

UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK ENZIM TEMPE GEMBUS DENGAN METODE CLOT LYSIS SECARA IN VITRO

FIBRINOLYTIC ACTIVITY TEST OF TEMPE GEMBUS ENZYME EXTRACT USING THE CLOT LYSIS METHOD IN VITRO

Aliffia Jeny Suci Anggraini^{1*}, Ana Indrayati¹, Endang Sri Rejeki¹

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi

*Korespondensi: aliffiasuci25@gmail.com

ABSTRAK

Aktivitas fibrinolitik merupakan proses pemecahan fibrin yang berperan penting dalam mencegah dan mengatasi pembentukan bekuan darah berlebih. Tempe gembus adalah hasil fermentasi dari sisa pembuatan tahu oleh mikroorganisme *Rhizopus sp.*, diketahui masih mengandung protein yang berpotensi sebagai agen fibrinolitik alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar protein ekstrak enzim tempe gembus, menguji potensi aktivitas fibrinolitik, serta menentukan konsentrasi optimum dalam melisis bekuan darah secara in vitro menggunakan metode *clot lysis*.

Pengambilan sampel dilakukan secara acak, kemudian dilakukan identifikasi gen pada tempe gembus dengan NCBI dan ClustalW. Tempe gembus yang didapat kemudian diekstraksi menggunakan buffer fosfat, dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan ammonium sulfat 80%. Hasil ekstraksi digunakan untuk pengukuran kadar protein dengan metode Lowry. Pengujian aktivitas fibrinolitik dengan variasi konsentrasi 15%, 25%, 50%, dan 100% pada sampel dilakukan sebelum dan sesudah pemurnian. Nattokinase digunakan sebagai kontrol positif dan buffer fosfat sebagai kontrol negatif. Pengamatan lisis dengan metode *clot lysis*. Selanjutnya hasil *clot lysis* dianalisis menggunakan ANOVA pada aplikasi SPSS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar protein dalam ekstrak enzim tempe gembus menggunakan metode Lowry pada sampel sebelum pemurnian diperoleh 40,02 µg/mL dan setelah pemurnian diperoleh 104,27 µg/mL. Persentase lisis bekuan darah yang optimum pada konsentrasi 100% dari sampel, dan setelah pemurnian sebesar 57%, yang berpotensi sebagai obat fibrinolitik secara *in vitro*.

Kata kunci: Fibrinolitik, tempe gembus, Lowry, clot lysis, senyawa bioaktif

ABSTRACT

Fibrinolytic activity is the process of breaking down fibrin, which plays a crucial role in preventing and treating excessive blood clot formation. Tempeh gembus, a fermented byproduct of tofu production by the microorganism *Rhizopus sp.*, is known to contain proteins with potential as natural fibrinolytic agents. This study aimed to determine the protein content of tempeh gembus enzyme extract, test its potential fibrinolytic activity, and determine the optimum concentration for in vitro clot lysis using the clot lysis method.

Sampling was carried out randomly, then gene identification was carried out in tempeh gembus with NCBI and ClustalW. The tempeh gembus obtained is then extracted using phosphate buffer, followed by purification using 80% ammonium sulfate. The extraction results were used for the measurement of protein levels using the Lowry method. Fibrinolytic activity testing with concentration variations of 15%, 25%, 50%, and 100% in samples was performed before and after purification. Nattokinase is used as a positive control and a phosphate buffer as a negative control. Observation of lysis by the clot lysis method. Furthermore, the results of clot lysis were analyzed using ANOVA in the SPSS application.

The results showed that the protein content in the tempeh gembus enzyme extract using the Lowry method in the sample before purification was obtained 40.02 µg/mL and after purification was obtained 104.27 µg/mL. The optimal percentage of blood clot lysis at a concentration of 100% of the sample, and after purification is 57%, which has the potential to be a fibrinolytic drug in vitro.

