Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.)

Journal homepage: https://jsk.farmasi.unmul.ac.id

Potensi Ekstrak Kasar Enzim dari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine soja* (L.) Merr.) sebagai Obat Fibrinolitik Alami dengan Metode *Clot Lysis In Vitro*

Potential of Crude Enzymes from Black Soybean Tempeh (*Glycine soja* (L.) Merr.) as a Natural Fibrinolytic Medicine with *Clot Lysis In Vitro* Method

Nadea Sherly Widya Putri, Ana Indrayati*, Fransiska Leviana

Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi,
Jl. Let. Jend. Sutoyo, Mojosongo, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia
*Email Korespondensi: anaindrayati@setiabudi.ac.id

Abstrak

Enzim fibrinolitik adalah enzim yang dapat digunakan untuk memecah fibrin. Pada terapi trombus (penyakit kardiovaskular), enzim ini memiliki aktivitas yang mirip dengan plasmin yaitu mampu menurunkan fibrin dengan menghidrolisis fibrin menjadi produk terlarut dan menghambat pembentukan bekuan fibrin yang dapat memicu adanya penyakit kardiovaskular. Tempe kedelai hitam memiliki berbagai manfaat salah satunya adalah menurunkan risiko penyakit kardiovaskular dan mengurangi risiko penggumpalan darah. Karena kandungan enzim protease pada kedelai hitam yang mampu mendegradasi benang fibrin. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui potensi tempe kedelai hitam (*Glycine soja* (L.) Merr) dapat menghasilkan ekstrak enzim sebagai obat fibrinolitik alami. Penelitian ini dilakukan dengan pengambilan bahan, ekstraksi kasar enzim dari tempe kedelai hitam dengan sentrifugasi, pemurnian ekstrak kasar enzim menggunakan garam ammonium sulfat 80%, penetapan kadar protein enzim dengan metode Lowry serta pengujian potensi fibrinolitik dengan metode *clot lysis* secara *in vitro*. Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam pengujian adalah 12,5 ; 25 ; 50 dan 100%. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam mampu melisiskan bekuan darah. Kadar protein sampel ekstrak tempe kedelai hitam setelah dilakukan pemurnian menggunakan ammonium sulfat sebesar 245,76 µg/mL. Persentase lisis bekuan darah yang optimum pada konsentrasi 100% dari sampel yang setelah dilakukan pemurnian yaitu sebesar 59%.

Kata Kunci: Kedelai hitam, fibrinolitik, fibrin, ammonium sulfat, clot lysis

Abstract

Fibrinolytic enzymes are enzymes that can be used to break down fibrin. In thrombus therapy (cardiovascular disease), this enzyme has an activity similar to plasmin, which is able to reduce fibrin by hydrolyzing fibrin into dissolved products and inhibiting the formation of fibrin clots that can trigger cardiovascular disease. Black soybean tempeh has various benefits, one of which is to lower the risk of cardiovascular disease and reduce the risk of blood clots. Due to the content of the enzyme protease in black soybeans which is able to degrade fibrin threads. The purpose of this study is to determine the potential of black soybean tempeh (Glycine soja (L.) Merr) can produce enzyme extracts as natural fibrinolytic drugs. This study was conducted by taking ingredients, crude extraction of enzymes from black soybean tempeh by centrifugation, purification of crude extracts of enzymes using ammonium sulfate salts of 80%, determination of enzyme protein levels with the Lowry method and testing of fibrinolytic potential with the clot lysis method in vitro. The variation in the concentration of the extract used in the test was 12.5; 25; 50 and 100%. The results showed that crude extracts of black soybean tempeh enzymes were able to lyse blood clots. The protein content of the black soybean tempeh extract sample after purification using ammonium sulfate was 245.76 µg/mL. The optimum percentage of blood clot lysis at a concentration of 100% of the sample after purification was 59%.

Keywords: Black soybean, fibrinolytics, fibrin, ammonium sulfate, clot lysis

Received: 16 Januari 2023 **Accepted**: 24 Maret 2023

DOI: https://doi.org/10.25026/jsk.v5i2.1712

Copyright (c) 2023, 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.

How to Cite:

Putri, N.S.W., Indrayati, A., Leviana, F., 2023. Potensi Ekstrak Kasar Enzim dari Tempe Kedelai Hitam (*Glycine soja* (L.) Merr.) sebagai Obat Fibrinolitik Alami dengan Metode *Clot Lysis In Vitro*. *J. Sains Kes.*, **5**(2). 115-125. **DOI**: https://doi.org/10.25026/jsk.v5i2.1712

1 Pendahuluan

Penyakit kardiovaskular adalah gangguan kesehatan yang berhubungan dengan menurunnya kerja jantung atau pembuluh darah. Penyakit kardiovaskular menyebabkan kematian pada 17,3 juta orang di dunia, dengan proporsi 3 juta kematian berusia kurang dari 60 tahun. Menurut data statistik dunia, 9,4 juta kematian per tahun akibat penyakit kardiovaskular dan 45 % kematian tersebut adalah penderita jantung koroner. Diperkirakan jumlah ini akan meningkat menjadi 23,3 juta pada tahun 2030 [1]. Infark Miokard Akut (IMA) merupakan kematian sel miokard atau otot jantung karena kekurangan distribusi darah dan oksigen dalam waktu yang lama (sekitar 20 menit) akibat spasme atau sumbatan akut pada arteri koroner sehingga sel tidak dapat membuat ATP sehingga tidak mendapatkan energi. Fibrin merupakan protein yang berbentuk seperti serat benang-benang yang tidak larut dalam plasma darah pada saat terjadi proses pembekuan darah. Fibrin terbentuk dari

fibrinogen yang telah mengalami perubahan akibat aktivasi enzim fibrinolitik. Faktor pembekuan darah akan aktif kemudian menjadi benang-benang fibrin guna memberi sumbatan pada trombosit, sehingga menghentikan perdarahan [2].

