

Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak dan Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) dengan Metode *Clot Lysis*

Test of the Fibrinolytic Activity of Kaffir Lime Leaves (*Citrus hystrix*) Extract and Fractions Using the *Clot Lysis* Method

Priskila Wahyuningsih*, Ana Indrayanti, Fransiska Leviana

Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi,
Jl. Let. Jend. Sutoyo, Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

*Email Korespondensi: dhe.priskilawahyuningsih@gmail.com

Abstrak

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) berasal dari famili *Rutaceae juss*. Daun jeruk purut memiliki kandungan flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, alkaloid, dan minyak atsiri. Pada penelitian ini ekstrak dan fraksi daun jeruk purut dibuat menjadi 3 konsentrasi yaitu 5, 10, dan 20 mg/mL. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dengan metode *clot lysis*. Aktivitas fibrinolitik dilihat dari lisisnya gumpalan darah pada tabung eppendorf. Ekstrak dan fraksi daun jeruk purut dilakukan pengujian kandungan kimia untuk mengetahui senyawa yang terkandung didalamnya yang memiliki aktivitas fibrinolitik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air memiliki aktivitas fibrinolitik. Sampel teraktif yang memiliki aktivitas fibrinolitik yaitu pada fraksi etil asetat dengan persentase lisis gumpalan darah sebesar 89,80% pada konsentrasi 20 mg/mL. Senyawa yang diduga memiliki aktivitas fibrinolitik yang terdapat di dalam fraksi etil asetat sebagai sampel teraktif yaitu flavonoid, saponin, dan minyak atsiri.

Kata Kunci: *clot lysis*, daun jeruk purut, fibrinolitik, fraksi

Abstract

Kaffir lime leaves (*Citrus hystrix*) come from the *Rutaceae juss* family. Kaffir lime leaves contain flavonoids, saponins, tannins, triterpenoids, alkaloids and essential oils. In this study, kaffir lime leaf extracts and fractions were made into 3 concentrations, namely 5, 10, and 20 mg/mL. This study aims to determine the fibrinolytic activity of *n*-hexane, ethyl acetate and water extracts and fractions using the *clot lysis* method. Fibrinolytic activity can be seen from the lysis of blood clots in the eppendorf tube. Kaffir lime leaf extracts and fractions were tested for chemical content to determine the compounds contained therein that have fibrinolytic activity. The results showed that the extract and

fractions of *n*-hexane, ethyl acetate and water had fibrinolytic activity. The most active sample that had fibrinolytic activity was the ethyl acetate fraction with a blood clot lysis percentage of 89.80% at a concentration of 20 mg/mL. Compounds that are thought to have fibrinolytic activity contained in the ethyl acetate fraction as the most active sample are flavonoids, saponins and essential oils.

Keywords: *clot lysis*, kaffir lime leaves, fibrinolytic, fraction

Diterima: 29 Januari 2024

Disetujui: 24 Maret 2024

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i2.2301>



Copyright (c) 2024, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.).
Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia.
This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

Cara Sitasi:

Wahyuningsih, P., Indrayanti, A., Leviana, F., 2024. Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak dan Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) dengan Metode *Clot Lysis*. *J. Sains Kes.*, 6(2). 317-327. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v6i2.2301>

1 Pendahuluan

Infark miokard merupakan salah satu penyakit atherotrombosis yang disebabkan oleh sumbatan bekuan darah (trombus) pada pembuluh darah (arteri) [1]. Sel jantung akan mengalami kerusakan yang disebabkan oleh berkurangnya pasokan oksigen (O₂) menuju miokardium apabila terjadi penyumbatan [2]. Bekuan darah pada penyakit infark miokard terjadi karena ruptur dari plak aterosklerosis pada dinding pembuluh darah [2]. Infark miokard yang disertai dengan elevasi segmen ST akut (STEMI) penyebab terjadinya okulasi total pembuluh darah arteri koroner. Pada keadaan ini diperlukan tindakan revaskularisasi sehingga dengan cepat dapat mengembalikan aliran darah dan reperfusi miokard [3].

Penyumbatan pada pembuluh darah yang disebabkan trombus dapat dihancurkan dengan menggunakan mekanisme fibrinolisis. Mekanisme fibrinolisis diawali dengan mengaktifkan plasminogen menjadi enzim proteolitik plasmin. Bentuk trombus akan diubah oleh plasmin dan plasmin akan membatasi perkembangan trombosis dengan memecah proteolitik fibrin [1]. Agen fibrinolitik

bisa diperoleh dari hewan, mikroorganisme, dan tanaman. Pada hewan enzim fibrinolitik ditemukan pada udang *Litopenaeus vannamei* dan usus ikan Tambaqui (*C. macropomum*) [4]. Pada mikroorganisme ditemukan pada hasil fermentasi makanan seperti nattokinase (NK) pada *Bacillus natto*, Dc-4, QK-1 dan QK-2 pada *Bacillus subtilis* QK02, dan Subtilisin DFE pada *Bacillus amyloliquefaciens* [5]. Sedangkan, pada tanaman agen fibrinolitik diperoleh dari daun johan (*Cassia siamea* L) [6] daun perupuk (*Lophoppetalum javanicum*) [7], kulit batang dan biji asam jawa (*Tamarindus indica*) [8] dan kulit buah jeruk purut (*Citrus hystrix*) [9].

