

Potensi Ekstrak Enzim Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Sebagai Agen Fibrinolitik Dengan Metode *Clot Lysis in Vitro*

Hervina Warninghiyun^{1*}, Ana Indrayati², Pudiastuti RSP³

^{1,2,3} Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta,
Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Kec. Jebres, Kota Surakarta 57127, Indonesia

* Penulis Korespondensi. Email: hervyna001@gmail.com

ABSTRAK

Stroke adalah penyakit yang disebabkan karena sumbatan pembuluh darah. Departemen Kesehatan 2013 menyatakan bahwa 15,4% orang meninggal karena stroke. Salah satu terapi pengobatan yang dapat digunakan yaitu fibrinolitik. Agen fibrinolitik mempunyai peran dalam melisiskan bekuan darah, agen ini dapat diperoleh dari mikroba, tumbuhan dan hewan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein yang terkandung didalam ekstrak enzim daun pepaya (*Carica papaya* L.), dan mengetahui potensi ekstrak enzim pada konsentrasi tertentu sebagai alternatif obat fibrinolitik secara alami. Penelitian diawali dengan determinasi tanaman, pengambilan sampel, ekstraksi enzim dengan diblender, pemurnian ekstrak dengan presipitasi menggunakan amonium sulfat, penentuan kadar protein dengan metode *Lowry*, dan uji aktivitas fibrinolitik metode *clot lysis in vitro*. Konsentrasi uji dibuat tiga seri yaitu 20, 40 dan 80%. Hasil penelitian pada ekstrak daun pepaya menunjukkan kadar protein pada pelet pemurnian 1 sebesar 196,22 µg/ml dan pelet pemurnian 2 sebesar 306,33 µg/ml. Pada daun pepaya terbukti adanya aktivitas fibrinolitik dengan persentase lisis bekuan darah yang optimal pada pelet pemurnian 2 konsentrasi 80% yaitu sebesar 79%.

Kata Kunci:

Carica papaya; Stroke; Fibrinolitik; *Clot lysis*

Diterima:
28-02-2023

Disetujui:
29-07-2023

Online:
01-08-2023

ABSTRACT

Stroke is a disease caused due to blockage of blood vessels. Health department in 2013 stated that 15,4% of people died from strokes. One of the treatment therapies that can be used is fibrinolytic. Fibrinolytic agents have a role in lysing blood clots, these agents can be obtained from microbes, plants and animals. This study aims to determine the protein content contained in papaya leaf enzyme extract (*Carica papaya* L.), and to determine the potential of the enzyme extract at certain concentrations as an alternative to natural fibrinolytic drugs. The study began with plant determination, sampling, enzyme extraction using a blender, purification of the extract by precipitation using ammonium sulphate, protein content determination using the *Lowry* method, and testing the fibrinolytic activity of the *clot lysis method in vitro*. Three series of test concentrations were made, namely 20, 40, and 80%. The results of the research on papaya leaf extract showed that the protein content in purification pellet 1 was 196,22 µg/ml and purification pellet 2 was 306,33 µg/ml. In papaya leaves, fibrinolytic activity was proven with the optimal percentage of blood clot lysis in purification pellet 2 with a concentration of 80% which was 79%.

Copyright © 2023 Jsscr. All rights reserved.

Keywords:

Carica papaya; Stroke; Fibrinolytic; Clot lysis

Received:
2023-02-28

Accepted:
2023-07-29

Online:
2023-08-01

1. Pendahuluan

Stroke adalah penyakit serebrovaskular (pembuluh darah di otak) yang ditandai dengan kematian jaringan otak yang disebabkan oleh penurunan aliran darah dan suplai oksigen ke otak. Penurunan aliran darah dan oksigen ini dapat disebabkan oleh penyumbatan karena adanya pembekuan darah, penyempitan, atau pecahnya pembuluh darah [1]. Berdasarkan data hasil riset kesehatan oleh departemen kesehatan RI tahun 2013 stroke merupakan penyebab kematian nomor tiga di Indonesia (15,4%) stroke meningkat dari 8,3 per 1.000 penduduk tahun 2007 menjadi 12,1 per 1.000 penduduk di tahun 2013.