Terdapat berbagai penelitian enzim fibrinolitik dan diketahui berasal dari mikroorganisme bahan pangan, sehingga berpotensi sebagai makanan fungsional dan alternatif pencegahan ataupun pengobatan penyakit [3]. Makanan yang berasal dari Jepang, *natto* terbuat kedelai dari fermentasi *Bacillus natto* diketahui berkemampuan memproduksi protease yang mempunyai aktivitas trombolitik [4]. Indonesia sendiri memiliki makanan fungsional seperti *natto* yaitu tempe adalah hasil fermentasi kedelai pada penelitian sebelumnya mempunyai efek fibrinolitik kuat yang ditandai dengan adanya zona bening pada media fibrin yaitu sebesar 60,8 FU/mL [5].

Sebagai negara tropis, Indonesia telah dikenal berbagai macam jenis tempe yang berasal dari kacang dan kedelai. Jenis kacang yang dimanfaatkan untuk pembuatan tempe seperti kacang tanah, kacang tholo, kecipir, kacang merah, kacang koro, kacang hijau, bahkan kacang gude. Lazimnya tempe berasal dari kedelai hitam atau kedelai kuning. Berdasarkan latar belakang tersebut akan dilakukan penelitian terhadap tempe kedelai hitam untuk memperoleh ekstrak kasar enzim fibrinolitik, sehingga dapat digunakan sebagai terapi pengobatan infark miokard pada jantung koroner. Penelitian ini dilakukan terhadap sampel ekstrak kasar enzim tempe dari kedelai hitam untuk mengetahui potensi ekstrak sebagai obat fibrinolitik alami yang diawali dengan pemurnian dan menetapkan kadar. Kemudian dilanjutkan pengujian fibrinolitik terhadap sampel ekstrak kasar enzim tempe dari kedelai hitam dengan variasi konsentrasi 12,5 ; 25 ; 50 dan 100%.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Fujitsu), pipet volume (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), oven (Memmert), inkubator (Memmert), corong kaca (Pyrex), *beaker glass* (Pyrex), mikropipet (Soccorex) yang berfungsi guna mengambil sampel dan bahan dengan keperluan skala microliter, tabung reaksi (Pyrex), pipet tetes (Pyrex), alat sentrifugasi (Hettich) yang memisahkan campuran padat dengan cair, tabung Erlenmeyer (Pyrex) guna mencampurkan komponen bahan larutan, thermometer (GEA), *magnetic stirrer* (Texcare), batang pengaduk (Pyrex), blender (Cosmos), kain flannel, spektrofotometer (Indotech), alat penangas air (WNB), *p*H meter (Eutech), dan tabung Eppendorf (Onemed).

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari sampel dan bahan analisa. Sampel yang digunakan adalah tempe kedelai hitam dari Grobogan, Provinsi Jawa Tengah. Sedangkan bahan analisa yang diguanakan adalah Buffer fosfat 0,05 M, *aquadest, Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma Aldrich) untuk larutan standar, garam ammonium sulfat (Pudak), natrium karbonat (Pudak), darah kelinci, *aquadest*, dan *Nattokinase* sebagai kontrol positif.

2.3 Pengambilan bahan

Pada penelitian ini menggunakan sampel tempe kedelai hitam yang didapatkan dari Grobogan, Provinsi Jawa Tengah. Tempe diambil acak dengan kriteria sudah di fermentasi selama 48 jam pada suhu 28-30° C, berbentuk padatan kompak, sudah berjamur, berwarna putih, memiliki aroma khas tempe dan tidak busuk. Dengan adanya jamur pada tempe dapat memproduksi beberapa enzim, salah satunya adalah enzim protease yang dapat menghidrolisis protein menjadi peptida yang lebih sederhana [6].

Pada tahap penelitian ini, sampel tempe diambil dengan metode pemilihan sampel secara non probabiliti untuk diuji aktivitas enzim fibrinolitiknya secara *clot lysis in vitro*.

2.4 Pembuatan ekstrak kasar enzim

Ekstraksi bertujuan untuk mengeluarkan ekstrak enzim dari sel dan jaringan tempe kedelai hitam atau untuk mendapatkan ekstrak kasar dari hasil sentrifugasi. Tempe kedelai hitam sebanyak 200 gram dipotong-potong,

kemudian ditambahkan dengan buffer fosfat 0,05 M dengan *p*H 7 (1:2) sebanyak 500 ml. Campuran dihaluskan dengan blender sampai rata dan homogen. Pada saat penambahan larutan dapar dilakukan secara sedikit demi sedikit dimasukkan agar dapat mencapai hasil yang optimal. Kemudian saring campuran menggunakan kain flannel untuk menghilangkan residu. Ekstrak enzim kasar merupakan supernatan yang didapatkan setelah sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm dengan suhu 4° C selama 30 menit [7].

