0.001% FeSO ₄ ; pH 6 Lama fermentasi: 54 jam pada <i>rotatory shaker</i> 200 rpm Suhu fermentasi: 37°C	20.5 kDa, pH 9.4, 40-65 °C	(Hassanein <i>et al.</i> 2011)
<i>Bacillus subtilis</i> A1	Bacillokinaase II	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	31.4 kDa	(Jeong <i>et al.</i> 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> BR21	Multiple proteases	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 100 rpm Suhu fermentasi: 37°C	14, 21, 35, dan 46 kDa	(Yogesh dan Halami 2015)
<i>Bacillus subtilis</i> YJ1	Nattokinase	Media produksi: 1% skim milk, 1% rice husk, 0.5% NaCl, and 0.25% glucose Lama fermentasi: 96 jam pada <i>shaking incubator</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 37°C	27.5 kDa	(Yin <i>et al.</i> 2010)
<i>B. amyloliquefaciens</i> CH51	AprE51	Media produksi: Tryptic Soy broth Lama fermentasi: 48 jam pada <i>shaking incubator</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 37°C	27 kDa	(Kim <i>et al.</i> 2009)
<i>B. amyloliquefaciens</i> MJ5-41	AprE5-41	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	27 kDa, pH 7.0, 45 °C	(Jo <i>et al.</i> 2011a)
<i>B. amyloliquefaciens</i> LSSE-62	Subtilisin DJ-4	Media produksi: 10 g/L maltose, 8.28 g/L soy peptone, 0.74 g/L yeast extract, 0.64 g/L CaCl ₂ . 2H ₂ O, 1 g/L K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O, dan 0.5 g/L MgSO ₄ . 7H ₂ O; pH 7.2 Lama fermentasi: 48 jam pada <i>shaking incubator</i> 180 rpm Suhu fermentasi: 37°C	29 kDa	(Wei <i>et al.</i> 2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4	Subtilisin DFE	Media produksi: 2% fibrin, 0.5% peptone, 2% dextrin, 0.15% yeast extract, 0.4% K ₂ HPO ₄ , 0.04% NaH ₂ PO ₄ , 0.3% CaCO ₃ ; pH 7.2 Lama fermentasi: 72 jam pada <i>shaking incubator</i> 210 rpm Suhu fermentasi: 37°C	28 kDa, pI 8, pH 10, 48 °C	(Peng <i>et al.</i> 2003)

<i>Bacillus</i> sp.	Enzim Fibrinolitik	Metode Produksi Enzim Fibrinolitik	Bobot Molekul, pI, pH, dan Suhu Optimum	Referensi
<i>B. amyloliquefaciens</i> FCF-11	FCF-11	Media produksi: 2 % corn husk, 0.1 % MgSO ₄ . 7H ₂ O, 0.08 % KH ₂ PO ₄ , dan 0.02 % K ₂ HPO ₄ ; pH 6.5 Lama fermentasi: 72 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 40°C	18.2 kDa, pH 8, 40 °C	(Kotb 2014)
<i>B. licheniformis</i> KJ-31	bpKJ 31	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	37 kDa	(Hwang <i>et al.</i> 2007)
<i>B. licheniformis</i> CH3-17	AprE3-17	Media produksi: Tryptic Soy broth Lama fermentasi: 48 jam pada <i>jar fermenter</i> laju alir udara sebesar 1 vol/vol/menit Suhu fermentasi: 37°C	27 kDa, pH 6.0	(Jo <i>et al.</i> 2011b)
<i>Bacillus</i> sp. DJ-4	Subtilisin DJ-4	Media produksi: Luria-Bertani (MLB) medium (1% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 5% NaCl and 2.5% glucose Lama fermentasi: 12 jam pada <i>bioreactor</i> Suhu fermentasi: 37°C	29 kDa, pH 10, 40 °C	(Kim dan Choi 2000)
<i>Bacillus</i> sp. KA 38	Enzim Jeot gal	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	41 kDa, pH 7, 40 °C	(Kim <i>et al.</i> 1997)
<i>B. vallismortis</i> Ace02	Ace02	Media produksi: 20 g dextrin, 20 g soybean meal, 5 g yeast extract, 0.2 g MgSO ₄ . 7H ₂ O, 0.2 g CaCl ₂ , 2 g K ₂ HPO ₄ , dan 0.2 g Na ₂ HPO ₄ ; pH 7.0 Lama fermentasi: 48 jam pada <i>jar fermenter</i> laju alir udara sebesar 1 vol/vol/menit, 30% air saturation Suhu fermentasi: 37°C	28 kDa	(Kim <i>et al.</i> 2007)
<i>Bacillus</i> sp. AS-S20-I	Bafibrinase	Media produksi: Tryptic Soy broth Lama fermentasi: 48 jam pada <i>shaking incubator</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 37°C	32.3 kDa, pH 7.4, 37 °C	(Mukherjee <i>et al.</i> 2012)
<i>Bacillus sphaericus</i>	Thrombinase	Media produksi: <i>nutrient yeast salt medium</i> (NYSM) Lama fermentasi: 7 jam pada <i>shaking incubator</i> 200 rpm Suhu fermentasi: 30°C	18.6 kDa	(Balaraman dan Prabakaran 2007)
<i>Bacillus</i> sp. CK-11	CK	Media produksi: media basal yang mengandung 0.3% ekstrak daging sapi, 0.5% pepton, 1% soya, dan 1% kasein susu; pH disesuaikan	28.2 kDa; pH 10, 70 °C	(Kim <i>et al.</i> 1996)

<i>Bacillus</i> sp.	Enzim Fibrinolitik	Metode Produksi Enzim Fibrinolitik	Bobot Molekul, pI, pH, dan Suhu Optimum	Referensi
		menjadi 7.0 dengan 1 M HCl atau 1 M NaOH. Lama fermentasi: 16 jam pada <i>jar fermenter</i> laju alir udara sebesar 1 vol/vol/menit Suhu fermentasi: 40°C Media produksi: Tryptic Soy broth		
<i>Bacillus</i> sp. DJ-2	bpDJ-2	Lama fermentasi: 48 jam pada <i>shaking incubator</i> 150 rpm Suhu fermentasi: 37°C	42 kDa, pI 3.5–3.7, pH 9, 60 °C	(Choi <i>et al.</i> 2005)
<i>Bacillus pumilus</i>	Protease serin kelompok subtilisin	Media produksi: Luria Bertani broth Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C Media produksi: Luria Bertani broth	20 kDa, pH 7, 50 °C	(Afifah <i>et al.</i> 2014b)
<i>Bacillus subtilis</i> K2	Protease serin kelompok subtilisin	Lama fermentasi: 24 jam pada <i>shaking incubator</i> 120 rpm Suhu fermentasi: 37°C	26 kDa, pH 7	(Syahbanu <i>et al.</i> 2020a, Syahbanu <i>et al.</i> 2020b)