Ada beberapa tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai agen fibrinolitik yang bisa digunakan untuk mengobati penyakit kardiovaskular. Tumbuhan jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan telah dikenal oleh masyarakat luas. Bagian yang dimanfaatkan sebagai obat tradisioanal adalah bagian buah maupun daunnya [10]. Daun jeruk merupakan salah satu tanaman yang banyak ditemukan di daerah tropis seperti Indonesia, digunakan oleh masyarakat sebagai rempah-rempah masakan.

Penelitian yang dilakukan Setyowati 2015 aktivitas trombolitik ekstrak etanol kulit buah jeruk purut secara *in vitro*, menunjukkan hasil bahwa ekstrak kulit buah jeruk purut memiliki aktivitas sebagai trombolitik yang dibuktikan dengan lisisnya bekuan darah yang semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak dan waktu inkubasi. Senyawa flavonoid, minyak atsiri, dan saponin diduga memiliki aktivitas sebagai agen trombolitik. Penelitian yang dilakukan oleh Qonitah *et al* 2022 membuktikan bahwa ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) positif mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, alkaloid, dan minyak atsiri. Dengan demikian, kandungan senyawa yang sama pada kulit buah jeruk purut dan daun jeruk purut seperti senyawa flavonoid, minyak atsiri, dan saponin yang diduga memiliki aktivitas fibrinolitik.

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian terkait aktivitas fibrinolitik dari bahan alam yaitu daun jeruk purut dengan menggunakan ekstrak etanol daun jeruk purut dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dalam beberapa konsentrasi. Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan metode *clot lysis* yang diharapkan dapat menjadi agen fibrinolitik secara *in vitro*.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat berupa alat timbang (Nankai), oven, ayakan no.40, bejana maserasi, *rotary evaporator*, *Moisture Balance*, alat penangas air (Shagufta Laboratory), kertas saring (Whatmann), kain flannel, *beaker glass* (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), inkubator (Mimmert), penggaris (Butterfly), tabung reaksi (Pyrex), mikropipet (DragonMed), pipet tetes (Pyre), batang pengaduk (Pyrex), *sterling bidwell, chamber*, dan lampu UV.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun jeruk purut yang tidak terlalu tua dan terlalu muda, berwarna hijau, segar, dan bebas penyakit, plasma darah kelinci, etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, air (aquadest), tween 80, H₂SO₄, HCl pekat, FeCl₃, *n*-butanol, asam asetat, AlCl₃ 5%, metanol, pereaksi

Dragendroff, pereaksi Liebermann Bouchardat, pereaksi anisaldehyd, asam sulfat, eugenol, toluen, magnesium sulfat, kloroform, asam asetat anhidrat, dan silika gel GF₂₅₄.

2.2 Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan di Unit Laboratorium UPT Laboratorium Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Karanganyar, Jawa Tengah. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari tumbuhan daun jeruk purut (*Citrus hystrix*).

2.3 Pengambilan bahan

Daun jeruk purut diperoleh dari daerah Tawangmangu pada bulan Agustus 2023, bagian daun yang diambil yaitu pada kondisi tidak terlalu tua dan muda, hijau, segar, dan bebas penyakit.

2.4 Pengeringan bahan

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dicuci dengan air mengalir sampai bersih, keringkan dengan sinar matahari dan dioven dengan suhu 50°C agar benar-benar kering. Tujuan dilakukan pengeringan bahan agar dapat mengurangi kadar air sehingga pertumbuhan jamur dan bakteri dapat dicegah.

2.5 Pembuatan serbuk daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang telah kering dibuat serbuk dengan cara diblender sampai halus dan diayak dengan ayakan no 40 mesh.

2.6 Penetapan susut pengeringan daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Penetapan susut pengeringan serbuk daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dilakukan dengan menggunakan alat *Moisture Balance* yang direplikasi sebanyak 3 kali. Cara pengerjaannya dilakukan dengan menimbang serbuk daun jeruk purut sebanyak 2 gram, mengatur temperatur pada suhu 105°C dan alat dihidupkan, ditunggu sampai alat berbunyi yang dimana menandakan analisis telah selesai.

2.7 Pembuatan ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Pembuatan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) menggunakan metode maserasi. Serbuk daun jeruk purut 600 gram dimasukkan

dalam maserator, ditambahkan etanol 96% sebanyak 6 L dengan perbandingan 1:10, pada 6 jam pertama serbuk direndam dan diamkan selama 18 jam. Setelah 24 jam saring serbuk menggunakan kain flannel untuk penyaringan pertama dan penyaringan kedua menggunakan kertas saring. Kemudian dilakukan remaserasi menggunakan pelarut yang sama dengan jumlah pelarut setengah dari pelarut sebelumnya yaitu sebanyak 3 L. Maserat I dan II dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sampai terbentuk ekstrak kental [11].

2.8 Perhitungan rendemen ekstrak

Rendemen yang diperoleh sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada monografi ekstrak. Menghitung rendemen ekstrak yang diperoleh dengan rumus persamaan 1.

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 1})$$

2.9 Identifikasi ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

2.9.1 Pemeriksaan organoleptis.

Ekstrak daun jeruk purut dilakukan pemeriksaan organoleptis dengan cara mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak.