Terapi fibrinolitik adalah salah satu terapi yang dapat digunakan untuk penyakit stroke. Agen fibrinolitik mampu berperan dalam melisiskan bekuan darah. Agen ini dapat diperoleh dari mikroba, tanaman, dan hewan. Agen fibrinolitik ini memiliki keunggulan yaitu efek samping rendah, dan harga yang relatif murah, dibanding obat streptokinase karena obat tersebut dapat menyebabkan pendarahan dan kekambuhan [2]. Enzim protease serine tergolong dari salah satu enzim fibrinolitik.

Penelitian Rohmah dan Fickri, (2020) berdasarkan analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara persentase inhibisi agregasi alkaloid total dibanding kontrol negatif, namun hasil uji trombolitik pada alkaloid daun pepaya menunjukkan bahwa persentase trombolitik tidak berbeda jauh dengan kontrol positif (clopidogrel) yang berarti dapat digunakan sebagai agen trombolitik [3].

2. Metode

Alat dan Bahan

Blender, tabung reaksi (*Pyrex*), pipet volume (*Brand*), mikropipet (*DragonMed*), timbangan analitik (*Nankai*), batang pengaduk (*Pyrex*), inkubator (*Memmert*), sentrifugasi (*DLAB*), spektrofotometer (*Shimadzu*), pH meter (*Hanna*), termometer (*Gea*), kertas saring (*Whatmann*).

Daun pepaya 100 gram, plasma darah kelinci, buffer fosfat 0,05M pH 7, aquadest, serbuk SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai larutan standar, Tris-HCl (pH 8), aseton, fenol, metanol, amonium sulfat, amonium asetat, reagen Lowry berupa Follin-Ciocalteu, dapar borat pH 7,8, NaOH, Na₂CO₃, CuSO₄, Sodium Pottasium Tartrat, nattokinase sebagai kontrol positif, buffer fosfat sebagai kontrol negatif.

Identifikasi Gen Protease Serin Tanaman Pepaya Menggunakan NCBI

Langkah awal mengunjungi situs resmi NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> selanjutnya memasukkan kata kunci pada kolom pencarian, dan memilih database.

Determinasi Tanaman dan Pengambilan Sampel

Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun pepaya diambil dengan keadaan segar, masih muda, tidak rusak, dan bebas penyakit.

Ekstraksi Ekstrak Enzim Daun Pepaya

Menimbang daun pepaya sebanyak 100 gram selanjutnya ditambah buffer fosfat 0,05M pH 7 (1:2) dan diblender sampai homogen. Hasil campuran disaring dengan kertas saring, yang disaring disebut dengan filtrat, filtrat selanjutnya didinginkan pada suhu $<4^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam. Filtrat selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifugasi berupa supernatan dan endapan.

Pemurnian Parsial Ekstrak Enzim Daun Pepaya

Supernatan diendapkan dengan ditambah garam amonium sulfat konsentrasi 60% dengan cara dimasukkan sedikit demi sedikit kedalam ekstrak kasar enzim sampai larut dengan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu $<4^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit dengan suhu $<4^{\circ}\text{C}$, hasil sentrifugasi yang didapat berupa pelet pemurnian ke-1 dan ditimbang. Kemudian pelet dilarutkan dengan buffer fosfat pH 8.

Pelet pemurnian ke-1 yang sudah larut, kemudian dimasukkan dalam larutan buffer yang berisi Tris-HCl 0,5M (pH 8) dan 1% serbuk SDS. Larutan selanjutnya dilarutkan dengan 10% fenol sebanyak 1 ml dan dicampur sampai homogen, setelah sudah tercampur lalu disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C sebanyak 2 kali pengulangan. Didapat 2 fase terpisah yaitu fase fenol dan fase pengotor. Fase fenol ditambah campuran ammonium asetat 0,1M dengan metanol aduk sampai homogen, dan disimpan pada lemari es selama 24 jam. Kemudian campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Pelet yang diperoleh kemudian dicuci dengan aseton dan metanol didiamkan dan dikeringkan dengan membalik tabung reaksi diatas tissue kering. Hasil tersebut didapat sebagai pelet pemurnian ke-2 [4].