2.5 Pemurnian ekstrak kasar enzim

Pemurnian ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam dilakukan dengan metode *salting out* yaitu dengan cara menambahkan ammonium sulfat dengan saturasi 80% sebanyak 103,2 gram untuk volume 250 ml ekstrak. Ekstrak kasar enzim diendapkan dengan ammonium sulfat. Artinya, ammonium sulfat ditambahkan secara perlahan ke dalam ekstrak mentah enzim tempe kedelai hitam sambil melakukan proses pengadukan pada suhu 4°C di atas *magnetic stirrer* hingga tercampur dengan baik [7]. Campuran enzim dan garam kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

2.6 Pengukuran tingkat kemurnian protein

Tingkat kemurnian enzim diukur dengan cara membagi nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan nilai absorbansi 280 nm. Pengukuran tingkat kemurnian protein ini dilakukan dengan cara sebanyak 50 µL supernatan ekstrak enzim tempe kedelai hitam, kemudian dilarutkan dengan 10 mL larutan buffer fosfat *p*H 7. Selanjutnya dibaca nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri-UV serta larutan buffer *p*H 7 digunakan sebagai blanko. Nilai absorbansi sampel yang dihasilkan kemudian dibandingkan pada panjang gelombang 260 dan 280 nm sehingga diperoleh rasio absorbansi 260/280 [8].

2.7 Analisis kadar protein

Pada penelitian ini menggunakan metode Lowry untuk mengukur jumlah protein enzim hasil dari purifikasi [9].

2.7.1 Pembuatan reagen Lowry.

Pada metode ini menggunakan pereaksi A dan pereaksi B, dimana pereaksi A dibuat dengan cara menimbang 2 gram Natrium Karbonat kemudian dilarutkan dengan 100 ml Natrium Hidroksida 0,1 N. Sedangkan pereaksi B dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 5 ml larutan $CuSO_4.H_2O$ 1% dan menambahkannya ke dalam 5 ml larutan Na (K) - Tartarat 1%.

2.7.2 Pembuatan larutan stok BSA (Bovine Serum Albumine).

Pengukuran kadar protein ini menggunakan standar *Bovine Serum Albumine* sebagai larutan kurva standar yang nantinya persamaan yang diperoleh dipakai untuk menentukan kadar protein dari absorbansi pada pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer [10]. Larutan stok *Bovine Serum Albumine* (BSA) dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml dengan menimbang 50 mg serbuk BSA kemudian dilarutkan dengan menggunakan aquadest sebanyak 50 ml, kemudian dilakukan pengenceran dengan seri konsentrasi 40; 80; 120; 160; dan 200 ppm.

2.7.3 Penentuan panjang gelombang maksimum.

Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjangnya gelombang yang dapat menghasilkan nilai absorbansi maksimal sampel sehingga mendapatkan nilai absorbansi yang akurat. Penentuan panjang gelombang maksimum ini dilakukan dengan cara mengambil larutan standar sebanyak 1,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan aquadest steril *ad* tanda batas. Kemudian dipipet kembali sebanyak 1 ml serta ditambahkan dengan 5 ml reagen *Lowry* C dan digojog sampai homogen, setelah itu ditambahkan dengan 0,5 ml reagen *Lowry* D.

Larutan blanko memiliki komposisi yang sama, namun ekstrak enzim tempe kedelai hitam diganti dengan menggunakan larutan buffer fosfat dan perlakuannya sama seperti sampel, yaitu dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-800 nm [9] [11].

2.7.4 Penentuan operating time (OT).

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran kestabilan senyawa yang diperoleh saat absorbansi. Sebanyak 1,5 ml larutan induk dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan aquadest steril *ad* tanda batas. Kemudian dipipet kembali sebanyak 1 ml serta ditambahkan dengan 5 ml reagen *Lowry* C dan digojog sampai homogen, setelah itu ditambahkan dengan 0,5 ml reagen *Lowry* D. Kemudian dibaca absorbansinya pada menit ke 0-45 menit dengan panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan [9] [11].

2.7.5 Pembuatan kurva baku BSA.

Siapkan sebanyak enam buah labu ukur 10 mL. Selanjutnya larutan stok dipipet sesuai dengan perhitungan seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10 mL, selanjutnya masing-masing larutan di dalam labu ukur ditambahkan dengan aquadest steril hingga tanda batas 10 mL. Kemudian satu labu ukur yang tersisa digunakan untuk larutan blanko yang berisi aquadest steril *ad* 10 mL. Setelah itu, masing-masing larutan di dalam labu ukur dipipet sebanyak 1 ml serta ditambahkan dengan 5 ml reagen *Lowry* C dan digojog sampai homogen, setelah itu ditambahkan dengan 0,5 ml reagen *Lowry* D. Kemudian dibaca absorbansinya pada menit ke-30 dengan panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan [9] [11].

2.7.6 Pengukuran kadar protein sampel.

Sebanyak 50 µL larutan enzim direaksikan dengan 5 ml reagen Lowry C yang dibuat dengan 2 ml reagen Lowry B yang ditambahkan 100 ml reagen Lowry A dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian ditambahkan dengan cepat 0,5 ml reagen Lowry D berupa reagen *follin-ciocalteau* yang diencerkan dengan aquadest (1:1) dan diaduk dengan sempurna. Campuran tersebut lalu diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

2.8 Pembuatan sampel uji

Ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam dibuat menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 12,5; 25; 50 dan 100%. Konsentrasi 12,5% dibuat dengan cara mengambil 1,25 ml ekstrak enzim tempe kedelai hitam dan dilarutkan dalam aquadest *ad* 10 ml. Konsentrasi 25% dibuat dengan cara mengambil 2,5 ml ekstrak enzim tempe kedelai hitam dan dilarutkan dalam aquadest *ad* 10 ml. Konsentrasi 50% dibuat dengan cara mengambil 5 ml ekstrak enzim tempe kedelai hitam dan dilarutkan dalam aquadest *ad* 10 ml. Konsentrasi 100% dibuat dengan cara pengambilan ekstrak yang murni tanpa dilakukan pengenceran. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali, sehingga setiap sampel uji harus dikalikan 3 untuk setiap perhitungannya.