2.9.2 Penetapan kadar air.

Ditimbang sejumlah ekstrak kurang lebih 5 g, masukkan ke dalam labu kering atau labu alas bulat dengan menambahkan larutan toluen yang telah dijenuhkan sebanyak 200 mL melalui mulut pendingin sampai leher alat penampung. Labu dipanaskan selama 15 menit. Setelah toluen yang dipanaskan mulai mendidih, kecepatan penyulingan diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik hingga 4 tetes tiap detik. Pemanasan dilanjutkan selama 5 menit apabila semua air telah tersuling. Tabung penerima didinginkan hingga suhu ruang. Kemudian membaca volume dan menghitung kadar air dalam % v/b setelah air dan toluen memisah dengan sempurna [11].

2.10 Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

2.10.1 Identifikasi flavonoid.

Ditimbang ekstrak daun jeruk purut sebanyak 1 mL ditambah 3 mL etanol 70%, lalu digojog dan didihkan. Pengojokan dilakukan sekali lagi kemudian disaring. Ditambahkan Mg 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat ke dalam filtrat yang telah diperoleh. Ekstrak akan berubah menjadi warna merah, orange, dan hijau jika sampel terbukti mengandung senyawa flavonoid [12].

2.10.2 Identifikasi alkaloid.

Ditimbang 0,5 g ekstrak daun jeruk purut ditambahkan dengan 0,5 HCl 1 mL diikuti dengan penambahan 1-2 tetes pereaksi Dragendorff. Terbentuk warna endapan coklat jika sampel terbukti mengandung senyawa alkaloid [13].

2.10.3 Identifikasi tanin.

Sebanyak 1 mL larutan uji direaksikan dengan besi (III) klorida 10%, hasil positif tanin jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan [14].

2.10.4 Identifikasi saponin.

Ditimbang ekstrak etanol daun jeruk purut sebanyak 1 mL panaskan dengan penangas air yang sebelumnya telah ditambahkan dengan 10 mL aqua destilata. Lanjutkan dengan dikocok vertikal selama 10 detik. Hasil terbukti positif saponin jika terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama kurang dari 10 menit.

2.10.5 Identifikasi minyak atsiri.

Sebanyak 1 mL larutan uji diuapkan diatas cawan porselin sampai tersisa residu. Jika tercium bau khas yang dihasilkan dari residu berarti larutan uji positif mengandung minyak atsiri [15].

2.10.6 Identifikasi triterpenoid.

Diuapkan 2 mL filtrat dalam cawan penguap. Residu yang dihasilkan dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Setelah itu, melalui dinding tabung ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat. Jika terbentuk cincin kecoklatan atau violet berarti sampel positif mengandung triterpenoid [15].

2.11 Fraksinasi

Proses fraksinasi dilakukan dengan menimbang ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebanyak 10 g, ekstrak dilarutkan dengan 5 mL etanol ditambah 70 mL pelarut air, difraksinasi sebanyak 3 kali atau sampai berubah warna dengan pelarut *n*-heksana masing-masing sebanyak 75 mL, fraksi *n*-heksana yang telah didapat selanjutnya diuapkan sampai pekat. Fraksinasi dilanjut dengan menggunakan residu yang didapatkan dari fraksi *n*-heksana, fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali atau sampai berubah warna dengan menggunakan pelarut etil asetat masing-masing sebanyak 75 mL. Fraksi etil asetat yang telah didapat selanjutnya diuapkan sampai pekat. Sisa residu yang didapat dari fraksi etil asetat adalah fraksi air kemudian diuapkan sampai pekat. Tiga fraksi yang telah didapatkan kemudian dihitung rendemennya dengan menggunakan rumus persamaan 2.

$$\text{Rendemen Fraksi} = \frac{\text{bobot fraksi (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 2})$$

2.12 Pembuatan suspensi ekstrak dan fraksi daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

Ekstrak etanol dan fraksinasi daun jeruk purut yang diperoleh ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan, lalu ditambahkan akuades dengan 1% tween 80 dan dilakukan pengadukan.

2.13 Pembuatan larutan Nattokinase

Sebanyak 100 mg serbuk dari sediaan kapsul nattokinase (sama dengan 2.000 FU nattokinase) lalu dituangkan ke dalam labu ukur 10 mL. Kemudian serbuk dilarutkan dengan menggunakan aquades dengan 1% tween 80 hingga tanda batas. Suspensi dihomogenkan hingga terdispersi merata, sehingga didapatkan suspensi nattokinase 10.000 µl/mL (10 mg/mL).

2.14 Pengujian aktivitas fibrinolitik

Pembuatan media dilakukan dengan cara setiap 250 µl darah kelinci dipindahkan ke tiap-tiap tabung eppendorf steril yang sudah

ditimbang sebelumnya kemudian darah diinkubasi dengan suhu 37°C selama 90 menit hingga menggumpal. Bagian darah yang tidak menggumpal diambil dengan mikropipet dan dibuang. Tabung eppendorf yang sudah berisi darah yang menggumpal selanjutnya ditimbang untuk memastikan berat gumpalan darah yang terbentuk (berat gumpalan darah = berat eppendorf berisi gumpalan darah - berat eppendorf kosong). Suspensi ekstrak etanol dan fraksinasi daun jeruk purut dengan konsentrasi 5, 10, dan 20 mg/mL ditambahkan ke dalam masing-masing eppendorf sebanyak 100 µl. Pada eppendorf lainnya ditambahkan 100 µl larutan nattokinase sebagai kontrol positif. Aquades dengan 1% tween 80 digunakan sebagai kontrol negatif. Tabung eppendorf yang berisi sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit dan diamati lisisnya gumpalan darah yang terjadi.