Tingkat Kemurnian Protein Ekstrak Daun Pepaya

Pelet pemurnian ke-1 dan pelet pemurnian ke-2 diambil sebanyak 50 μL , kemudian dilarutkan dalam 10 ml larutan buffer fosfat. Sampel dianalisis kemudian diukur volume dengan menggunakan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan buffer fosfat pH 7 sebagai blanko, dan didapat nilai absorbansi yang akan dibandingkan, absorbansi dilakukan dengan 3 kali replikasi yang kemudian dihitung rasio rata-ratanya [5].

Pengukuran Kadar Protein Ekstrak Enzim Daun Pepaya Dengan Metode Lowry

Pertama, menimbang serbuk BSA sebanyak 50 mg, untuk pembuatan kurva kalibrasi yaitu larutan BSA dengan konsentrasi 1.000 ppm. Serbuk BSA dilarutkan dengan aquadest 50 ml dan dibuat berbagai seri konsentrasi 0, 40, 80, 120, 160, 200. Sebanyak 1.000 μL larutan protein standar BSA. Larutan standar kemudian ditambahkan kedalam tabung.

Reagen Lowry A dibuat dengan campuran yang berisi reagen Folin ciocalteau dan aquadest dengan perbandingan 1:1, Reagen Lowry B yaitu 50 ml larutan yang mengandung 2% Na_2CO_3 ditambah 0,1N NaOH dicampur dengan 1 ml larutan berisi 1% CuSO_4 dan 1% sodium potassium tartrat dan dicampur dalam air. Selanjutnya campuran Lowry B dimasukkan sebanyak 5 ml kedalam larutan standar, dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan sebanyak 0,5 ml larutan Lowry A, kocok dan diamkan selama 30 menit, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm [6].

Pengukuran kadar protein, ekstrak enzim daun pepaya sebanyak 50 µL dengan pengenceran 100 kali. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 ml larutan Lowry B dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,5 ml larutan Lowry A campuran dikocok, dan campuran didiamkan selama 30 menit. Baca absorbansi pada panjang gelombang 600 nm [6].

Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Metode *Clot Lysis*

Penelitian ini menggunakan metode *clot lysis*, dengan menguji lisis bekuan darah secara *in vitro*. Darah kelinci dimasukkan kedalam 8 tabung eppendorf yang steril dan sudah ditimbang masing-masing sebanyak 500 µl, selanjutnya diinkubasi selama 50 menit pada suhu 37°C sampai menggumpal. Setelah inkubasi akan terbentuk cairan pada bagian atas permukaan yang harus dipisah. Berat dari 8 tabung eppendorf masing-masing yang berisi gumpalan darah harus ditimbang, tujuan ditimbang yaitu untuk mengetahui berat dari gumpalannya (berat tabung eppendorf yang berisi gumpalan darah - berat tabung eppendorf yang kosong). Pelet pemurnian ke-1 dengan konsentrasi 20, 40 dan 80% dimasukan kedalam 3 tabung eppendorf sebanyak 100 µL. Pelet pemurnian ke-2 dengan konsentrasi 20, 40 dan 80% dimasukkan ke 3 tabung eppendorf sebanyak 100 µL. Dan 2 tabung eppendorf tersisa, diisikan dengan nattokinase (kontrol positif) dan buffer fosfat (kontrol negatif) yang masing-masing sebanyak 100 µL. Selanjutnya 8 tabung eppendorf diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C, dan diamati peleburan gumpalan darahnya. eppendorf yang berisi leburan gumpalan darah tersebut kembali ditimbang, yang bertujuan untuk mengetahui berapa perbedaan berat sesudah gumpalan darah melebur [7]. Persentase lisis bekuan darah dihitung dengan menggunakan rumus [7].

$$\frac{\text{Berat bekuan darah terlarut}}{\text{Berat bekuan darah sebelum larut}} \times 100$$