Kontrol positif yang digunakan adalah nattokinase. Pembuatan suspensi nattokinase dilakukan dengan cara menyiapkan 100 mg serbuk dari sediaan kapsul nattokinase (setara dengan 2.000 FU nattokinase) yang dilakukan dengan cara membuka cangkang kapsul dan dilakukan penimbangan serbuk nattokinase sebanyak 100 mg dan dituangkan ke dalam labu ukur 10 ml. serbuk dilarutkan menggunakan aquadest sampai tanda batas labu takar 10 ml. Kemudian suspensi dihomogenkan sehingga diperoleh suspensi nattokinase sebanyak 10.000 µg/ml (10 mg/ml). Sedangkan kontrol negatif yang digunakan yaitu aquadest yang merupakan air hasil penyulingan dan tidak memiliki aktivitas melisiskan gumpalan darah [12].

2.9 Pengujian potensi fibrinolitik dengan metode clot lysis in vitro

Uji *clot lysis in vitro* dilakukan dengan cara memasukkan darah kelinci ke dalam 10 tabung eppendorf steril yang telah ditimbang masing-masing 500 µl kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit sampai terjadi koagulasi, lalu serum darah dibuang setelah terjadi gumpalan. Berat setiap bekuan darah yang ada pada tabung eppendorf kemudian ditimbang untuk memastikan berat bekuan darah dengan rumus berat bekuan darah = berat tabung eppendorf yang terdapat bekuan darah-berat tabung eppendorf kosong.

Sampel enzim kasar dengan konsentrasi 12,5; 25; 50 dan 100% yang diperoleh ditambahkan ke 4 tabung eppendorf dengan masing-masing tabung berisi 100 µl. Sampel dengan konsentrasi 12,5; 25; 50 dan 100% enzim yang diendapkan dengan ammonium

sulfat juga dimasukkan ke dalam 4 tabung eppendorf lainnya hingga sebanyak 100 µl tiap tabungnya. Untuk sisa dua eppendorf diisi dengan kontrol positif nattokinase dan kontrol negatif berupa air suling (aquadest). Kesepuluh tabung eppendorf diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit untuk diamati fusi gumpalannya [7].

Eppendorf yang mengandung leburan gumpalan darah ditimbang kembali untuk menentukan perbedaan berat setelah bekuan darah mengalami lisis. Perbedaan yang diperoleh dengan menimbang sebelum dan sesudah leburnya bekuan dinyatakan sebagai persentase lisis bekuan, persentase lisis dapat dihitung dengan rumus persamaan 1.

$$\text{Persentase lisis}(\%) = \frac{\text{berat lisis bekuan darah}}{\text{berat bekuan darah sebelum lisis}} \times 100\% \quad \text{(Persamaan 1)}$$

2.10 Analisis Data

Hasil dari penelitian kemudian dianalisis menggunakan cara pendekatan statistik *analysis of variance* (ANOVA) *one way*, data berbeda signifikan apabila nilai P < 0,05.

3 Hasil dan Pembahasan

Sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah tempe kedelai hitam yang diperoleh dari Grobogan, Provinsi Jawa Tengah. Tempe diambil secara acak pada bulan September 2022 dengan kriteria sudah di fermentasi selama 48 jam pada suhu 28-30° C, berbentuk padatan kompak, sudah berjamur, berwarna putih, memiliki aroma khas tempe dan tidak busuk. Dengan adanya jamur pada tempe dapat memproduksi beberapa enzim, salah satunya adalah enzim protease yang dapat menghidrolisis protein menjadi peptida yang lebih sederhana [6].

Tempe kedelai hitam yang digunakan yaitu sebanyak 200 gram. Tempe kedelai hitam diekstraksi untuk memperoleh filtrat yang mengandung enzim dengan cara diblender menggunakan 500 mL larutan buffer fosfat 0,05 M *p*H 7. Kemudian hasil blender disaring menggunakan flannel untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang dihasilkan setelah proses penyaringan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C untuk memisahkan protein enzim dari senyawa pengotor yang tidak diinginkan [10]. Proses ekstraksi ini menggunakan larutan buffer fosfat *p*H 7 karena buffer ekstraksi yang ideal untuk target protein biasanya diantara *p*H 7 – 8,5, hal ini bertujuan untuk menjaga kestabilan target protein atau menghindari aktivitas protein yang tidak diinginkan. Sedangkan proses sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan protein berdasarkan ukuran dan berat molekul [13]. Hasil dari proses sentrifugasi ini adalah endapan ekstrak dan supernatan yang dipisahkan. Pelet ekstrak dan supernatan yang dihasilkan dapat dimasukkan ke dalam lemari es apabila efektivitasnya tidak segera diuji, agar mencegah kerusakan enzim atau terjadinya denaturasi. Data hasil endapan (pelet ekstrak) dan supernatan yang diperoleh yaitu sebanyak 500 mL.

Pelet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi pertama ini adalah zat yang mengandung senyawa pengotor bukan enzim yaitu mengandung antosianin dan isoflavon (golongan flavonoid). Pelet atau endapan ini terletak di bagian bawah tabung sentrifuse yang memiliki berat jenis yang lebih besar jika dibandingkan dengan berat jenis enzim yang terkandung dalam tempe kedelai hitam. Hal ini disebabkan oleh densitas sel yang lebih besar dibandingkan dengan molekul protein, sehingga supernatan (*Crude enzym*) berada di bagian atas tabung. Senyawa pengotor yang bukan enzim tidak digunakan untuk tahap selanjutnya, karena dapat menurunkan aktivitas enzim.

Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi pertama ini merupakan ekstrak kasar (*crude enzym*) yang kemudian digunakan sebagai sampel pengujian obat fibrinolitik dari tempe kedelai hitam setelah proses pemurnian. Proses pemurnian ini dilakukan untuk mendapatkan enzim yang memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

Proses pemurnian ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam dilakukan dengan cara menambahkan garam ammonium sulfat dengan saturasi 80%. Penambahan ammonium sulfat dapat meningkatkan aktivitas enzim dengan cara mengendapkan protein dan mengurangi senyawa pengotor. Penggunaan konsentrasi ammonium sulfat antar enzim berbeda-beda.

Karena jumlah konsentrasi ammonium sulfat dapat mempengaruhi aktivitas dari enzim yang dihasilkan. Misalnya pada pemurnian enzim fibrinolitik, konsentrasi ammonium sulfat pada kisaran antara 25-80% [14]. Ammonium sulfat memiliki kelebihan seperti memiliki kelarutan tinggi dan memiliki daya sedimentasi yang baik. Penambahan garam ammonium sulfat dapat menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzimnya menjadi meningkat.

Pemurnian ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam ini menggunakan 500 mL supernatan hasil sentrifugasi yang kemudian ditambahkan dengan 206,4 gram ammonium sulfat di atas *magnetic stirrer.* Penambahan garam ammonium sulfat dengan cara dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam supernatan hingga terlarut dan homogen, setelah itu didiamkan di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam yang sudah didiamkan selama 24 jam kemudian di sentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Setelah disentrifugasi akan dihasilkan pelet dan supernatan. Pelet dan supernatan dipisahkan dan dilakukan penimbangan pada pelet ekstrak, sehingga diperoleh sebanyak 13,24 gram pelet ekstrak.

Gambar 1. Pelet ekstrak setelah dilakukan pemurnian

Penetapan tingkat kemurnian protein ekstrak kasar enzim setelah proses pemurnian dapat ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan rasio nilai serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ethica *et al* pada tahun 2014, penggunaan panjang gelombang 260 dan 280 nm dipilih karena DNA dan RNA dapat diserap dengan kuat pada panjang gelombang 260 nm dan sebagian besar protein dapat diserap kuat pada panjang gelombang 280 nm. Rasio nilai absorbansi dari panjang gelombang 260 dan 280 nm dapat memberikan validasi kemurnian dari sampel. Rasio absorbansi yang ideal A260/280 nm untuk protein umum adalah 0,6, sedangkan rasio tertinggi yang dapat mengindikasikan kontaminan dari protein yang diisolasi dengan DNA dan RNA adalah ≥1,8. Apabila mendekati nilai 1,8 atau lebih maka protein enzim akan banyak mengandung pengotor. Sedangkan semakin rendah dari 1,8 dan mendekati nilai 0,6 maka tingkat kemurnian enzim dari senyawa kontaminan semakin rendah [15].

Hasil pemurnian enzim mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim sebelum dilakukan pemurnian menggunakan ammonium sulfat, ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemurnian ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam

Sampel	Jumlah Sampel (µg)	Absorbansi 260 nm ± SD	Absorbansi 280 nm ± SD	Rasio rata-rata A260/280
Sebelum pemurnian	50	2,6433 ± 0,0123	1,8076 ± 0,0802	1,4643 ± 0,0679
Setelah pemurnian	50	1,1450 ± 0,0529	1,1910 ± 0,0135	0,9612 ± 0,0355

Nilai absorbansi yang dihasilkan tidak sama dikarenakan kandungan protein dalam setiap sampel berbeda. Hal tersebut dapat dilihat dari semakin menurunnya nilai rasio rata-rata absorbansi A260/280 nm. Sampel yang sudah dimurnikan menggunakan ammonium sulfat dengan kejenuhan 80% memiliki kemurnian yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan sampel yang belum dimurnikan dengan ammonium sulfat.

Penetapan kadar protein pada penelitian ini ditentukan dengan metode *Lowry,* karena metode ini lebih sensitif dibanding metode biuret sehingga hanya membutuhkan jumlah sampel yang sedikit. Prinsip dari metode *Lowry* didasarkan atas dua reaksi yang berbeda. Reaksi yang pertama adalah reaksi pentukan tembaga monovalen (Cu^{+}). Dalam keadaan basa terbentuk dari larutan Na_2CO_3 yang dilarutkan dalam NaOH, ion tembaga divalent (Cu^{2+})

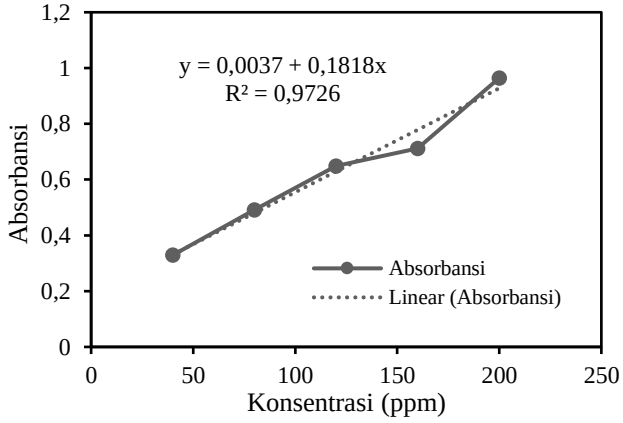
membentuk kompleks dengan ikatan peptida yang mereduksi Cu^{2+} menjadi tembaga monovalen (Cu^{2+}). Reaksi yang kedua adalah reaksi reduksi dari reagen *follin-ciocalteu*. Untuk menghasilkan suatu produk yang tidak stabil ion Cu^{+} dan gugus radikal dari tirosin dan triftopan bereaksi dengan reagen *follin-ciocalteu* dengan cara mereduksi molibdenum atau *tungsten blue*. Protein akan bereaksi dengan reagen *follin-ciocalteu* untuk membentuk senyawa berwarna biru. Setelah terbentuk warna biru pada sampel, selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Adapun hasil penelitian yang sudah dilakukan panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 762 nm dan hasil *operating time* (OT) pada menit ke 40-45. BSA (*Bovine Serum Albumine*) digunakan sebagai pembanding dalam penelitian ini.