KESIMPULAN

Fibrin adalah komponen protein utama dari bekuan darah dan terbentuk dari fibrinogen oleh trombin. Kondisi saat hemostasis yang terganggu, akumulasi fibrin dalam pembuluh darah dapat meningkatkan peluang terjadinya trombosis menyebabkan infark miokard dan penyakit kardiovaskular. Bekuan fibrin dilisis dengan plasmin, yang diaktifkan dari plasminogen oleh aktivator plasminogen jaringan (tPA). Agen trombolitik yang umum digunakan untuk tujuan therapeutic yaitu urokinase dan aktivator plasminogen jaringan (tPA). Kedua aktivator ini berasal dari manusia dan aman untuk digunakan, tetapi harganya mahal. Enzim fibrinolitik dari *Bacillus* sp. lebih dipilih sebagai agen trombolitik karena bekerja efisien dalam proses fibrinolitik termasuk dapat bekerja untuk mengaktifkan plasmin. Subtilisin dari *Bacillus* sp. telah diidentifikasi memiliki aktivitas protease yang spesifik. Para peneliti telah mengidentifikasi enzim fibrinolitik dari *Bacillus* sp. strain CK 11-4,

yang diisolasi dari pangan fermentasi kecap kedelai fermentasi Korea. Enzim fibrinolitik juga dimurnikan dan dikarakterisasi dari *Bacillus* sp. KA 38, yang berasal dari ikan fermentasi, serta dari Indonesia berupa enzim fibrinolitik asal *Bacillus subtilis* yang berhasil diisolasi dari tempe gembus dan moromi. Studi ini relevan dengan bahan baku pangan sehat yang berasal dari pangan fermentasi. Pangan fermentasi tradisional Asia ini dapat menjadi sumber enzim fibrinolitik yang dimanfaatkan untuk terapi trombolitik. Potensinya dalam melarutkan bekuan fibrin membuka peluang pangan fermentasi sebagai sumber enzim fibrinolitik alternatif yang digunakan dalam penanganan penyakit kardiovaskular. Enzim ini memiliki potensi signifikan untuk fortifikasi makanan dan aplikasi nutraceutical, sehingga penggunaannya dapat mencegah penyakit kardiovaskular akan lebih efektif. Enzim fibrinolitik untuk keperluan medis sangat mahal, memiliki potensi pangan fermentasi maka dimungkinkan produksi enzim

fibrinolitik dalam jumlah besar dengan bahan yang lebih mudah ditemukan dan efisien.

DAFTAR PUSTAKA

- [WHO] World Health Organization. (2021). Cardiovascular diseases (CVDs), 2022. [https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [11 Januari 2023].
- Abusham, R.A.K., Masomian, M., Salleh, A.B., Leow, A.T.C., Abd Rahman, R.N.Z.R. (2019). An in-Silico Approach to Understanding the Structure-Function: A Molecular Dynamics Simulation Study of Rand Serine Protease Properties from *Bacillus subtilis* in Aqueous Solvents. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 12(1):009–0017. doi:10.19080/aibm.2019.12.555834.
- Afifah, D.N., Sulchan, M., Syah, D., Yanti, Suhartono, M.T. (2014). Isolation and identification of fibrinolytic protease-producing microorganisms from Red Oncom and Gembus, Indonesian fermented soybean cakes. *Malays. J. Microbiol.* 10(4):273–279. doi:10.21161/mjm.61914.
- Afifah, D.N., Sulchan, M., Syah, D., Yanti, Suhartono, M.T., Kim, J.H. (2014). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus pumilus* 2.g isolated from gembus, an Indonesian fermented food. *Prev. Nutr. Food Sci.* 19(3):213–219. doi:10.3746/pnf.2014.19.3.213.
- Agrebi, R., Haddar, A., Hajji, M., Frikha, F., Manni, L., Nasri, M. (2009). Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization. *Can. J. Microbiol.* 55:1049–1061. doi:10.1139/W09-057.
- Agrebi, R., Haddar, A., Hmidet, N., Jellouli, K., Manni, L., Nasri, M. (2009). BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. *Process Biochem.* 44(11):1252–1259. doi:10.1016/j.procbio.2009.06.024.
- Ahn, M., Ku, H., Lee, S., Lee, J. (2015). Characterization of a novel fibrinolytic enzyme, bsfa, from *Bacillus subtilis* ZA 400 in kimchi reveals its pertinence to thrombosis treatment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(12):2090–2099. doi:10.4014/jmb.1509.09048.
- Amin, K., Zeng, X., You, Y., Hu, Y., Sun, H., Lyu, B., Piao, C. and Yu, H., 2020. Enhanced thermostability and antioxidant activity of Nattokinase by biogenic enrichment of selenium. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4): 2145-2154.
- Anh, D.B.Q., Mi, N.T.T., Huy, D.N.A., Hung, P.Van. (2015). Isolation and Optimization of Growth Condition of *Bacillus* sp . from Fermented Shrimp Paste for High Fibrinolytic Enzyme Production. *Arab. J. Sci. Eng.* 40:23–28. doi:10.1007/s13369-014-1506-8.
- Arai, K., Mimuro, J., Madoiwa, S., Matsuda, M., Sako, T., Sakata, Y. (1995). Effect of staphylokinase concentration of plasminogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1245:69–75. doi:10.1016/0304-4165(95)00064-i.
- Araki, R., Fujie, K., Yuine, N., Watabe, Y., Maruo, K., Suzuki, H. and Hashimoto, K., 2020. The possibility of suppression of increased postprandial blood glucose levels by gamma-polyglutamic acid-rich natto in the early phase after eating: a randomized crossover pilot study. *Nutrients*, 12(4): 915.
- Ariëns, R.A.S. (2013). Fibrinogen) and thrombotic disease. *J. Thromb. Haemost.* 11(SUPPL.1):294–305. doi:10.1111/jth.12229.
- Astrup, T., Miillertz, S. (1952). The Fibrin Plate Method for Estimating Fibrinolytic Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40:346–351. doi:10.1016/0003-9861(52)90121-5.
- Atmakusuma, T.D., Tambunan, K.L., Sukrisman, L., Effendi, S., Rachman, A., Setiawati, A., Rinaldi, I., Mulansari, N.A., Rajabto, W., Nasution, S.A, *et al.* (2015). Underutilization of anticoagulant for venous thromboembolism prophylaxis in three hospitals in Jakarta. *Acta Med. Indones.* 47(2):136–145.
- Balaraman, K., Prabakaran, G. (2007). Production & purification of a fibrinolytic enzyme (thrombinase) from *Bacillus sphaericus*. *Indian J. Med. Res.* 126:459–464.
- Bornikova, L., Peyvandi, F., Allen, G., Bernstein, J., Manco-Johnson, M.J. (2011). Fibrinogen replacement therapy for congenital fibrinogen deficiency. *J. Thromb. Haemost.* 9(9):1687–1704. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04424.x.