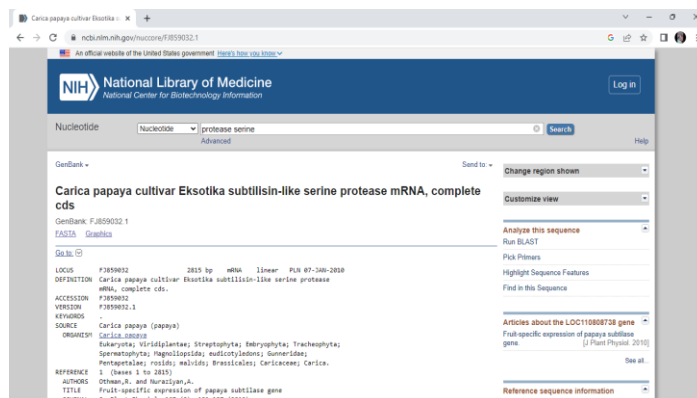
Analisis Data

Analisis hasil data dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Hasil data yang didapat dianalisis dengan *Saphiro-wilk*, apabila data yang didapat menunjukkan distribusi normal, maka selanjutnya dilakukan analisis dengan *One Way Anova*.

3. Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Gen Protease Serin dari Tanaman Pepaya dengan NCBI

Pencarian diawali dengan mengunjungi situs resmi NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, (gambar 1) selanjutnya peneliti memasukkan kata kunci "protease serine, gene" pada kolom pencarian dan pilih nukleotida. Dikhususkan pada tanaman dan akan muncul hasil berupa database tanaman apa saja yang mempunyai gen penyandi protease serine salah satunya yaitu tanaman pepaya. Identifikasi gen pengkode yang spesifik, peneliti memilih urutan gen pengkode dengan skor identitas tertinggi yaitu 100%.



Gambar 1. Hasil pencarian tanaman yang memiliki gen protease serin

Determinasi Tanaman dan Pengambilan Sampel

Hasil determinasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar tanaman pepaya dengan spesies *Carica papaya* L. yang termasuk dalam familia Caricaceae. Daun diambil dengan kondisi segar, masih muda, tidak rusak dan bebas dari penyakit. Daun muda memiliki tekstur yang lunak sehingga memudahkan dalam proses penggilangan.

Ekstraksi Ekstrak Enzim Daun Pepaya

Daun pepaya 100 gram dengan cara diblender dan diberi penambahan buffer fosfat pH 7, tujuan penambahan buffer fosfat dapat menghindari terjadinya inaktivasi enzim akibat pH yang berubah dan dapat menjaga pH supaya tetap netral [8]. Campuran tersebut kemudian disaring dengan kain flannel, yang bertujuan untuk memisahkan komponen sel dengan zat pengotor. Setelah disaring kemudian dimasukkan kedalam lemari es dan didiamkan selama 3 jam pada suhu 4°C. Dilakukan pendinginan pada ekstrak yaitu untuk menjaga enzim yang terkandung didalam ekstrak tersebut supaya tidak mengalami kerusakan. Proses pendiaman bertujuan untuk mengendapkan sisa-sisa serat daun pepaya yang berada pada ekstrak dan selanjutnya dipisah dengan sentrifugasi. Tujuan sentrifugasi untuk memisahkan supernatan dengan endapan zat pengotor yang tertinggal didalamnya [9]. Dilakukan dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit. Hasil ekstraksi ekstrak enzim daun pepaya diperoleh supernatan 200 mL.

Pemurnian Parsial Ekstrak Enzim Daun Pepaya

Pemurnian enzim fibrinolitik adalah langkah berikutnya setelah didapatkan supernatan (ekstrak kasar) hasil ekstrak enzim daun pepaya. Proses pemurnian perlu dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan enzim spesifik yang diinginkan [10]. Penelitian ini menggunakan metode presipitasi dengan garam ammonium sulfat. Prinsip pengendapan protein dengan garam amonium sulfat adalah salting out, pada penambahan garam dengan konsentrasi tinggi dapat mengakibatkan kelarutan protein menurun [11]. Amonium sulfat yang ditambahkan pada ekstrak daun pepaya yaitu dengan konsentrasi kejenuhan 60%. Pada saat penambahan amonium sulfat menggunakan magnetic stirrer, dilakukan dengan sedikit demi sedikit yang bertujuan untuk memudahkan dalam proses pelarutan dan menghomogenkan secara merata.