Kurva baku standar dibuat dengan cara mengencerkan larutan standar konsentrasi 1000 ppm untuk menghasilkan 5 seri konsentrasi yaitu 40; 80; 120; 160; dan 200 ppm. Tujuan pembuatan larutan standar dari seri konsentrasi yang berbeda-beda adalah untuk menentukan kandungan protein dalam sampel menggunakan persamaan regresi nilai garis lurus dari grafik larutan standar yang diperoleh. Hasil absorbansi dari seri konsentrasi baku standar BSA dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kurva baku standar BSA (*Bovine Serum Albumine*)

Konsentrasi	Absorbansi
40	0,3291
80	0,4916
120	0,6489
160	0,7122
200	0,9646

Dari beberapa seri pengenceran konsentrasi kurva baku standar akan didapatkan nilai absorbansi yang selanjutnya akan digunakan untuk mencari persamaan regresi linier, dimana untuk mencari nilai x sebagai simbol yang berarti kadar protein dari ekstrak enzim tempe kedelai hitam. Persamaan regresi yang didapatkan pada penelitian ini adalah y = 0,0037 + 0,1818x.



Gambar 2 . Kurva kalibrasi konsentrasi absorbansi BSA

Pada gambar 2 menunjukkan slope positif dengan nilai gradient garis mendekati 1 yaitu (R= 0,9726) dengan regresi linier diperoleh nilai a = 0,0037 dan b = 0,1818x. Persamaan garis regresi linier dirumuskan y = bx + a sehingga diperoleh persamaan regresi kurva baku standar yaitu y = 0,0037 + 0,1818x.

Dari hasil persamaan regresi kurva baku standar pada gambar 2, selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar kandungan protein dari masing-masing sampel ekstraksi enzim tempe kedelai hitam sebelum dan setelah pemurnian.

Tabel 3. Kadar Protein sampel dengan metode Lowry

Sampel	Jumlah Sampel	Rata-rata Abs Serapan (y) ± SD	Bobot Protein (x Faktor Pengenceran) (µg)	Kadar protein (µg/mL)
Sebelum pemurnian	50 µg	0,2585 ± 0,0222	1,4015	140,15
Setelah pemurnian	50 µg	0,4505 ± 0,0237	2,4576	245,76

Dapat dilihat dari tabel 3 bahwa kandungan protein dari sampel sebelum dilakukan pemurnian dan setelah pemurnian dari ekstraksi enzim tempe kedelai hitam mengalami peningkatan kadar protein yang signifikan. Hal ini dikarenakan dengan penambahan ammonium sulfat menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzim semakin meningkat, sehingga kadar protein yang dihasilkan semakin tinggi.

Pengujian aktivitas ekstrak kasar enzim fibrinolitik dari tempe kedelai hitam ini menggunakan metode *clot lysis*. Pengujian dengan metode *clot lysis* bertujuan untuk membuktikan adanya aktivitas fibrinolitik pada sampel. Keuntungan dari metode ini adalah waktu pengerjaan tidak terlalu lama, sampel yang dibutuhkan dalam jumlah kecil dan dari segi biaya cukup terjangkau.

Mekanisme kerja dari enzim fibrinolitik adalah dengan menghidrolisis fibrin yang menyebabkan bekuan darah menjadi produk terlarut yang kemudian dapat dibuang dari peredaran darah, sehingga dapat membebaskan pembuluh darah dari bekuan darah dan memulai proses penyembuhan dinding pembuluh darah. Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan cara melisiskan bekuan darah pada tabung eppendorf dan dilakukan perhitungan persentase lisisnya. Sampel yang digunakan untuk pengujian *clot lysis* ini adalah pelet tanpa pemurnian dan pelet pemurnian dengan ammonium sulfat, yang kemudian dibandingkan persentase lisisnya untuk mengetahui aktivitas fibrinolitiknya.

Pengujian dengan metode *clot lysis* ini dilakukan dengan cara memasukkan darah kelinci ke dalam 10 tabung eppendorf steril yang telah ditimbang masing-masing 500 µl kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit sampai terjadi koagulasi, lalu serum darah dibuang setelah terjadi gumpalan. Berat setiap bekuan darah yang ada pada tabung eppendorf kemudian ditimbang untuk memastikan berat bekuan darah dengan rumus berat bekuan darah = berat tabung eppendorf yang terdapat bekuan darah-berat tabung eppendorf kosong.

Kemudian, setelah ditimbang masing-masing tabung eppendorf ditambahkan sampel enzim kasar dengan konsentrasi 12,5; 25; 50 dan 100% yang diperoleh ditambahkan ke 4 tabung eppendorf dengan masing-masing tabung berisi 100 µl. Sampel dengan konsentrasi 12,5; 25; 50 dan 100% enzim yang diendapkan dengan ammonium sulfat juga dimasukkan ke dalam 4 tabung eppendorf lainnya hingga sebanyak 100 µl tiap tabungnya. Untuk sisa dua eppendorf diisi dengan kontrol positif nattokinase dan kontrol negatif berupa air suling (aquadest). Kesepuluh tabung eppendorf diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit untuk diamati fusi gumpalannya. Setelah diinkubasi tabung eppendorf masing-masing ditimbang kembali untuk mengetahui berat bekuan darah yang lisis.

Potensi aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam ditunjukkan pada tabel 4.