Darah yang telah lisis setelah diinkubasi dibersihkan dengan cara membalikkan tabung eppendorf sehingga membuat darah yang telah lisis akan turun dan tersisa gumpalan darah pada tabung eppendorf. Tabung eppendorf kemudian ditimbang kembali untuk mengamati perbedaan berat gumpalan sebelum dan sesudah perlakuan. Perubahan berat gumpalan darah tersebut kemudian dibandingkan dan dinyatakan dalam presentase lisis gumpalan darah. Presentase (%) lisis gumpalan darah dapat dihitung dengan rumus [16] pada persamaan 3.

$$\% \text{Lisis} = \frac{\text{berat eppendorf (setelah perlakuan - kosong)}}{\text{berat eppendorf (sebelum perlakuan - kosong)}} \times 100\% \quad (\text{Persamaan 3})$$

2.15 Identifikasi kandungan kimia hasil fraksinasi

2.15.1 Identifikasi flavonoid.

Fase gerak yang digunakan yaitu *n*-butanol:asam asetat:air (4 : 1 : 5). Baku pembanding yang digunakan yaitu Kuersetin dan penampak bercak berupa pereaksi semprot aluminium (III) Klorida 5% dalam etanol. Hasil positif flavonoid jika tampak bercak noda berwarna kuning kehijauan pada penyemprotan pereaksi aluminium (III) Klorida

5% dalam etanol. Tanpa pereaksi kimia dibawah lampu UV 365 nm flavonoid akan berflourosensi menjadi biru, kuning, atau hijau tergantung dari strukturnya [17].

2.15.2 Identifikasi saponin.

Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform : metanol : air (13 : 7: 2) dengan menggunakan baku pembanding murni [18]. Pereaksi Liberman Bouchardat digunakan sebagai penampak bercak. Hasil positif saponin jika timbulnya warna hijau setelah penyemprotan dengan pereaksi Liberman Bouchardat [17].

2.15.3 Identifikasi Minyak atsiri.

Ditimbang 1 g sampel dimaserasi dengan 20 mL n-heksana selama 1 jam kemudian disaring dan diperoleh filtrat. Selanjutnya dilakukan analisis KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak toluene-etil asetat (93:7) dengan baku eugenol. Kemudian dilihat pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Setelah itu, disemprot dengan pereaksi anisaldehyd asam sulfat dan dipanaskan pada oven pada suhu 100°C selama 5-10 menit. Positif mengandung minyak atsiri apabila setelah disemprotkan dengan pereaksi memberikan noda berwarna biru, violet, merah, atau coklat pada sinar tampak dan setelah beberapa saat senyawa akan berflouresensi di bawah sinar UV 366 nm.

2.16 Analisis data

Pada penelitian ini analisis data menggunakan cara pendekatan *statistik analysis of variance* (ANOVA) *one way*, data berbeda signifikan apabila nilai $P < 0,05$.

3 Hasil dan Pembahasan

Daun jeruk purut sebelum proses pengeringan sebanyak 13.000 g. Setelah dilakukan proses pengeringan, bobot kering yang diperoleh adalah sekitar 1.200 g. Dari data yang telah didapatkan, selanjutnya dihitung persentase rendemen dari bobot kering terhadap bobot basah daun jeruk purut dan diperoleh persentase rendemen sebesar 9,23%. Pada penelitian yang dilakukan oleh Maimunah *et al* 2020 dari 3.000 g daun jeruk purut basah menjadi 600 g daun kering dan dihasilkan persentase sebesar 20%. Pada penelitian ini persentase bobot kering terhadap bobot basah

daun jeruk purut lebih kecil dipengaruhi lingkungan tempat daun jeruk purut dikeringkan dan pengaruh kadar air yang terdapat di dalam daun jeruk purut yang banyak menghilang setelah pengeringan. Setelah melalui tahap pengeringan bobot daun jeruk purut mengalami penyusutan dikarenakan pengaruh dari kondisi daun jeruk purut yang semula dalam keadaan basah yang memiliki banyak kandungan air menjadi kering yang artinya kandungan air telah berkurang. Tahap selanjutnya yaitu daun jeruk purut yang telah kering diserbuk hingga halus sampai menjadi serbuk dengan derajat kehalusan 40 mesh dan didapatkan berat serbuk sebanyak 1.000 g dengan presentase rendemen yang diperoleh sebesar 83,33%.

Hasil rata-rata susut pengeringan serbuk dengan menggunakan metode *Moisture Balance* sebesar 8,3% dengan standar deviasi sebesar 0,29. Pada penelitian yang dilakukan oleh Putri 2017 menyatakan bahwa susut pengeringan tertinggi simplisia daun jeruk purut adalah sebesar 8,55% dengan rekomendasi susut pengeringan tidak lebih dari 10%. Hal ini menunjukkan bahwa susut pengeringan serbuk daun jeruk purut pada penelitian ini telah sesuai dengan persyaratan yaitu tidak lebih dari 10% [11]. Penetapan susut pengeringan merupakan salah satu pengujian yang bertujuan untuk menunjukkan batas maksimal suatu senyawa yang hilang pada proses pengeringan yang telah dilakukan [19].