Pemurnian enzim dilakukan dengan kondisi ekstrak yang dingin, dengan cara menggunakan bongkahan es batu disampingnya yang bertujuan supaya tidak terjadi inaktivasi serta dapat menjaga kestabilan suhu enzim, karena kenaikan suhu dapat menyebabkan enzim mengalami denaturasi atau rusak [12]. Kemudian dimasukkan kedalam lemari es selama semalam pada suhu 4°C yang bertujuan untuk mengendapkan secara sempurna. Disentrifugasi dan diperoleh endapan atau pelet yang disebut sebagai pelet pemurnian ke-1.

Hasil pelet pemurnian enzim ke-1 dilarutkan dengan campuran yang terdiri dari Tris-HCl pH 8 dan serbuk SDS. Setelah pencampuran, selanjutnya ditambah dengan 10% fenol sampai tercampur secara homogen dan kemudian dilakukan sentrifugasi. Hasil sentrifugasi berupa 2 fase terpisah yaitu fase fenol dan fase pengotor. Fase fenol yang diambil, tujuan penambahan fenol untuk melarutkan pengotor yang berada didalam ekstrak kasar enzim, maka dari itu protein akan berada pada fase fenol sedangkan zat lain ikut larut dalam fase air [13].

Tabel 1. Berat pelet pemurnian ekstrak enzim daun pepaya

Sampel	Berat Pelet (g)
Pelet Pemurnian ke-1	31,87
Pelet Pemurnian ke-2	15,27

Fase fenol ditambah dengan metanol yang sudah dicampuri amonium asetat. Amonium asetat dalam metanol bertindak sebagai larutan pencuci yang memisahkan protein dari pengotor dalam ekstrak daun pepaya. Kemudian disentrifugasi setelah campuran dari larutan tersebut didiamkan, tahap berikutnya yaitu pencucian dengan metanol dan aseton. Setelah pencucian dengan methanol, selanjutnya dengan penggunaan aseton bertujuan untuk mencuci pelet yang didapat dari zat pengganggu lain. Pelet didiamkan dan dikeringkan dengan cara membalik tabung reaksi dengan dibawahnya menggunakan tissue, sehingga diperoleh pelet pemurnian 2. Adapun berat pelet pemurnian ekstrak enzim daun pepaya terdapat pada tabel 1.

Tingkat Kemurnian Ekstrak Enzim Daun Pepaya

Tingkat kemurnian dari ekstrak enzim daun pepaya dianalisis dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280 nm, merupakan penyerapan maksimum protein. Metode spektrofotometri UV memiliki kelebihan yaitu kesensitivitas yang tinggi, relatif cepat, dan metode yang dapat dikerjakan tanpa penggunaan reagen. Sedangkan kekurangan metode ini terdapat asam nukleat beserta komponen senyawa yang berisi cincin pirimidin dan purin, sehingga menyebabkan absorbansi kuat pada panjang gelombang 280 nm dan dapat mengganggu pada saat pembacaan hasil. Maka dari itu sebagai faktor koreksi dilakukan juga pengukuran pada panjang gelombang 260 nm. Perbandingan rasio rata-rata absorbansi antara panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian protein enzim.

Tabel 2. Tingkat kemurnian ekstrak enzim daun pepaya

Sampel	Jumlah Sampel (µL)	A ₂₆₀ ± SD	A ₂₈₀ ± SD	Rasio Rata-rata A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Pelet pemurnian ke-1	50	0,661 ± 0,009	0,489 ± 0,009	1,352 ± 0,008
Pelet pemurnian ke-2	50	0,445 ± 0,018	0,369 ± 0,007	1,205 ± 0,041

Hasil dari sampel pelet pemurnian 1 dan pelet pemurnian 2 mendapatkan rasio rata-rata A260/280 yaitu $< 1,8$ dengan nilai yang didapat 1,352 dan 1,205 yang berarti ekstrak enzim daun pepaya masih terkontaminasi atau terdapat protein dan senyawa organik lain (tabel 2). Penelitian Koopae & Koshkoiyeh menyatakan bahwa nilai rasio rata-rata A260/ A280 untuk karakter DNA yang murni berkisar antara 1,8-2,0. Apabila nilai rasio diatas 2,0 menunjukkan adanya kontaminan sampel dengan RNA sedangkan nilai rasio absorbansi dibawah 1,8 menunjukkan sampel terkontaminasi dengan protein dan polisakarida [14].