Tabel 4. Potensi aktivitas fibrinolitik ekstrak kasar tempe kedelai hitam

Sampel (%)	Replikasi 1 (%)	Replikasi 2 (%)	Replikasi 3 (%)	Rata-rata Replikasi (%)
Nattokinase	83	85	86	85
Aquadest	6	8	9	8
S_1 12,5	14	16	19	16
S_1 25	22	23	25	23
S_1 50	27	28	31	29
S_1 100	33	35	36	35
S_2 12,5	38	39	42	40
S_2 25	44	45	48	46
S_2 50	51	53	54	53
$S_2$100	57	58	62	59

Keterangan :
S1 = Sampel 1 merupakan sampel sebelum dilakukan pemurnian
S2 = Sampel 2 merupakan sampel setelah dilakukan pemurnian

Nattokinase dipilih sebagai kontrol positif karena nattokinase merupakan salah satu enzim fibrinolitik yang berasal dari kedelai hasil fermentasi bakteri *Bacillus subtilis*. Nattokinase bekerja dengan cara memecah gumpalan darah secara langsung, yaitu dengan menghidrolisis fibrin dan substrat plasmin. Proses pemecahan gumpalan darah oleh enzim nattokinase yaitu dengan mengubah endogen pro-urokinase menjadi urokinase (uPA), menurunkan PAI-1 (inhibitor activator plasminogen-1) dan meningkatkan activator jaringan plasminogen (t-PA) yang mendukung aktivitas fibrinolitik [16].

Dari tabel 4 dapat dilihat bahwa sampel ekstrak tempe kedelai hitam yang sebelum dilakukan pemurnian maupun setelah pemurnian dapat menghasilkan aktivitas fibrinolitik. Aktivitas fibrinolitik dari persentase lisis paling tinggi adalah kontrol positif dari *nattokinase* yaitu sebesar 85%, hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Wang *et al*., (2017) yang menyatakan bahwa *nattokinase* merupakan protease serin yang dimurnikan dan telah terbukti dapat melisiskan bekuan darah. Sedangkan untuk kontrol negatif menunjukkan persentase lisis paling rendah

yaitu 8%, karena pada dasarnya aquadest merupakan larutan netral yang tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Namun, pada penelitian ini aquadest dapat menghasilkan nilai persentase lisis mungkin disebabkan oleh pada saat proses penambahan sampel ke dalam eppendorf, bekuan darah bagian atas ikut terlarut, sehingga gumpalan darah menjadi berkurang dan menyebabkan terjadinya lisis.

Pada pengujian variasi konsentrasi ekstrak kasar enzim sebelum dimurnikan dengan masing-masing konsentrasi 12,5 25, 50 dan 100% menghasilkan persentase lisis sebesar 16, 23, 29 dan 35%. Sedangkan untuk sampel ekstrak kasar enzim yang sudah dimurnikan menggunakan ammonium sulfat 80% menghasilkan persentase lisis sebesar 40, 46, 53 dan 59%. Ekstrak kasar enzim dari tempe kedelai hitam sebelum dilakukan pemurnian merupakan aktivitas fibrinolitik terendah jika dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang sudah dilakukan pemurnian dengan ammonium sulfat. Hal ini dapat dilihat dari hasil persentase lisis gumpalan darah dari variasi konsentrasi 100% sampel ekstrak yang sudah dimurnikan memiliki persentase lisis tertinggi dari sampel sebelum dilakukan pemurnian yaitu sebesar 59%. Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi dan semakin tinggi kemurnian enzim, maka akan semakin tinggi pula aktivitas fibrinolitik yang dihasilkan. Persentase lisis dari variasi konsentrasi sampel 100% setelah dilakukan pemurnian tidak sebanding dengan kontrol positif dari nattokinase, hal ini disebabkan karena perbedaan dari bakteri dan jamur yang digunakan dalam proses fermentasi, dimana bakteri *Bacillus subtilis* merupakan bakteri yang digunakan untuk fermentasi nattokinase sedangkan jamur *Rhyzopus oligosporus* (ragi tempe) merupakan jamur yang digunakan untuk fermentasi dari tempe kedelai hitam.

Pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Abdul Rauf *et al* (2010) menyatakan bahwa *Rhizopus oligosporus* memproduksi enzim protease asam, sedangkan produksi proteolitik dari kedelai hitam masih belum diketahui. Tempe dengan media kedelai hitam merupakan tempe yang dapat menghasilkan aktivitas proteolitik lebih besar jika dibandingkan dengan sampel lainnya dinyatakan dengan hasil uji metode cakram fibrin (*fibrin plate*) terdapat zona jernih disekitar pencadang dengan indeks fibrinolitik hasil fermentasi kedelai hitam dengan jamur *Rhizopus oligosporus* jauh lebih besar yaitu 1,73 dan 1,97 kali dibandingkan dengan kedelai hitam tanpa proses fermentasi [10].