- Cesarman-Maus, G., Hajjar, K.A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129(3):307–321.doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
- Chakraborty, N., Besra, A., Basak, J. (2020). Molecular Cloning of an Amino Acid Permease Gene and Structural Characterization of the Protein in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol. Biotechnol.*(0123456789).doi:10.1007/s12033-020-00240-4.
- Chang, C., Fan, M., Kuo, F., Sung, H. (2000). Potent Fibrinolytic Enzyme from a Mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agric. Food Chem.* 48(8):3210–3216.doi:10.1021/jf000020k.
- Chang, C.T., Wang, P.M., Hung, Y.F., Chung, Y.C. (2012). Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. *Food Chem.* 133(4):1611–1617.doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.061.
- Chen, H.M., Guan, A.L, Marklands, F.S. (1991). Immunological properties of the fibrinolytic enzyme (fibrolase) from southern copperhead (Agkistrodon contortrix contortrix) venom and its purification by immunoaffinity chromatography. *Toxicon.* 29(6):683–694.doi:10.1016/0041-0101(91)90060-5.
- Chen, H., McGowan, E.M., Ren, N., Lal, S., Nassif, N., Shad-Kaneez, F., Qu, X. and Lin, Y., 2018. Nattokinase: a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Biomarker insights*, 13, p.1177271918785130.
- Cho, I.H., Choi, E.S., Lee, H.H. (2004). Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm *Lumbricus rubellus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(5):574–581.doi:10.5483/bmbrep.2004.37.5.574.
- Cho, I.H., Choi, E.S., Lim, H.G., Lee, H.H. (2004). Purification and Characterization of Six Fibrinolytic Serine-Proteases from Earthworm *Lumbricus rubellus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37(2):199–205.doi:10.5483/bmbrep.2004.37.2.199.
- Choi, N.S., Ki-Hyun, Y., Hahm, J.H., Yoon, K.S., Chang, K.T., Hyun, B.H., Pil, J.M., Kim S.H. (2005). Purification and characterization of a new peptidase, bacillopeptidase DJ-2, having fibrinolytic activity: produced by *Bacillus* sp. DJ 2 from Doen-Jang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15(1):72–79.
- Choi, N.S., Song, J.J., Chung, D.M., Kim, Y.J., Maeng, P.J., Kim, S.H. (2009). Purification and characterization of a novel thermoacid-stable fibrinolytic enzyme from *Staphylococcus* sp. strain AJ isolated from Korean salt-fermented Anchovy-joet. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(3):417–426.doi:10.1007/s10295-008-0512-9.
- Collen, D., Lijnen, H.R. (2004). Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account. *J. Thromb. Haemost.* 2(4):541–546.doi:10.1111/j.1538-7933.2004.00645.x.
- La Corte, A.L.C., Philippou, H., Arins, R.A.S. (2011). *Role of fibrin structure in thrombosis and vascular disease*. Ed ke-1 Volume ke-83. Elsevier Inc.
- Dabbagh, F., Negahdaripour, M., Berenjian, A., Behfar, A., Mohammadi, F., Zamani, M., Irajie, C., Ghasemi, Y. (2014). Nattokinase: production and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(22):9199–9206.doi:10.1007/s00253-014-6135-3.
- Delange, R.J., Smith, E.L. (1968). Subtilisin Carlsberg: Amino acid composition, isolation, and composition of peptides from the tryptic hydrolysate. *J. Biol. Chem.* 243(9):2134–2143.
- DeLano WL. 2002. Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr.* 40:82–92.
- Duc, L.H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Adriano, O., Cutting, S.M. (2004). Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4):2161–2171.doi:10.1128/AEM.70.4.2161.
- 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.
- Escobar, C. (2002). Ioteknologi & iosains. Dalam Harmening DM (ed). *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. Ed ke-4. FA Davis, Philadelphia (US).
- Fadl, N.N., Ahmed, H.H., Booles, H.F. and Sayed, A.H., 2013. Serrapeptase and nattokinase intervention for relieving Alzheimer's disease pathophysiology in rat model.

- Human & experimental toxicology, 32(7): 721-735.
- Fan, Q., Wu, C., Li, L., Fan, R., Wu, C., Hou, Q., He, R. (2001). Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1526(3):286–292.doi:10.1016/S0304-4165(01)00140-4.
- Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K., Nishimuro, S. (1995). Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. *Biol. Pharm. Bull.* 18(9):1194–1196.doi:10.1248/bpb.18.1194.
- Fujita, M., Ito, Y., Hong, K., Nishimuro, S. (1995). Characterization of nattokinase-degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. *Fibrinolysis and Proteolysis.* 9(3):157–164.doi:10.1016/S0268-9499(95)80005-0.
- Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., Nishimuro, S. (1993). Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197(3):1340–1347.doi:10.1006/bbrc.1993.2624.
- Fuka, M.M., Engel, M., Haesler, F., Welzl, G., Munch, J.C., Schloter, M. (2008). Diversity of proteolytic community encoding for subtilisin in an arable field: Spatial and temporal variability. *Biol. Fertil. Soils.* 45(2):185–191.doi:10.1007/s00374-008-0319-x.
- Furlan, M. (1988). Structure of fibrinogen and fibrin. Dalam J. L. Francis (ed.) in *Fibrinogen, Fibrin Stabilization, and Fibrinolysis: Clinical, Biochemical and Laboratory Aspects*. Ed ke-4 hlm. 17–64. Ellis Horwood, Ltd., New York, USA.
- Gad, R.G. (2014). Fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens*: optimisation and scale up studies. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6(10):370–378.
- Gardner, M.L.G. (1988). Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 8:329–350.doi:10.1146/annurev.nu.08.070188.001553.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Dalam Walk JM (ed.) in *The Proteomics Protocols Handbook*. hlm. 571–608. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Geer, L.Y., Domrachev, M., Lipman, D.J., Bryant, S.H. (2002). CDART: Protein homology by domain architecture. *Genome Res.* 12(10):1619–1623.doi:10.1101/gr.278202.
- Gholami, A., Shahin, S., Mohkam, M., Nezafat, N., Ghasemi, Y. (2015). Cloning, Characterization and Bioinformatics Analysis of Novel Cytosine Deaminase from *Escherichia coli* AGH09. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 21(3):365–374.doi:10.1007/s10989-015-9465-9.
- Głowacka, A.E., Podstawka, E., Szczesna-Antczak, M.H., Kalinowska, H., Antczak, T. (2005). Kinetic and molecular properties of *Bacillus subtilis* IBTC-3 subtilisin. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 140(2):321–331.doi:10.1016/j.cbpc.2004.10.015.
- Hassanein, W., Kotb, E., Awany, N., El-Zawahry, Y. (2011). Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42. *J. Biosci.* 36:773–779.doi:10.1007/s12038-011-9151-9.
- Hill, M., Dolan, G. (2008). Diagnosis, clinical features and molecular assessment of the dysfibrinogenemias. *Haemophilia.* 14(5):889–897.doi:10.1111/j.1365-2516.2008.01795.x.
- Huy, D., Hao, P., Hung, P. (2016). Screening and identification of *Bacillus* sp. isolated from traditional Vietnamese soybean-fermented products for high fibrinolytic enzyme production. 23(1):326–331.
- Hwang, K.J., Choi, K.H., Kim, M.J., Park, C.S., Cha, J. (2007). Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of *Bacillus licheniformis* KJ-31, isolated from Korean traditional Jeot-gal. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(9):1469–1476.
- Ismail, D., Harun, S., Alwi, I., Tambunan, K.L., Effendy, S. (2002). Anti-thrombin III, Protein C, and Protein S deficiency in acute coronary syndrome. *Med. J. Indones.* 11(2):87–92.doi:10.13181/mji.v11i2.54.
- Jain, S.C., Shinde, U., Li, Y., Inouye, M., Berman, H.M. (1998). The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 284(1):137–144.doi:10.1006/jmbi.1998.2161.