Pengukuran Kadar Protein dengan Metode Lowry

Membuat berbagai reagen lowry antara lain reagen lowry A yang terdiri dari Na_2CO_3 dan NaOH. Reagen lowry B terdiri dari $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan NaK tartrat. Reagen lowry C terdiri dari campuran kedua reagen yaitu reagen lowry A dan reagen lowry B. Reagen lowry D terdiri dari Follin Phenol Ciocalteu dan ditambah aquadest. Pembuatan larutan baku standar yaitu dengan menimbang serbuk BSA sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan aquadest 50 mL.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan memasukkan aqua destilata dikuvet bagian belakang (sebagai blanko). Dibuat dengan konsentrasi larutan induk 1000 ppm dan dibuat berbagai seri pengenceran yaitu 0, 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm. Konsentrasi 200 ppm dipilih untuk pengukuran panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum BSA dipilih pada panjang gelombang yang menunjukkan nilai absorbansi yang tinggi. Berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan, panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 745 nm.

Penentuan OT dengan cara larutan baku standar dibaca nilai absorbansinya pada panjang gelombang 745 nm dari menit 0-45 menit, sampai diperoleh nilai absorbansi yang stabil. Berdasarkan hasil pengukuran yang dilakukan diperoleh OT yang stabil pada menit ke 41-43 dengan nilai serapan tetap yaitu 0,495.

Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 745 nm. BSA digunakan sebagai pembanding pada metode Lowry dengan berbagai seri konsentrasi 0, 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm (tabel 3).

Tabel 3. Absorbansi dari berbagai seri konsentrasi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0,197
40	0,276
80	0,348
120	0,529
160	0,632
200	0,815

Nilai absorbansi yang didapat dari berbagai seri konsentrasi seperti tabel diatas, selanjutnya dipakai untuk mencari persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk mencari nilai x yang berarti kadar protein dari ekstrak enzim daun pepaya, persamaan regresi linier yang diperoleh yaitu $y = 0,0031 + 0,1562x$.

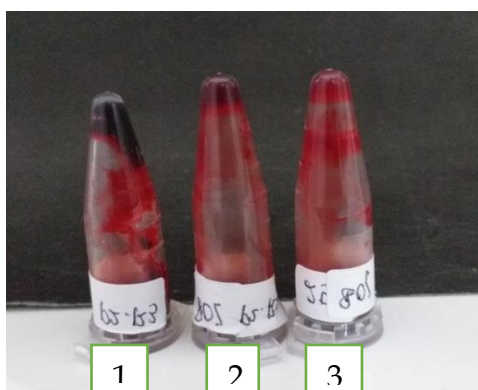
Tabel 4. Hasil kadar protein ekstrak enzim daun pepaya

Sampel	Rata-rata serapan (y) ± SD	Kadar Protein (µg/mL) (x)	Kadar Protein (µg/mL) (x faktor pengenceran)
Pelet pemurnian ke-1	0,3096 ± 0,0215	1,962	196,22
Pelet pemurnian ke-2	0,4816 ± 0,0716	3,063	306,33

Pelet pemurnian ke-1 dan pelet pemurnian ke-2 dicari nilai absorbansi dengan diuji serapan pada panjang gelombang maksimum yang didapat yaitu 745 nm, dengan masing-masing pelet diuji serapan sebanyak 3 kali replikasi. Selanjutnya ketiga absorbansi dicari rata-rata untuk mendapat nilai rata-rata serapan (y). Hasil penelitian membuktikan bahwa semakin murni ekstrak enzim, maka akan menghasilkan kadar protein yang lebih tinggi (tabel 4).