Data yang diperoleh dari pengujian aktivitas fibrinolitik kemudian dilakukan analisis data menggunakan *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) dengan metode *Shapiro-wilk* untuk mengetahui apakah data sudah terdistribusi normal. Pada pengujian ini didapatkan nilai signifikansi > 0,05 yang berarti data telah terdistribusi normal. Maka dapat dilanjutkan dengan analisis homogenitas dan didapatkan nilai signifikansi > 0,05 yang artinya data terdistribusi normal dan homogen. Setelah data terdistribusi normal dan homogen, kemudian dapat dilanjutkan ke analisa data dengan metode *One Way ANOVA* untuk melihat perbedaan bermakna pada kelompok sampel variasi konsentrasi ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam. Hasil analisis *One Way ANOVA* yang didapatkan adalah nilai signifikansi sebesar 0,00 (< 0,05) yang berarti terdapat perbedaan bermakna satu sama lain dari variasi konsentrasi ekstrak enzim tempe kedelai hitam terhadap persentase lisis yang dihasilkan. Untuk mengetahui kelompok mana yang memberikan perbedaan bermakna , pengujian dilanjutkan dengan *Post Hoc Tuckey.* Dari hasil analisis data tersebut dapat diketahui seluruh kelompok sampel memiliki aktivitas fibrinolitik yang berbeda. Namun pada kelompok subset variasi konsentrasi 25 dan 50% sampel sebelum dimurnikan terletak dalam satu subset yang sama, selain itu pada variasi konsentrasi 100% sebelum dimurnikan dan variasi konsentrasi 12,5% setelah dilakukan pemurnian terletak di dalam satu subset yang sama juga. Hal ini dapat disimpulkan bahwa kelompok sampel yang terdapat dalam satu subset, tidak memiliki perbedaan bermakna yang artinya memiliki potensi aktivitas fibrinolitik yang sama. Untuk menentukan konsentrasi optimum, maka dapat ditentukan dari dosis terbesar yang memiliki efek fibrinolitik yaitu pada konsentrasi 100% sampel setelah dilakukan pemurnian.

4 Kesimpulan

Kadar protein dari ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam yang ditentukan menggunakan metode *Lowry* berturut-turut adalah 140,15 µg/mL untuk ekstrak kasar enzim sebelum dilakukan pemurnian dan 245,76 µg/mL untuk ekstrak kasar enzim yang sudah dimurnikan menggunakan ammonium sulfat. Pengaruh penambahan ammonium sulfat 80% menyebabkan protein mengendap dan aktivitas enzim semakin meningkat, sehingga kadar protein ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam yang dihasilkan semakin tinggi. Konsentrasi optimum dari variasi konsentrasi 12,5 ; 25 ; 50 ; dan 100% ekstrak kasar enzim tempe kedelai hitam (*Glycine soja* (L) Merr) yang memiliki aktivitas sebagai obat fibrinolitik secara *in vitro* adalah konsentrasi 100% dengan persentase lisis sebesar 59%.

5 Pernyataan

5.1 Penyandang Dana

Penelitian ini tidak mendapatkan dukungan dana dari sumber manapun.

5.2 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

6 Daftar Pustaka

[1] Lestari Endang Sri, S Dian L,S Setiawan Henry. 2014. Faktor Risiko Penyakit Kardiovaskuler. Jurnal Kesehatan Masyarakat 2 (1).

[2] Setiabudy, R. D. 2009. *Hemostasis dan Trombosis*. Cetakan keempat. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

[3] Kotb, E., 2012. *Fibrinolytic Bacterial Enzyme with Trombolytic Activity*. Springer Heidelberg Dordrech

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

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

[6] Radiati, Ani. 2016. Analisis Sifat Fisik, Sifat Organoleptik, dan Kandungan Gizi pada Produk Tempe dari Kacang Non-Kedelai. Indonesian Food Technologies: Tasikmalaya

[7] Michail, M., Vasiliadou, M., Zotos, A., 2005. Partial Purification and Comparison of Precipitation Techniques of Proteolytic Enzymes from Trout (Salmo gairdnerii) Heads. Elsevier, Food Chemistry 97 (2006) 50-55

[8] Yowani, S. C., dan Wirajana, I. N. 2014. Identifikasi Mutasi Gen rpoB Isolat MDR *Mycobacterium tuberculosis* di Bali dengan Metode Nested PCR. *Jurnal Farmasi Indonesia* 7 (2): 121-127.

[9] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, dan R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.

[10] Poernomo Achmad Toto, Isnaeni, Purwanto. 2015. Aktivitas In Vitro Enzim Fibrinolitik Ekstrak Tempe Hasil Fermentasi Rhizopus Oligosporus ATCC 6010 Pada Substrat Kedelai Hitam. Berkala Ilmiah Kimia Farmasi 4(2).

[11] Widiastuti dan F. Aini. 2008. Penetapan Kada Besi (Fe) pada Bayam Hijau, Bayam Raja, dan Bayam Duri di Pasar Mojosongo. *Caraka Tani* 23(1): 25-29.

[12] Zaman, R., Parvez, M., Jakaria, M., Sayeed, M. A., dan Islam, M. 2015. *In Vitro* Clot Lysis Activity of Different Extracts of Mangifera sylvaticaroxb. Leaves. Research Journal of Medicinal Plant, 9(3): 135-140

[13] Nia Yuliani D. 2013. Penetapan Kadar Dan Analisis Profil Protein Dan Asam Amino Ekstrak Ampas Biji Jinten Hitam (*Nigella sativa* Linn.) Dengan Metode SDS-PAGE Dan KCKT. Skripsi. UIN Syarif Hidyatullah. Jakarta.

[14] Palanivel, P., L. ashaokkumar, *and* R. Balagurunathan. 2013. Production, Purification and Fibrinolytic Characteerization of Alkaline Protease from Extremophilic Soil Fungi. International Journal of Pharma and Bio Sciences 4 (2): 101-110.

[15] Ethica, S. N., 2014. *Ctideteon Of Genes Involved In Glycerol Metabolysm Of Alcaligenes sp*. JG3.

[16] Rika A. P, N. Dea Hendryanti, Kristina V.A. 2020. Aktivitas Fibrinolitik Pada Makanan Fermentasi Berbasis Kacang (*Bean*) Di Kawasan Asia Sebagai Pangan Fungsional Anti-Atherotrombosis. Laporan Penelitian. Universitas Katolik Soegijapranata. Semarang.