- Jang, J.S., Kang, D.O., Chun, M.J., Byun, S.M. (1992). Molecular cloning of a subtilisin J gene from *Bacillus stearothermophilus* and its expression in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184(1):277–282.doi:10.1016/0006-291X(92)91189-W.
- Jeong, S.J., Kwon, G.H., Chun, J., Kim, J.S., Park, C., Kwon, D.A.E.Y., Kim, J.H. (2007). Cloning of Fibrinolytic Enzyme Gene from Isolated from and Its Expression in Protease-deficient Strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(6):1018–1023.
- Jeong, S., Heo, K., Park, J., Lee, K., Park, J., Joo, S., Kim, J. (2015). Characterization of AprE176, a Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* HK176. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(1):89–97.doi:dx.doi.org/10.4014/jmb.1409.09087.
- Jeong, Y.K., Kim, J.H., Gal, S.W., Kim, J.E., Park, S.S., Chung, K.T., Kim, Y.H., Kim, B.W., Joo, W.H. (2004). Molecular cloning and characterization of the gene encoding a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* Strain A1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20(7):711–717.doi:10.1007/s11274-003-4514-5.
- Jo, H.D., Lee, H.A., Jeong, S., Kim, J.H. (2011). Purification and Characterization of a Major Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ5-41 Isolated from Meju. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(11):1166–1173.doi:10.4014/jmb.1106.06008.
- Jo, H.D., Kwon, G.H., Park, J.Y., Cha, J., Song, Y.S., Kim, J.H. (2011). Cloning and overexpression of aprE3-17 encoding the major fibrinolytic protease of *Bacillus licheniformis* CH 3-17. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16(2):352–359.doi:10.1007/s12257-010-0328-0.
- Juan, M., Chou, C. (2010). Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiol.* 27(5):586–591.doi:10.1016/j.fm.2009.11.002.
- Kamiya, S., Hagimori, M., Ogasawara, M., Arakawa, M. (2010). *In vivo* evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan-induced tail thrombosis in a rat model. *Acta Haematol.* 124(4):218–224.doi:10.1159/000321518.
- Kaptoge, S., Pennells, L., De Bacquer, D., Cooney, M.T., Kavousi, M., Stevens, G., Riley, L.M., Savin, S., Khan, T., Altay, S., et al. (2019). World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *Lancet Glob. Heal.* 7(10):e1332–e1345.doi:10.1016/S2214-109X(19)30318-3.
- Katzung, B.G. (2018). *Basic & Clinical Pharmacology, Fourteenth Edition*. Ed ke-14 Katzung BG, editor. New York (US): Mc Graw Hill Education.
- Kaur, I., Kocher, G.S., Gupta, V.K. (2012). Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for an Alkaline Protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906. *Indian J. Microbiol.* 52(4):630–637.doi:10.1007/s12088-012-0297-4.
- Killer, M., Ladurner, G., Kunz, A.B., Kraus, J. (2010). Current endovascular treatment of acute stroke and future aspects. *Drug Discov. Today.* 15(15):640–647.doi:10.1016/j.drudis.2010.04.007.
- Kim, G.M., Lee, A.R., Lee, K.W., Park, J.Y., Chun, J., Cha, J., Song, Y.S., Kim, J.H. (2009). Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(9):997–1004.doi:10.4014/jmb.0811.600.
- Kim, H.K., Kim, G.T., Kim, D.K., Choi, W.A., Park, S.H., Jeong, Y.K., Kong, I.S. (1997). Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *J. Ferment. Bioeng.* 84(4):307–312.doi:10.1016/S0922-338X(97)89249-5.
- Kim, J.B., Jung, W.H., Ryu, J.M., Lee, Y.J., Jung, J.K., Jang, H.W., Kim, S.W. (2007). Identification of a fibrinolytic enzyme by *Bacillus vallismortis* and its potential as a bacteriolytic enzyme against *Streptococcus mutans*. *Biotechnol. Lett.* 29(4):605–610.doi:10.1007/s10529-006-9284-3.
- Kim, S., Choi, N.S. (2000). Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(8):1722–1725.doi:10.1271/bbb.64.1722.
- Kim, S., Chun, H., Han, M.H., Park, N., Suk, K. (1997). A Novel Variant Of Staphylokinasene From *Staphylococcus Alirez*. *Is Atcc 29213.* 87(1):387–395.