Keywords: Fibrinolytic, tempeh gembus, Lowry, clot lysis, bioactive compounds

PENDAHULUAN

Pengobatan penyakit akibat pembekuan darah saat ini berfokus pada pemanfaatan aktivitas fibrinolitik dari tanaman, hewan atau makanan. Aktivitas fibrinolitik merupakan proses pemecahan fibrin yang penting dalam mencegah dan mengatasi pembentukan bekuan darah berlebihan. Aktivitas ini umumnya terdapat pada

enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme dalam makanan fermentasi, yang diharapkan dapat membantu mencegah penyakit kardiovaskular. Menurut Peng *et al.*, (2005), agen fibrinolitik memiliki biaya produksi yang efektif dan efek samping rendah dibandingkan dengan agen trombolitik. Agen trombolitik mempunyai keterbatasan, diantaranya harga relatif mahal, waktu paruh pendek, reaksi di dalam tubuh relatif lama, dan hanya dapat diberikan melalui injeksi. Pemberian agen trombolitik secara oral dapat menimbulkan efek samping seperti pendarahan pada usus.

Tempe gembus adalah makanan fermentasi asal Indonesia. Tempe gembus dibuat dari sisa bahan pembuatan tahu melalui proses fermentasi. Mikroorganisme yang digunakan sama dengan proses pembuatan tempe kedelai yaitu *Rhizopus sp.* Komposisi gizi pada tempe gembus hampir sama dengan tempe kedelai, namun kandungan nutrisinya lebih rendah. Selain sebagai sumber makanan, tempe gembus juga dimanfaatkan untuk menjaga kesehatan jantung, tulang dan membantu menurunkan berat badan (Sine dan Soetarto, 2018).

Menurut penelitian yang dilakukan Inayatul *et al* (2018) menemukan bahwa tempe gembus dapat mendegradasi fibrin. Penelitian ini menunjukkan bahwa enzim yang dihasilkan selama fermentasi tempe gembus mungkin berperan dalam proses fibrinolitik. Tempe gembus mengandung senyawa bioaktif yang berperan sebagai agen fibrinolitik alami, termasuk enzim protease yang memecah fibrin tanpa efek samping yang serius. Berbeda dengan obat fibrinolitik sintetik seperti tPA (*tissue plasminogen activator*) yang dapat menimbulkan efek samping serius, seperti pendarahan berlebihan.

Identifikasi gen merupakan tahap penting untuk mengetahui fungsi dan hubungan evolusioner suatu sekuens DNA atau protein. Salah satu alat yang banyak digunakan adalah NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), yang memungkinkan pencarian homolog dengan membandingkan sekuens query terhadap basis data publik, menghasilkan informasi kesamaan, e-value, dan fungsi prediksi gen (Altschul *et al.*, 1990). Untuk analisis lebih lanjut, sekuens homolog dapat disejajarkan menggunakan ClustalW, sebuah program *multiple sequence alignment* yang efektif dalam mendeteksi konservasi residu, motif fungsional, serta hubungan evolusi antar gen (Thompson *et al.*, 1994). Integrasi kedua metode ini memudahkan identifikasi gen baru sekaligus memahami konteks evolusioner dan fungsionalnya. Pemurnian enzim adalah proses pemisahan enzim dari campuran kompleks yang dihasilkan selama ekstraksi sel, sehingga diperoleh bentuk enzim yang lebih murni dan aktif. Pemurnian ekstrak dengan penambahan ammonium sulfat meningkatkan kekuatan ionik yang mendorong terjadinya interaksi antara ion garam, molekul air, dan enzim (Iswendi, 2010).