Pengujian Aktivitas Fibrinolitik Metode *Clot Lysis*

Darah dengan cara dimasukkan ke dalam alat inkubator selama 50 menit pada suhu 37°C. Bekuan darah ditimbang dengan mengurangi berat dengan bobot tabung eppendorf kosong. Persentase lisis dicari dengan rumus bobot sesudah lisis dibagi bobot sebelum lisis dikali 100. Penelitian ini menggunakan nattokinase (kontrol positif) dan buffer fosfat (kontrol negatif). Nattokinase merupakan suatu enzim fibrinolitik yang didapat dari fermentasi natto. Mekanisme kerja dari nattokinase yaitu seperti plasmin sehingga mampu melisiskan fibrinogen, serta aktif dalam memecah benang fibrin (fibrinolitik) dan dapat menghancurkan trombi [15].



Keterangan :

Tabung Eppendorf 1 = Pelet pemurnian ke-2 konsentrasi 20%

Tabung Eppendorf 2 = Pelet pemurnian ke-2 konsentrasi 40%

Tabung Eppendorf 3 = Pelet pemurnian ke-2 konsentrasi 80%

Gambar 2. Hasil Uji *Clot Lysis*

Uji aktivitas fibrinolitik dilakukan pada pelet pemurnian 1 dan pelet pemurnian 2 dengan berbagai seri konsentrasi yaitu 20, 40, dan 80% (gambar 2). Hasil perhitungan persentase lisis bekuan darah terdapat pada tabel 5. Kontrol negatif buffer fosfat 100 µL menunjukkan lisis bekuan darah 7%. Sedangkan pada kontrol positif nattokinase 100 µL menunjukkan lisis bekuan darah 87%. Pelet pemurnian 1 dengan berbagai seri konsentrasi, masing-masing menunjukkan lisis bekuan darah 41%, 47%, dan 55%. Untuk pelet pemurnian 2 dengan berbagai seri konsentrasi, masing-masing menunjukkan lisis

bekuan darah 61%, 68%, dan 79%. Parameter yang diamati yaitu penurunan bekuan darah dibandingkan dengan sebelum diberi perlakuan. Semakin rendah berat bekuan darah yang tersisa, maka semakin tinggi aktivitas fibrinolitik. Persentase lisis gumpalan darah tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak enzim daun pepaya hasil pemurnian 2 pada konsentrasi 80% sebesar 79% dengan kadar protein 306,33 µg/ml.

Tabel 5. Hasil perhitungan persentase lisis bekuan darah

Sampel (%)	Replikasi 1 (%)	Replikasi 2 (%)	Replikasi 3 (%)	Rata-rata Replikasi (%)
Pelet ₁ 20	39	47	37	41
Pelet ₁ 40	37	50	54	47
Pelet ₁ 80	55	53	56	55
Pelet ₂ 20	54	62	67	61
Pelet ₂ 40	69	60	75	68
Pelet ₂ 80	77	83	77	79
K-	5	8	7	7
K+	84	86	92	87

Hasil uji lisis bekuan darah dianalisis dengan SPSS, pertama menguji data dengan normalitas. Uji normalitas dilakukan dengan *Shapiro-wilk*, karena data yang dianalisis < 50 hasil uji menunjukkan nilai sig. > 0,05 yang berarti data terdistribusi secara normal. Data selanjutnya dianalisis homogenitas dengan *Levene's test homogeneity* didapat hasil sig. > 0,05 yang berarti data homogen. Sehingga uji dapat dilanjutkan dengan metode *One Way Anova* menunjukkan hasil sig. < 0,05 yang artinya masing-masing dari sampel memiliki perbedaan yang signifikan satu dengan yang lain. Dilanjut uji *Post Hoc Tukey* menunjukkan hasil 6 subset kelompok. Hasil analisis dengan SPSS rata-rata tertinggi yaitu pada kontrol positif nattokinase dan terendah kontrol negatif buffer fosfat. Hal ini sudah sesuai dengan teoritis dan validasi metode. Sampel tertinggi pada pelet pemurnian 2 dengan konsentrasi 80%, hal ini dapat terjadi karena faktor konsentrasi sampel yang lebih besar daripada konsentrasi yang lain.