Serbuk daun jeruk purut yang digunakan untuk maserasi sebanyak 600 g. Setelah dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dan diremaserasi sebanyak 1 kali dan dilanjutkan dengan melakukan pemisahan menggunakan *vacum rotary evaporator* dan didapatkan berat ekstrak kental sebanyak 82 g dengan rendemen ekstrak sebesar 13,67%. Pada pemeriksaan organoleptis daun jeruk purut memiliki bentuk ekstrak yang kental, berwarna hijau pekat dan memiliki aroma yang khas daun jeruk purut. Pada rata-rata kadar air ekstrak daun jeruk purut sebesar 8 dengan standar deviasi 2. Kandungan kadar air yang terlalu tinggi pada ekstrak dapat menyebabkan pertumbuhan mikroba dan jamur.

Tabel 1. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

| Kandungan kimia | Hasil | Pustaka | Kesimpulan |
|-----------------|---------------------------------|--|------------|
| Flavonoid | Terbentuk warna orange | Terbentuk warna merah, orange, dan hijau [12] | + |
| Alkaloid | Terbentuk endapan coklat | Terbentuk endapan coklat kehitaman dengan pereaksi Dragendorff [13] | + |
| Tanin | Terbentuk warna hitam kehijauan | Terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan [14] | + |
| Saponin | Terbentuk busa stabil | Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama kurang dari 10 menit menunjukkan adanya saponin [20] | + |
| Minyak atsiri | Tercium bau khas | Tercium bau khas yang dihasilkan residu [15] | + |
| Triterpenoid | Terbentuk cincin kecoklatan | Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan [15] | + |

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun jeruk purut positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, minyak atsiri, dan triterpenoid yang sesuai dengan pustaka. Ekstrak etanol daun jeruk memberikan hasil positif ditandai dengan timbulnya warna orange, alkaloid ditandai dengan timbulnya endapan coklat, tanin ditandai dengan timbulnya warna hitam kehijauan, saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil, minyak atsiri ditandai dengan terciumnya bau khas, triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol daun jeruk purut dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 2 Hasil rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

| Berat ekstrak | Bobot fraksi (g) | | | Rendemen (%) | | |
|---------------|-------------------|-------------|--------|-------------------|-------------|-------------|
| | <i>n</i> -heksana | Etil asetat | Air | <i>n</i> -heksana | Etil asetat | Air |
| 10,0777 | 2,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 19,84 | 9,92 | 9,92 |
| 10,0636 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 9,93 | 9,93 | 9,93 |
| 10,0980 | 1,0000 | 1,0000 | 3,0000 | 9,90 | 9,90 | 29,70 |
| | Rata-rata±SD | | | 13,22±5,73 | 9,91±0,01 | 16,51±11,41 |

Hasil rendemen fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air daun jeruk purut diperoleh presentase rata-rata sebesar 13,22%±5,73; 9,91±0,01; dan 16,51±11,41. Pada penelitian ini

bobot fraksi yang dihasilkan rendah karena pengaruh dari proses penguapan yang dilakukan menggunakan waterbath, banyaknya ekstrak yang tertinggal pada wadah dan corong pisah dan kurangnya kekentalan ekstrak untuk proses fraksinasi. Hasil rendemen yang dihasilkan pada setiap pelarut juga berbeda, hal ini dikarenakan perbedaan kemampuan pelarut untuk menyari senyawa yang ada didalam daun jeruk purut. Pada hasil rendemen fraksi *n*-heksana dan etil asetat memiliki rendemen yang lebih kecil dari fraksi air dikarenakan tingkat kemampuan pelarut untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar lebih besar. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suharjo 2019, hanya melakukan fraksinasi daun jeruk purut menggunakan etil asetat dan diperoleh rendemen fraksi etil asetat sebesar 2,76%. Hasil rendemen fraksinasi dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 3 Hasil pengujian fibrinolitik

| Sampel | Presentase lisis gumpalan darah (%) | | | X ± SD |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Replikasi 1 | Replikasi 2 | Replikasi 3 | |
| | Kontrol + | 96,63 | 96,92 | |
| Kontrol - | 8,22 | 8,97 | 11,8 | 9,66±1,89 |
| Ekstrak 5 mg/mL | 21,30 | 22,45 | 27,34 | 23,70±3,21 |
| Ekstrak 10 mg/mL | 33,82 | 34,94 | 38,82 | 35,86±2,62 |
| Ekstrak 20 mg/mL | 51,39 | 54,54 | 59,34 | 55,09±4,00 |
| Fraksi <i>n</i> -heksana 5 mg/mL | 8,22 | 10,31 | 13,80 | 10,78±2,82 |
| Fraksi <i>n</i> -heksana 10 mg/mL | 19,28 | 23,80 | 27,55 | 23,54±4,14 |
| Fraksi <i>n</i> -heksana 20 mg/mL | 30,30 | 36,90 | 44,11 | 37,10±6,91 |
| Fraksi etil asetat 5 mg/mL | 50,23 | 62,05 | 64,85 | 59,04±7,76 |
| Fraksi etil asetat 10 mg/mL | 66,95 | 71,33 | 86,88 | 75,05±10,47 |
| Fraksi etil asetat 20 mg/mL | 84,33 | 90,14 | 94,94 | 89,80±5,31 |
| Fraksi air 5 mg/mL | 14,28 | 18,52 | 27,00 | 19,93±6,48 |
| Fraksi air 10 mg/mL | 28,45 | 34,94 | 43,00 | 35,46±9,29 |
| Fraksi air 20 mg/mL | 43,00 | 50,69 | 51,38 | 48,36±4,65 |