- Kim, S.B., Lee, D.W., Cheigh, C.I., Choe, E.A., Lee, S.J., Hong, Y.H., Choi, H.J., Pyun, Y.R. (2006). Purification and characterization of a fibrinolytic subtilisin-like protease of *Bacillus subtilis* TP-6 from an Indonesian fermented soybean, Tempeh. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(6):436–444.doi:10.1007/s10295-006-0085-4.
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Kim, W., Choi, K., *et al.* (1996). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp . strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang . These include : Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp . strain CK 11-4 Scre.
- Kim, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H., Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S. (1996). Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp . strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7):2482–2488.
- Ko, J.H., Yan, J.P., Zhu, L., Qi, Y.P. (2004). Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 137:65–74.doi:10.1016/j.cca.2003.11.008.
- Kotb, E. (2012). *Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity*. Ed ke-1. Berlin: Springer Heidelberg Dordrecht London New York.
- Kotb, E. (2014). Purification and partial characterization of a chymotrypsin-like serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* FCF-11 using corn husk as a novel substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30:2071–2080.doi:10.1007/s11274-014-1632-1.
- Kotb, E. (2015). Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51(1):34–43.doi:10.1134/S000368381501007X.
- Kovalevsky, A.Y., Liu, F., Leshchenko, S., Ghosh, A.K., Louis, J.M., Harrison, R.W., Weber, I.T. (2006). Ultra-high Resolution Crystal Structure of HIV-1 Protease Mutant Reveals Two Binding Sites for Clinical Inhibitor TMC114. *J. Mol. Biol.* 363(1):161–173.doi:10.1016/j.jmb.2006.08.007.
- Kuhn, P., Knapp, M., Soltis, S.M., Ganshaw, G., Thoene, M., Bott, R. (1998). The 0.78 Å structure of a serine protease: *Bacillus lentus* subtilisin. *Biochemistry.* 37(39):13446–13452.doi:10.1021/bi9813983.
- Kumar, S., Tsai, C., Nussinov, R. (2000). Factors enhancing protein thermostability. *Protein* 13(3):179–191.doi:10.1093/protein/13.3.179.
- Kurnia, F., Tjandrawinata, R.R., Yulandi, A., Suhartono, M.T. (2017). Protease of *Stenotrophomonas* sp. from Indonesian fermented food: gene cloning and analysis. *J. Biol. Res.* 90(2):70–76.doi:10.4081/jbr.2017.6428.
- Kurosawa, Y., Nirengi, S., Homma, T., Esaki, K., Ohta, M., Clark, J.F., Hamaoka, T. (2015). A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. *Sci. Rep.* 5:1–7.doi:10.1038/srep11601.
- Kwon, G.H., Park, J.Y., Kim, J.S., Lim, J., Park, C.S., Kwon, D.Y., Kim, J.H. (2011). Cloning and expression of a bpr gene encoding bacillopeptidase F from *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(5):515–518.doi:10.4014/jmb.1010.10061.
- Kyte, J., Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1):105–132.doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 26(2):283–291.doi:10.1107/s002188982009944.
- Lee, A.R., Kim, G.M., Kwon, G.H., Lee, K.W., Park, J.Y., Chun, J., Cha, J., Song, Y.S., Kim, J.H. (2010). Cloning of aprE86-1 gene encoding a 27-kDa mature fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH86-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(2):370–374.doi:10.4014/jmb.0906.06029.
- Lee, I.H., Hung, Y.H., Chou, C.C. (2008). Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2):150–156.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.008.
- Lee, S.K., Bae, D., Kwon, T., Lee, S.B., Lee, H., Park, J., Heo, S., Johnson, M. (2001).

- Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(5):845–852.
- Lijnen, H. (2001). Elements of the Fibrinolytic System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936(1):226–236.doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03511.x.
- Lijnen, H.R., Van Hoef, B., De Cock, F., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Collen, D. (1991). On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J. Biol. Chem.* 266(18):11826–11832.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Adrendall, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: Phi, Psi and C beta Deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50:437–450.doi:10.1002/prot.10286.
- Mahajan, P.M., Gokhale, S.V., Lele, S.S. (2010). Production of Nattokinase Using *Bacillus natto* NRRL 3666: Media optimization, scale Up, and kinetic modeling. *Food Sci. Biotechnol.* 19(6):1593–1603.doi:10.1007/s10068-010-0226-4.
- Maiti, R., Van Domselaar, G.H., Zhang, H., Wishart, D.S. (2004). SuperPose: A simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res.* 32(WEB SERVER ISS.):590–594.doi:10.1093/nar/gkh477.
- Marrone, T.J., Briggs, J.M., McCammon, J.A. (1997). Structure-based drug design: Computational advances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37:71–90.
- Medved, L.V., Solovjov, D.A., Ingham, K.C. (1996). Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur. J. Biochem.* 239(2):333–339.doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0333u.x.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., Maruyama, M. (1991). A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn. J. Physiol.* 41(3):461–472.doi:10.2170/jjphysiol.41.461.
- Mine, Y., Kwan Wong, A.H., Jiang, B. (2005). Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. Dalam *Food Research International*. Vol. 38. hlm. 243–250.
- De Moerloose, P., Boehlen, F., Neerman-Arbez, M. (2010). Fibrinogen and the risk of thrombosis. *Semin. Thromb. Hemost.* 36(1):7–17.doi:10.1055/s-0030-1248720.
- Mohanasrinivasan, V., Mohanapriya, A., Potdar, S., Chatterji, S., Konne, S., Kumari, S., Keziah, S.M., Subathra, D.C. (2017). In vitro and in silico studies on fibrinolytic activity of nattokinase: A clot buster from *Bacillus* sp. *Front. Biol. (Beijing)*. 12(3):219–225.doi:10.1007/s11515-017-1453-3.
- Moreira, I.S., Koukos, P.I., Melo, R., Almeida, J.G., Antonio, J.P., Schaarschmidt, J., Trellet, M., Gümüŝ, Z.H., Costa, J., Alexandre, M, *et al.* (2017). SpotOn: High Accuracy Identification of Protein-Protein Interface Hot-Spots. (July):1–11.doi:10.1038/s41598-017-08321-2.
- Morya, V.K., Yadav, S., Kim, E.K., Yadav, D. (2012). In silico characterization of alkaline proteases from different species of aspergillus. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166(1):243–257.doi:10.1007/s12010-011-9420-y.
- Mukherjee, A.K., Rai, S.K., Thakur, R., Chattopadhyay, P., Kar, S.K. (2012). Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. *Biochimie.* 94(6):1300–1308.doi:10.1016/j.biochi.2012.02.027.
- Nailufar, F., Tjandrawinata, R.R., Suhartono, M.T. (2016). Thrombus Degradation by Fibrinolytic Enzyme of *Stenotrophomonas* sp. Originated from Indonesian Soybean-Based Fermented Food on Wistar Rats. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2016:1–9.doi:10.1155/2016/4206908.
- Nakajima, N., Mihara, H., Sumi, H., Mihara, H., Sumi, H. (1993). Characterization of Potent Fibrinolytic Enzymes in Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57(10):1726–1730.doi:10.1271/bbb.57.1726.
- Nakamura, T., Yamagata, Y., Ichishima, E. (1992). Nucleotide Sequence of the Subtilisin NAT Gene, aprN, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56(11):1869–1871.doi:10.1271/bbb.56.1869.
- Noh, K., Kim, D., Choi, N., Kim, S. (1999). Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from kimchi. *Korean J. Food Sci.*