4. Kesimpulan

Kadar protein ekstrak enzim daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan metode *Lowry*, pelet pemurnian 1 sebesar 196,22 µg/ml dan pelet pemurnian 2 sebesar 306,33 µg/ml. Ekstrak enzim daun pepaya memiliki aktivitas sebagai agen fibrinolitik secara *in vitro*, dan konsentrasi dari ekstrak enzim daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang memiliki aktivitas optimal sebagai agen fibrinolitik yaitu konsentrasi 80%.

Referensi

- [1] Wardhani NR, Martini S. Faktor yang Berhubungan dengan Pengetahuan Tentang Stroke pada Pekerja Institusi IPendidikan Tinggi Related factor of Knowledge by Stroke in Institute of Higher Education Employees. *J Berk Epidemiol* 2014;2:13-23.
- [2] Kotb E. Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus megaterium* KSK-07 isolated from kishk, a traditional Egyptian fermented food. *Appl Biochem Microbiol* 2015;51:34-43. <https://doi.org/10.1134/S000368381501007X>.
- [3] Rohmah MK, Fickri DZ. Uji Aktivitas Antiplatelet, Antikoagulan, dan Trombolitik Alkaloid Total Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) secara in Vitro. *J Sains Farm Klin* 2020;7:115. <https://doi.org/10.25077/jsfk.7.2.115-125.2020>.
- [4] Wang W, Vignani R, Scali M, Cresti M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 2006;27:2782-6. <https://doi.org/10.1002/elps.200500722>.
- [5] Farmawati D, Wirajana I, Chandra Yowani S. Perbandingan Kualitas Dna Dengan Menggunakan Metode Boom Original Dan Boom Modifikasi Pada Isolat *Mycobacterium Tuberculosis* 151. *J Kim* 2015;9:41-6.
- [6] Purwanto MGM. Purwanto_Perbandingan Analisa_2014.pdf. *J Ilm Sainsn Teknol* 2014;7:1-71.
- [7] Prasad S, Kashyap RS, Deopujari JY, Purohit HJ, Taori GM, Daginawala HF. Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thromb J* 2006;4. <https://doi.org/10.1186/1477-9560-4-14>.
- [8] Nahdhiyati A, Krisna A. DARI DAUN KELOR (*Moringa oliefera* Lamk .) from *Moringa* Leaves (*Moringa oliefera* Lamk .). *J Teknol Pertan Vol 15 No 3* [Desember 2014] 191-200 2014;15:191-200.
- [9] Sebayang R, Idawati Y, Sinaga H. Analisis Lactat Dehydrogenase dalam Serum Darah Menggunakan Sentrifugasi. *J Keperawatan Silampari* 2020;4:274-80. <https://doi.org/10.31539/jks.v4i1.1450>.
- [10] Fitria F, Rahmani N, Pujiyanto S, Raharjo B, Yopi Y. Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Enzim Xilanase dari Bakteri Laut *Bacillus safencis* strain LBF P20 Asal Pulau Pari Jakarta. *Agritech* 2017;37:31. <https://doi.org/10.22146/agritech.17004>.
- [11] Purwanto MGM. The Role and Efficiency of Ammonium Sulphate Precipitation in Purification Process of Papain Crude Extract. *Procedia Chem* 2016;18:127-31. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.020>.
- [12] Wahyuni S, Suarya P, Saputra IMA. ISOLASI ENZIM AMILASE DARI KECAMBAH BIJI JAGUNG LOKAL SERAYA (*Zea mays* L.) UNTUK HIDROLISIS PATI. *J Kim* 2017:122. <https://doi.org/10.24843/jchem.2017.v11.i02.p04>.
- [13] Hutami R, Bisyri H, Sukarno S, Nuraini H, Ranasasmita R. Ekstraksi DNA dari Ikan Kerapu. *J Agroindustri Halal* 2020;4:209-16.
- [14] Koopae HK, Koshkoiyeh AE. SNPs genotyping technologies and their applications in farm animals breeding Programs: Review. *Brazilian Arch Biol Technol* 2014;57:87-95. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100013>.
- [15] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 1987;43:1110-1. <https://doi.org/10.1007/BF01956052>.