Berdasarkan tabel 3 aktivitas fibrinolitik yang dinyatakan dalam persentase lisis gumpalan darah yang terbesar ialah pada kontrol positif dengan rata-rata persentase lisis bekuan sebesar 96,85%. Kontrol positif yang digunakan adalah nattokinase. Penggunaan nattokinase dipilih sebagai kontrol positif karena dapat mendegradasi fibrin dan fibrinogen [21]. Nattokinase juga merupakan agen fibrinolitik yang memiliki harga yang lebih terjangkau dibandingkan agen fibrinolitik lainnya. Kontrol negatif memiliki persentase lisis bekuan yang terkecil yaitu 9,66% karena kontrol negatif tidak memiliki peran sebagai agen fibrinolitik. Kontrol negatif memberikan

hasil persentase gumpalan darah karena darah yang digunakan pada kontrol ini kurang mengumpul dan masih mengandung serum. Kontrol negatif yang digunakan yaitu aquadest yang ditambahkan dengan 1% tween 80. Penggunaan 1% tween 80 sebagai campuran dalam aquadest karena tween merupakan surfaktan yang cocok yang bisa melarutkan ekstrak dan fraksi.

Pada pengujian dengan sampel ekstrak etanol dan fraksi daun jeruk purut dengan konsentrasi 5, 10, dan 20 mg/mL, semua sampel memiliki aktivitas sebagai agen fibrinolitik yang dibuktikan dengan lisisnya gumpalan darah. Pada ekstrak etanol daun jeruk purut menghasilkan rata-rata persentase lisis sebesar 23,70; 35,86; dan 55,09%. Pada fraksi *n*-heksana sebesar 10,78; 23,54; dan 37,10%. Pada fraksi etil asetat sebesar 59,04; 75,05; dan 89,80%. Pada fraksi air sebesar 19,93; 35,46; dan 48,36%. Dapat dilihat bahwa yang memiliki rata-rata persentase lisis yang terbesar ialah pada fraksi etil asetat 20 mg/mL yaitu sebesar 89,80%. Fraksi etil asetat memiliki presentase lisis gumpalan darah terbesar karena etil asetat merupakan pelarut semi polar sehingga memiliki kemampuan untuk menarik senyawa yang diduga memiliki aktivitas fibrinolitik baik yang bersifat polar maupun non polar. Sedangkan, yang memiliki persentase lisis yang terkecil ialah pada sampel *n*-heksana 5 mg/mL yaitu sebesar 10,78%.

Hasil persentase lisis gumpalan darah pada penelitian ini berbeda-beda karena konsentrasi yang digunakan juga tidak sama. Hal ini membuktikan bahwa semakin besar konsentrasi atau dosis maka persentase lisis yang dihasilkan akan semakin besar karena semakin banyaknya senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu sampel. Selain itu juga, kandungan senyawa yang memiliki aktivitas fibrinolitik sangat berpengaruh dalam melisis gumpalan darah yang terbentuk. Pada penelitian yang dilakukan oleh Setyowati 2015 menunjukkan bahwa senyawa yang diduga memiliki aktifitas untuk terjadinya fibrolisis adalah senyawa flavonoid, saponin, dan minyak atsiri dengan mekanisme kerja meningkatkan *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA). Pada senyawa flavonoid juga dapat menurunkan kandungan *plasminogen activator inhibitor-1* dan dapat mengurangi terbentuknya trombosis serebral yang

ditunjukkan dengan hasil persentase lisis gumpalan darah sebesar 61,9474% yang menggunakan sampel ekstrak etanol kulit daun jeruk purut dengan konsentrasi 20 mg/mL.

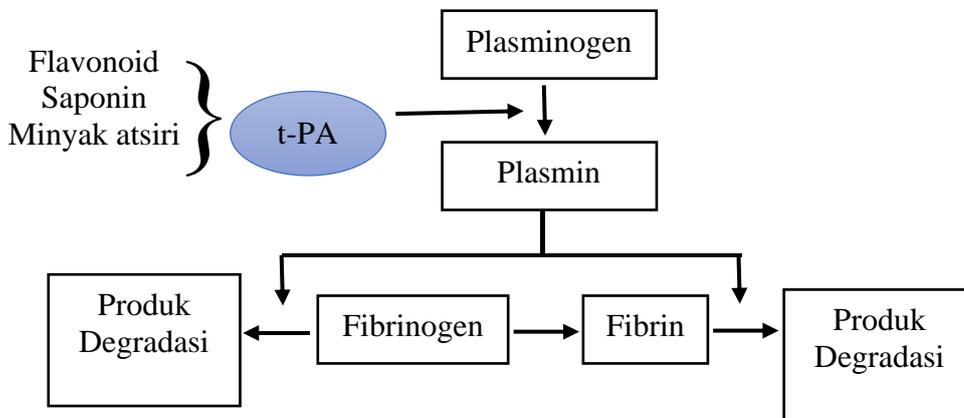
Identifikasi flavonoid pada fraksi *n*-heksana terdapat bercak pada lempeng setelah dilihat menggunakan lampu UV 254 nm dan 366 nm dengan warna kuning kehijauan, nilai Rf pada standar 0,82 dan Rf pada sampel 0,9. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana negatif mengandung senyawa flavonoid. Pada fraksi etil asetat terdapat bercak yang berwarna kuning kehijauan setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Terdapat nilai Rf yang sama pada standar dan juga sampel yang digunakan, standar Kuersetin 0,64 dan sampel 0,6. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid. Pada fraksi air terdapat bercak yang berwarna kuning kehijauan setelah dilihat menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Nilai Rf pada standar 0,78 dan Rf pada sampel 0,56. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi air positif mengandung senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan salah satu jenis pigmen kuning yang berasal dari 2-fenil kromogenon sebagai inti induk dan memiliki kerangka dasar senyawa yaitu C6-C3-C6 [22]. Flavonoid dapat meningkatkan *tissue plasminogen activator* (t-PA) dan menurunkan kandungan *plasminogen activator inhibitor-1*. Plasmin dapat dengan mudah diaktifkan oleh plasminogen yang terikat pada permukaan sel yang dapat menyebabkan fibrinolisis [23].