- Technol.* 31(1):219–223.
- Ogbadu, L.J., Okagbue, R.N. (1988). Fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) seeds: involvement of different species of *Bacillus*. *Food Microbiol.* 5(4):195–199.doi:10.1016/0740-0020(88)90018-4.
- Olson, S.T., Bjork, I. (1994). Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin. Thromb. Hemost.* 20(4):373–409.doi:10.1055/s-2007-1001928.
- Ouoba, L.I.I., Cantor, M.D., Diawara, B., Traoré, A.S., Jakobsen, M. (2003). Degradation of African locust bean oil by *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* isolated from soumbala, a fermented African locust bean condiment. *J. Appl. Microbiol.* 95(4):868–873.doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02063.x.
- Paik, H., Lee, S., Heo, S., Kim, S., Lee, H., Kwon, T. (2004). Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkookjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14:829–835.
- Palta, S., Saroa, R., Palta, A. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* 58(5):515–523.doi:10.4103/0019-5049.144643.
- Park, S.G., Kho, C.W., Cho, S., Lee, D.H., Kim, S.H., Park, B.C. (2002). A functional proteomic analysis of secreted fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* 168 using a combined method of two-dimensional gel electrophoresis and zymography. *Proteomics.* 2(2):206–211.doi:10.1002/1615-9861(200202)2:2<206::AID-PROT206>3.0.CO;2-5.
- Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R., Zhang, Y. (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 134:45–52.doi:10.1016/s1096-4959(02)00183-5.
- Peng, Y., Yang, X., Zhang, Y. (2005). Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(2):126–132.doi:10.1007/s00253-005-0159-7.
- Peng, Y., Yang, X.J., Xiao, L., Zhang, Y.Z. (2004). Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* 155(3):167–173.doi:10.1016/j.resmic.2003.10.004.
- Peng, Y., Zhang, Y. (2002). Optimization of fermentation conditions of douchi fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.* 8:285–289.
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., et al. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature.* 301(5897):214–221.doi:10.1038/301214a0.
- Pirooznia, M., Gong, P., Guan, X., Inouye, L.S., Yang, K., Perkins, E.J., Deng, Y. (2007). Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the Earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics.* 8(SUPPL. 7):1–16.doi:10.1186/1471-2105-8-S7-S7.
- Pranaw, K., Singh, S., Dutta, D., Chaudhuri, S., Ganguly, S., Nain, L. (2014). Statistical Optimization of Media Components for Production of Fibrinolytic Alkaline Metalloproteases from *Xenorhabdus indica* KB-3. *Biotechnol. Res. Int.* 2014:1–11.doi:10.1155/2014/293434.
- Prihanto, A.A., Firdaus, M., Prihanto, A.A. (2013). Proteolytic And Fibrinolytic Activities Of Halophilic Lactic Acid Bacteria From Two Indonesian Fermented Foods. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2(5):2291–2293.
- Randolph, A., Chamberlain, S.H., Chu, H.C., Retzios, A.D., Markland, F.S., Masiarz, F.R. (1992). Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Protein Sci.* 1:590–600.doi:10.1002/pro.5560010505.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):597–635.doi:10.1016/S0168-6445(99)00006-6.
- Repetto, O., De Re, V. (2017). Coagulation and

- fibrinolysis in gastric cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1404(1):27–48.doi:10.1111/nyas.13454.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed ke-2. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, I.R., Walker, W.A. (1993). Uptake and transport of macromolecules by the intestine: Possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology*. 104(2):622–639.doi:10.1016/0016-5085(93)90436-G.
- Sanger, F., Coulson, A. (1976). A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *J. Mol. Biol.* 94:441–448.doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Santiveri, C.M., Santoro, J., Rico, M., Énez, M.A.J.I.M. (2004). Factors involved in the stability of isolated Beta sheets: Turn sequence, Beta sheet twisting, and hydrophobic surface burial. *Protein Sci.* 13:1134–1147.doi:10.1110/ps.03520704.also.
- Sasaki, K., Moriyama, S., Tanaka, Y. (1985). The transport of 125I-labeled human high molecular weight urokinase across the intestinal tract in a dog model with stimulation of synthesis and/or release of plasminogen activators. *Blood*. 66(1):69–75.doi:10.1182/blood.v66.1.69.69.
- Seo, J., Lee, S. (2004). Production of Fibrinolytic Enzyme from Soybean Grits Fermented by *Bacillus firmus* NA-1. *J. Med. Food*. 7(4):442–449.doi:10.1089/jmf.2004.7.442.
- Seo, M., Park, J., Kim, E., Hohng, S., Kim, H. (2014). Protein conformational dynamics dictate the binding affinity for a ligand. *Nat. Commun.*:1–7.doi:10.1038/ncomms4724.
- Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* 38(SUPPL.1):161–166.doi:10.1093/nar/gkp885.
- Simkhada, J.R., Mander, P., Cho, S.S., Yoo JC. 2010. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp . CS684. *Process Biochem. J.* 45:88–93.doi:10.1016/j.procbio.2009.08.010.
- Singh, T.A., Devi, K.R., Ahmed, G., Jeyaram, K. (2014). Microbial and endogenous origin of fibrinolytic activity in traditional fermented foods of Northeast India. *Food Res. Int.* 55:356–362.doi:10.1016/j.foodres.2013.11.028.
- Stanbury, P.F, Whitaker, A., Hall, S.J. (2003). *Principles of Fermentation Technology*. Ed ke-2. United Kingdom: MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall.
- Stephani, L., Tjandrawinata, R.R., Nur, D., Lim, Y., Ismaya, W.T., Suhartono, M.T. (2017a). Food Origin Fibrinolytic Enzyme With Multiple Actions Food Origin Fibrinolytic Enzyme With Multiple Actions. *HAYATI J. Biosci.* 24(3):124–130.doi:10.1016/j.hjb.2017.09.003.
- Stephani, L., Tjandrawinata RR, Nur D, Lim Y, Ismaya WT, Suhartono MT. (2017b). Food Origin Fibrinolytic Enzyme With Multiple Actions. *HAYATI J. Biosci.* 24:124–130.doi:10.1016/j.hjb.2017.09.003.
- Sugimoto, M., Nakajima, N. (2001). Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(7):1575–1580.doi:10.1271/bbb.65.1575.
- Sugimoto, S., Fujii, T., Morimiya, T., Johdo, O., Nakamura, T. (2007). The Fibrinolytic Activity of a Novel Protease Derived from a Tempeh Producing Fungus, *Fusarium* sp. BLB. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(9):2184–2189.doi:10.1271/bbb.70153.
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., Hiratani, H. (1990). Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol.* 84:139–143.doi:10.1159/000205051.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*. 43(10):1110–1111.doi:10.1007/bf01956052.
- Sumi, H., Nakajima, N., Yatagai, C. (1995). A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack “Shiokara,” a Japanese traditional fermented food *. *Comp. Biochem. Physiol.* I(3):543–547.doi:10.1016/0305-0491(95)00100-x.
- Sumi, H., Yanagisawa, Y., Yatagai, C., Saito, J. (2004). Natto bacillus as an oral fibrinolytic agent: Nattokinase activity and the ingestion