Pengujian potensi fibrinolitik dari suatu bahan atau senyawa, dapat menggunakan beberapa metode seperti fibrin plate dan *clot lysis*. *Clot lysis* merupakan proses dimana bekuan darah (*clot*) dipecah oleh enzim fibrinolitik, yang berfungsi untuk mengembalikan aliran darah normal setelah terjadinya pembekuan. Proses ini sangat penting dalam pengobatan kondisi medis yang berkaitan dengan trombosis, seperti infark miokard (serangan jantung) dan stroke iskemik (Larsen dan Hvas, 2020). Metode ini mengukur kemampuan senyawa dalam mengubah atau menghancurkan gumpalan darah yang terbentuk dalam kondisi laboratorium. Dalam uji ini, gumpalan fibrin yang terbentuk akan dimonitor untuk mengetahui apakah ada perubahan atau pengurangan ukuran gumpalan yang menandakan bahwa proses fibrinolisis telah terjadi. Penggunaan metode *clot lysis* memungkinkan peneliti untuk menguji potensi fibrinolitik dari tempe gembus atau ekstrak enzim lainnya (Zaman *et al.*, 2015). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar protein ekstrak enzim tempe gembus sebelum dan setelah pemurnian, untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik pada ekstrak enzim tempe gembus dan untuk mengetahui konsentrasi optimum ekstrak enzim tempe gembus yang memiliki aktivitas fibrinolitik secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, pipet volume, gelas ukur, inkubator, corong kaca, gelas beaker, mikropipet yang digunakan untuk pengambilan sampel dengan skala mikroliter, tabung reaksi, pipet tetes, alat sentrifugasi untuk memisahkan campuran padat dan cair, *magnetic stirrer* sebagai alat pengaduk, blender, kain flanel, spektrofotometer, pH meter, serta tabung Eppendorf.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi sampel dan bahan analisa. Sampel yang digunakan adalah tempe gembus dari Gemolong, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Sementara itu, bahan analisa yang digunakan terdiri dari Buffer fosfat 0,05M, Bovine Serum Albumin (BSA) untuk larutan standar, garam ammonium sulfat, darah kelinci, buffer fosfat sebagai kontrol negatif dan Nattokinase sebagai kontrol positif.

Identifikasi Gen

Identifikasi gen dilakukan dengan menggunakan data base dari Gene Bank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan analisis BLAST. Analisis BLAST didapatkan dari kumpulan data dalam bentuk FASTA, FASTA tersebut dapat digunakan untuk analisis penyelarasan ganda menggunakan ClustalW dimana lima data dari FASTA dapat dianalisis sekaligus.

Pembuatan Buffer Fosfat

Pembuatan buffer fosfat dilakukan dengan cara menimbang NaH_2PO_4 sebanyak 1,4990 gram dan Na_2HPO_4 sebanyak 1,7972 gram kemudian masing-masing serbuk dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Dilakukan pengukuran pH, untuk mendapatkan larutan buffer fosfat sebanyak 500 ml dengan pH 7 maka 250 ml larutan A ditambahkan larutan B hingga diperoleh pH 7. Jika pH telah mencapai 7, maka di tambahkan dengan menggunakan aquadest ad 1000 ml.

Ekstraksi Ezim

Ekstraksi dimaksudkan untuk mengeluarkan ekstrak enzim dari sel dan jaringan tempe gembus. Ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 1:2, dimana tempe gembus sebanyak 200 gram dipotong-potong hingga ukurannya menjadi kecil, kemudian ditambahkan larutan buffer fosfat sebanyak 500 mL sebagai pelarut, campuran dihaluskan dengan blender hingga tercampur merata. Campuran disaring dengan kain flanel untuk menghilangkan residu. Ekstrak enzim supernatan ini diperoleh setelah proses sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 5.000 rpm dengan suhu 4°C selama 30 menit (Michail *et al.*, 2006).

Pemurnian Ekstrak Enzim

Pemurnian ekstrak enzim tempe gembus dilakukan menggunakan metode *salting out* dengan penambahan ammonium sulfat. Sebanyak 135,25 gram ammonium sulfat 80% ditambahkan ke dalam 250 ml volume ekstrak enzim. Penambahan ammonium sulfat dilakukan secara perlahan ke dalam ekstrak enzim tempe gembus sambil terus diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C hingga tercampur merata (Michail *et al.*, 2006). Selanjutnya, campuran enzim dan ammonium sulfat dipisahkan melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

Pengukuran Tingkat Kemurnian

Tingkat kemurnian enzim dinilai dengan mengukur perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Untuk menentukan kemurnian protein, 50 μL supernatan dari ekstrak enzim tempe gembus dicampur dengan 10 mL larutan buffer fosfat pH 7. Selanjutnya, campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV, dengan buffer pH 7 sebagai blanko. Rasio absorbansi antara panjang gelombang 260 nm dan 280 nm kemudian dijadikan sebagai parameter untuk menilai kemurnian protein (Yowani dan Wirajana, 2014).