Identifikasi saponin pada fraksi *n*-heksana terdapat bercak yang berwarna hijau kebiruan setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan pada 366 nm. Nilai Rf pada standar 0,96 dan Rf pada sampel 0,9. Walaupun memiliki nilai Rf yang sama tetapi warna yang terlihat pada sinar UV berbeda sehingga fraksi *n*-heksana tidak mengandung saponin. Pada fraksi etil asetat terdapat bercak yang berwarna hijau kebiruan setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Terdapat nilai Rf yang sama pada standar dan juga sampel yang digunakan, standar 1,0 dan sampel 1,0. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa saponin. Pada fraksi air terdapat bercak yang berwarna hijau kebiruan setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Terdapat nilai Rf yang sama pada standar dan juga sampel yang digunakan, standar 0,96 dan sampel 0,96. Hal ini

menunjukkan bahwa fraksi air positif mengandung senyawa saponin. Saponin merupakan senyawa metabolit sekunder yang dimiliki dalam suatu tanaman. Saponin mampu membentuk busa dan mempunyai kandungan aglikon polisiklik yang mampu berikatan satu atau lebih [24]. Senyawa Saponin yang terdapat didalam ekstrak tanaman diduga memiliki aktivitas trombolitik atau fibrinolitik karena memiliki mekanisme kerja sebagai *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA) [23].

Identifikasi minyak atsiri pada fraksi *n*-heksana terdapat bercak yang berwarna biru setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan berfluoresensi biru jingga pada 366 nm. Terdapat 3 nilai Rf yang sama pada standar dan juga sampel yang digunakan, standar 0,32; 0,42; 0,7 dan sampel 0,38; 0,46; 0,7; 0,78. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana positif mengandung senyawa minyak atsiri. Pada fraksi etil asetat terdapat bercak yang berwarna biru setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Terdapat nilai Rf yang sama pada standar

dan juga sampel yang digunakan, standar 0,14 dan sampel 0,14. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa minyak atsiri. Pada fraksi air terdapat bercak yang berwarna biru setelah dilihat pada sinar UV 254 nm dan tidak berfluoresensi pada 366 nm. Pada standar yang digunakan terdapat 3 nilai Rf 0,26; 0,36; 0,6 dan pada sampel 0,94. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi air negatif mengandung senyawa minyak atsiri. Minyak atsiri merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder jenis minyak nabati yang memiliki banyak kegunaan. Bagian tanaman yang memiliki kandungan minyak atsiri seperti daun, bunga, buah, biji, kulit biji, batang, akar atau rimpang. Ciri utama yang dimiliki oleh minyak atsiri yaitu mudah menguap dan memiliki aroma yang khas [25]. Minyak atsiri memiliki aktivitas sebagai trombolitik atau fibrinolitik karena memiliki peran sebagai *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA) yang mirip dengan senyawa flavonoid [26].



Gambar 1 Mekanisme senyawa yang diduga memiliki aktivitas fibrinolitik [23, 26]

Senyawa flavonoid, saponin, dan minyak atsiri pada penelitian ini diduga memiliki aktivitas sebagai agen fibrinolitik karena mempunyai mekanisme kerja sebagai *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA) dari sel vaskular trombosit. Senyawa ini mampu meningkatkan *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA) dan pada senyawa flavonoid dapat menurunkan kandungan *plasminogen activator inhibitor-1*. Sehingga dengan adanya ketiga senyawa ini yaitu flavonoid, saponin dan minyak atsiri yang

diduga memiliki aktivitas fibrinolitik mampu mendorong plasminogen untuk dapat mengaktifkan plasminogen sehingga akhirnya dapat mengarah pada fibrinolisis.

4 Kesimpulan

Ekstrak etanol daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air memiliki aktivitas fibrinolitik yang ditunjukkan dengan adanya lisisnya gumpalan darah. Fraksi etil asetat pada konsentrasi 20 mg/mL

merupakan fraksi teraktif yang memiliki aktivitas fibrinolitik yang ditunjukkan dengan rata-rata persentase lisis gumpalan sebesar 89,80%. Senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat yang diduga memiliki aktivitas sebagai agen fibrinolitik yaitu senyawa flavonoid, saponin, dan minyak atsiri karena memiliki mekanisme kerja meningkatkan *Tissue Plasminogen Activator* (t-PA). Pada senyawa flavonoid dapat menurunkan kandungan *plasminogen activator inhibitor-1* dan dapat mengurangi terbentuknya trombus serebral.

5 Pernyataan

5.1 Penyandang dana

Penelitian ini tidak mendapatkan dukungan dana dari sumber manapun.