- effect of bacillus subtilis natto. *Food Sci. Technol. Res.* 10(1):17–20. doi:10.3136/fstr.10.17.
- Sung, J.H., Ahn, S.J., Kim, N.Y., Jeong, S.K., Kim, J.K., Chung, J.K., Lee, H.H. (2010). Purification, molecular cloning, and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated Bacillus subtilis JB1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162(3):900–911. doi:10.1007/s12010-009-8830-6.
- Suwanmanon, K., Hsieh, P.C. (2014). Effect of γ -aminobutyric acid and nattokinase-enriched fermented beans on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *J. Food Drug Anal.* 22(4):485–491. doi:10.1016/j.jfda.2014.03.005.
- Suzuki, Y., Kondo, K., Matsumoto, Y., Zhao, B.Q., Otsuguro, K., Maeda, T., Tsukamoto, Y., Urano, T., Umemura, K. (2003). Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. *Life Sci.* 73(10):1289–1298. doi:10.1016/S0024-3205(03)00426-0.
- Syahbanu, F., Kezia, E., Puera, N., Giriwono, P.E., Tjandrawinata, R.R., Suhartono, M.T. (2020a). Fibrinolytic bacteria of Indonesian fermented soybean: preliminary study on enzyme activity and protein profile. *Food Sci. Technol.* Vol. 40 (No. Suppl 2): 458–465. doi: 10.1590/fst.23919
- Syahbanu, F., Giriwono, P.E., Tjandrawinata, R.R., Suhartono, M.T. (2020b). Molecular analysis of fibrin-degrading enzyme from Bacillus subtilis K2 isolated from Indonesian fermented soybean. *Mol Biol Rep.* Vol 47(11): 8553-8563. doi:10.1007/s11033-020-05898-2
- Syahbanu, F., Giriwono, P.E., Tjandrawinata, R.R., Suhartono, M.T. (2022). Molecular docking of Subtilisin K2, a fibrin-degrading enzyme from Indonesian moromi, with its substrates. *Food Sci. Technol.* Vol 42: 1-8. doi: 10.1590/fst.61820
- Thielemans, L., Hanif, M., Crawley, J. (2019). The Coagulation Cascade and its Therapeutic Modulation. Dalam Guymer S, Terracino C (ed.) in *Heart of the Matter Key: Key concepts in cardiovascular science*. Vol. 206. Ed ke-1 hlm. 193–206. Springer Nature Switzerland AG, Switzerland, CH.
- Tjandrawinata, R.R., Trisina, J., Rahayu, P., Prasetya, L.A., Hanafiah, A., Rachmawati, H. (2014). Bioactive protein fraction DLBS1033 containing lumbrokinase isolated from Lumbricus rubellus: Ex vivo, in vivo, and pharmaceutic studies. *Drug Des. Devel. Ther.* 8:1585–1593. doi:10.2147/DDDT.S66007.
- Tortora, G.J., Derrickson, B. (2014). *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley & Sons, New York (US).
- Trisina, J., Sunardi, F., Suhartono, M.T., Tjandrawinata, R.R. (2011). DLBS1033, a protein extract from lumbricus rubellus, possesses antithrombotic and thrombolytic activities. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:1–7. doi:10.1155/2011/519652.
- Tseng, G.N., Sonawane, K.D., Korolkova, Y V., Zhang M, Liu J, Grishin E V., Guy HR. 2007. Probing the outer mouth structure of the hERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling. *Biophys. J.* 92(10):3524–3540. doi:10.1529/biophysj.106.097360.
- Tsurupa, G., Hantgan, R.R., Burton, R.A., Pechik, I., Tjandra, N., Medved, L. (2009). Structure, stability, and interaction of the fibrin(ogen) α C-domains. *Biochemistry.* 48(51):12191–12201. doi:10.1021/bi901640e.
- Uesugi, Y., Usuki, H., Iwabuchi, M., Hatanaka, T. (2011). Highly potent fibrinolytic serine protease from Streptomyces. *Enzyme Microb. Technol.* 48(1):7–12. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.08.003.
- Urano, T., Ihara, H., Umemura, K., Suzuki, Y., Oike, M., Akita, S., Tsukamoto, Y., Suzuki, I., Takada, A. (2001). The Profibrinolytic Enzyme Subtilisin NAT Purified from Bacillus subtilis Cleaves and Inactivates Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *J. Biol. Chem.* 276(27):24690–24696. doi:10.1074/jbc.M101751200.
- Vangone, A., Bonvin, A.M.J.J. *2015). Contacts-based prediction of binding affinity in protein–protein complexes. *Elife.* 4 (JULY2015):1–15. doi:10.7554/eLife.07454.
- Vasanth, N., Thompson, L.D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., Filpula, D. (1984). Genes for alkaline protease and neutral protease from Bacillus amyloliquefaciens contain a large open reading frame between the regions coding for signal sequence and