5.2 Kontribusi Penulis

Semua penulis berkontribusi dalam penulisan artikel ini.

5.3 Konflik kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6 Daftar Pustaka

- [1] Bimantara HA, R. Purwaningsih, D dan Indrayati, A. 2022. Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Fibrinolitik Bakteri *Bacillus cereus* yang Diisolasi dari Air Hutan Mangrove Maroon Edupark Semarang secara In Vitro. *Jurnal Farmasi Indonesia* 19(1).
- [2] Dipiro, J. et al. 2009. Acute Coronary Syndrome. In *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 8th ed. United States: McGraw-Hill Education. pp.642-575.
- [3] Menkes RI. 2019. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/675/2019 tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Sindroma Koroner Akut.
- [4] Oliveira, V. de M. Assis, C.R.D., Silv, J.C. Silva, Q.J. Bezerra, R. de S. Porto, A.L.F. 2019. Recovery of Fibrinolytic and Collagenolytic Enzymes From Fish and Shrimp By Products: Potential Source For Biomedical Applications. *Boletim Do Instituto de Pessca* 45(1): 1-10.
- [5] Peng, Y. Yang, X. and Zhang, Y. 2005. Microbial Fibrinolytic Enzymes: An Overview of Source, Production, Properties, and Thrombolytic Activity In Vivo. *Microbiology and Biotechnology* 69: 126-132.
- [6] Vani, M., Rani, P.V., Madhuri, O., Sree, M. V.S, Sai Ramya, L., Chandrika, M.G., Padmalatha, K., Supriya, J., 2019. Phytochemical and In Vitro Thrombolytic Activity Evaluation of *Cassia siamea* L., Leguminosae Leaf Extracts, and Pyrogallol. *International Journal of Green Pharmacy* 13: 213.
- [7] Ferdous, R.U. Azam, G. Hossain, D. 2014. Phytochemical Screening, in-Vitro Membrane Stabilizing and Thrombolytic Activities of *Lophopetalum javanicum*. *International Journal of pharmaceutical Sciences and Research* 5: 350-353.
- [8] Biswas, K. Azad, A. K. Sultana, T. Khan, F. Hossain, S. Chowdhary, R. Khatun, Y. 2017. Assessment of in-vitro cholinesterase inhibitory and thrombolytic potential of bark and seed extracts of *Tamarindus indica* (L.) relevant to the treatment of Alzheimer's disease and clotting disorders. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 6(1):115-120.
- [9] Setyowati, R. 2015. Uji Aktivitas Antiplatelet dan Trombolitik Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) *EX VIVO*. *Skripsi*. Fakultas, Universitas Jember. Jember.
- [10] Budiyo, A. (2015). Potensi Antioksidan, Inhibitor Tirosinase, dan Nilai Toksisitas dari Beberapa Spesies Tanaman Mangrove di Indonesia. Bogor: Intitute Pertanian Bogor.
- [11] [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi II. Jakarta.
- [12] Huda, C. Putri, A. E Dan Sari D. W. 2019. Uji Aktivitas Fraksi dari Maserat *Ziberthinus folium* Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Sain Health* 3(1): 7- 14.
- [13] Dhavesia, V. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D. C.) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Skripsi*. Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta.
- [14] Robinson, T. 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi. Diterjemahkan Oleh Kokasih Padmawinata, 191-193, ITB, Bandung.
- [15] Ciulei, J. 1984. *Methodology for Analysis of VegeTabel and Drugs*. Bucharest Rumania: *Faculty of Pharmacy*. p. 11-26.
- [16] Rosariningtyas, M. G. 2022. Uji Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Enzim Daun Kentang (*Solanum tuberosum*) Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Surakarta.
- [17] Yanti Y. N., Densi S. S., & Cindy V. 2019. Fraksinasi dan Skrining Fraksi Biji Keblul (*Caesalpinia bonduc* L) Dengan Metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). *Borneo Journal of Pharmascientech* 3(1).
- [18] Noviyanty, Y., Reni, F., dan Hepiyansori. 2022. Fraksi dan Skrining Fraksi Ekstrak Etanol Daun

- Binahong (Anredera Cordifolia (Ten) Steenis) Dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Pharmacy* 9(2).
- [19] [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta.
- [20] [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1955. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [21] Milner, M. dan Makise, K. 2002. Natto and Its Active Ingredient Nattokinase A Potent and Safe Thrombolytic Agent. *Alternative and Complementary Therapies*.
- [22] Andersen M., Markham K.R. *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press/Taylor & Francis; Boca Raton, FL, USA: 2006. pp. 1-1239.
- [23] Bhowmick, R., Sarwa, S., Rahman, M. S., Das, A., B., Uddin, M. N., Islam, S dan Islam, M. S. 2014. *In vivo Analgesic, Antipyretic, And Anti-Inflammatory Potential In Swiss Albino Mice and In Vitro Thrombolytic Activity of Hydroalcoholic Extract from Litsea glutinosa leaves*. *Biological Research*. 76.
- [24] Majinda, R.R. T. 2012. *Extraction And Isolation Of Saponins. Natural Products Isolation, Methods In Molecular Biology*, 864(1), 415-417.
- [25] Rusli, M.S. 2010. Sukses Memproduksi Minyak Atsiri. *Agromedia Pustaka*. Jakarta
- [26] Akhila, A. Editor. 2010. *Essential Oil-Bearing Grasses*. New York : CRC Press