- mature protein. *J. Bacteriol.* 159(3):811–819.doi:10.1128/jb.159.3.811-819.1984.
- Vijayaraghavan, P., Raj, S.R.F., Gnana, S., Vincent, P. (2015). Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Pseudoalteromonas* sp., IND11 and its in vitro Activity on Blood Clot. *Int. J. Biol. Chem.* 9(1):11–20.doi:10.3923/ijbc.2015.11.20.
- Voet, D., Voet, J.G. (1997). *Biochemistry*. Second. New York, USA: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Wang, C.T., Ji, B.P., Li, B., Nout, R., Li, P.L., Ji, H., Chen, L.F. (2006). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(9):750–758.doi:10.1007/s10295-006-0111-6.
- Wang, S.H., Zhang, C., Yang, Y.L., Diao, M., Bai, M.F. (2008). Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus subtilis* LD-8547. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24(4):475–482.doi:10.1007/s11274-007-9496-2.
- Wei, Q., Wang, H., Chen, Z. (2013). Profiling of dynamic changes in the microbial community during the soy sauce fermentation process. *Appl. Microb. CELL Physiol.* 97:9111–9119.doi:10.1007/s00253-013-5146-9.
- Wei, X., Luo, M., Xu, L., Zhang, Y., Lin, X., Kong, P., Liu, H. (2011). Production of Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by Fermentation of Chickpeas, with the Evaluation of the Anticoagulant and Antioxidant Properties of Chickpeas. *J. Agric. Food Chem.* 59:3957–3963.doi:10.1021/jf1049535.
- Wells J., Cunningham BC, Graycar T., Estell DA. 1986. Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin. *Philos. Trans. R. Soc. London.* 317(1540):415–423.doi:10.1098/rsta.1986.0051.
- Weng, Y., Yao, J., Sparks, S., Wang, K.Y. (2017). Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.* 18(3):1–13.doi:10.3390/ijms18030523.
- Wolberg, A.S. (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 21(3):131–142.doi:10.1016/j.blre.2006.11.001.
- Wong, S.L., Price, C.W., Goldfarb, D.S., Doi, R.H. (1984). The subtilisin E gene of *Bacillus subtilis* is transcribed from a $\sigma 37$ promoter in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81(4):1184–1188.doi:10.1073/pnas.81.4.1184.
- Wong, M.Y.Z., Yap, J., Huang, W., Tan, S.Y. and Yeo, K.K., (2021). Impact of age and sex on subclinical coronary atherosclerosis in a healthy Asian population. *JACC: Asia*, 1(1): 93-102.
- Wu, D.J., Lin, C.S., Lee, M.Y. (2009). Lipid-lowering effect of nattokinase in patients with primary hypercholesterolemia. *Acta Cardiol. Sin.* 25(1):26–30.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F., Giudici, P. (2010). Diversity of acetobacter pasteurianus strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Curr. Microbiol.* 60(4):280–286.doi:10.1007/s00284-009-9538-0.
- Wu, J.X., Zhao, X.Y., Pan, R., He, R.Q. (2007). Glycosylated trypsin-like proteases from earthworm *Eisenia fetida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 40:399–406.doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.10.001.
- Wun, D., Voet, J.G. (1982). Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J. Biol. Chem.* 257(10):3276–3283.doi:10.1021/ja01106a534.
- Xiao-lan, L., Lian-xiang, D., Fu-ping, L., Xi-qun, Z., Jing, X. (2005). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(2):209–214.doi:10.1007/s00253-004-1846-5.
- Xu, Z., Yang, Y., Gui, Q., Zhang, L., Hu L. (2010). Expression, purification, and characterization of recombinant lumbrokinase PI239 in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 69(2):198–203.doi:10.1016/j.pep.2009.08.013.
- Yamashita, T., Oda, E., Giddings, J., Yamamoto, J. (2003). The Effect of Dietary *Bacillus Natto* Productive Protein on in vivo Endogenous Thrombolysis. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33:138–143.doi:10.1159/000077822.
- Yan, F., Yan, J., Sun, W., Yao, L., Wang, J., Qi, Y. (2009). Thrombolytic effect of Subtilisin QK on carrageenan induced thrombosis model in mice. *J. Thrombolysis.* 28:444–

- 448.doi:10.1007/s11239-009-0333-3.
- Yan, X.M., Kim, C.H., Lee, C.K., Shin, J.S., Cho, I.H., Sohn, U.D. (2010). Intestinal absorption of fibrinolytic and proteolytic lumbrokinase extracted from earthworm, *Eisenia andrei*. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 14(2):71–75.doi:10.4196/kjpp.2010.14.2.71.
- Yang, Y., Jiang, L., Yang, S., Zhu, L., Wu, Y., Li, Z. (2000). A mutant subtilisin E with enhanced thermostability. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16(3):249–251.doi:10.1023/A:1008959825832.
- Yatagai, C., Maruyama, M., Kawahara, T., Sumi, H. (2008). Nattokinase-promoted tissue plasminogen activator release from human cells. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 36(5):227–232.doi:10.1159/000252817.
- Yau, J.W., Teoh, H., Verma, S. (2015). Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovasc. Disord.* 15(1):1–11.doi:10.1186/s12872-015-0124-z.
- Yin, L.J., Lin, H.H. and Jiang, S.T., 2010. Bioproperties of potent nattokinase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(9): 5737-5742.
- Yogesh, D., Halami, P.M. (2015). A fibrin degrading serine metallo protease of *Bacillus circulans* with α -chain specificity. 11:72–78.doi:10.1016/j.fbio.2015.04.007.
- Yogesh, D., Halami, P.M. (2015). Evidence that multiple proteases of *Bacillus subtilis* can degrade fibrin and fibrinogen. *Int. Food Res. J.* 22(4):1662–1667.
- Yogesh, D., Halami, P.M. (2017). Fibrinolytic enzymes of *Bacillus* spp.: an overview. *Int. Food Res. J.* 24(1):35–47.
- Yoon, S.J., Yu, M.A., Sim, G.S., Kwon, S.T., Hwang, J.K., Shin, J.K., Yeo, I.H., Pyun, Y.R. (2002). Screening and characterization of microorganisms with fibrinolytic activity from fermented foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12(4):649–656.
- Yoshimoto, T., Oyama, H., Honda, T., Tone, H., Takeshita, T. (1988). Cloning and Expression of Subtilisin Amylosacchariticus Gene. *J. Biochem.* 103:1060–1065.doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122380.
- Yu, Q., Li, P., Yang, Q. (2010). Improving the absorption of earthworm fibrinolytic enzymes with mucosal enhancers. *Pharm. Biol.* 48(7):816–821.doi:10.3109/13880200903283681.
- Yuan, J., Yang, J., Zhuang, Z., Yang, Y., Lin, L., Wang, S. (2012). Thrombolytic effects of Douchi Fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 in vitro and in vivo.
- Zakaria, Z., Madihah, M.S., Rashid, N.A.A. (2015). Screening and identification of fibrinolytic bacteria from Malaysian fermented seafood products. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5(10):22–31.doi:10.7324/JAPS.2015.501005.
- Zhang, L., Zhou, R., Cui, R., Huang, J., Wu, C. (2016). Characterizing Soy Sauce Moromi Manufactured by High-Salt Dilute-State and Low-Salt Solid-State Fermentation Using Multiphase Analyzing Methods. 00(0):1–8.doi:10.1111/1750-3841.13516.
- Zhang, R.H., Xiao, L., Peng, Y., Wang, H.Y., Bai, F., Zhang, Y. (2005). Gene expression and characteristics of a novel fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 41(2):190–195.doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01715.x.