Penetapan kadar protein

Pada penelitian ini menggunakan metode Lowry untuk mengukur jumlah protein enzim hasil dari purifikasi (Lowry *et al.*, 1951).

Pembuatan larutan stok BSA

BSA digunakan sebagai standar untuk membuat kurva kalibrasi yang nantinya digunakan untuk menentukan kadar protein berdasarkan nilai absorbansi saat pengukuran menggunakan spektrofotometer (Poernomo *et al.*, 2014). Larutan stok BSA dibuat dengan konsentrasi 980 ppm dengan cara menimbang 49 mg serbuk BSA yang kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquadest.

Pembuatan Reagen Lowry

Reagen Lowry A dibuat dengan 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dengan 100 ml 0,1N NaOH. Lowry B dibuat dari $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% 5 ml dan larutan Na (K)-Tartat 2% 5 ml. Reagen Lowry C berisi campuran larutan reagen Lowry A 50 ml dan 1 ml larutan reagen Lowry B. Reagen Lowry D dibuat dari reagen Folin ciocalteau dan aquadest dengan perbandingan 1:1.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pengukuran panjang gelombang maksimum untuk *bovine serum albumin* (BSA) dilakukan menggunakan metode Lowry. Sebanyak 1,5 mL larutan stok BSA dimasukkan ke dalam tabung reaksi berukuran 10 mL kemudian diencerkan menggunakan aquadest. Setelah itu, 1 mL larutan hasil pengenceran diambil dan dicampur dengan 5 mL pereaksi Lowry C, lalu diaduk merata selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mL pereaksi Lowry D, kemudian campuran dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi dari kompleks yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan rentang panjang gelombang antara 500 hingga 750 nm, dengan pengukuran dilakukan setiap 20 nm.

Penentuan Operating Time

Penentuan waktu operasi (*operating time*) bertujuan untuk mengetahui durasi pengukuran saat absorbansi senyawa mencapai kestabilan maksimal. Prosedur penentuan ini dimulai dengan memasukkan 1,5 mL larutan

induk BSA ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambah dengan aquadest steril hingga mencapai tanda batas. Selanjutnya, sebanyak 1 mL larutan tersebut dipipet dan dicampur dengan 5 mL reagen Lowry C, kemudian diaduk hingga homogen. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry D. Pengukuran absorbansi dilakukan secara berkala mulai menit ke 0 hingga menit ke 60 pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya.

Kurva Baku BSA

Larutan stok dipipet sesuai dengan volume perhitungan seri pengencer yang dibuat, selanjutnya masing-masing larutan di dalam labu ukur ditambahkan dengan aquadest steril hingga tanda batas 10 mL. Kemudian satu labu ukur yang tersisa diisi dengan 10 mL aquadest steril sebagai larutan blanko. Selanjutnya, dari setiap labu ukur, diambil 1 mL larutan kemudian ditambahkan 5 mL reagen Lowry C dan diaduk hingga merata. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry D. Absorbansi diukur pada menit ke-50 dengan menggunakan panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan sebelumnya.

Pengukuran Kadar Protein Sampel

Sebanyak 1 mL ekstrak enzim sebelum dan setelah pemurnian dicampurkan dengan 5 mL reagen Lowry C dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar, kemudian secara cepat ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry A dan diaduk hingga merata. Selanjutnya, campuran ini diukur pada panjang gelombang maksimum 757nm.

Uji Fibrinolitik

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 15; 25; 50 dan 100% yang diperoleh ditambahkan ke 4 tabung eppendorf dengan masing-masing tabung berisi 100 µl. Sampel dengan konsentrasi 15; 25; 50 dan 100% enzim yang dimurnikan 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 buffer fosfat. Kesepuluh tabung eppendorf diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit untuk diamati fusi gumpalannya.

Pengambilan lisis darah dilakukan menggunakan mikropipet yang kemudian diletakan pada pada tabung eppendorf kosong. Tabung Eppendorf yang berisi hasil leburan gumpalan darah kemudian ditimbang kembali untuk mengukur perubahan berat setelah bekuan darah mengalami lisis. Selisih berat sebelum dan sesudah proses lisis tersebut dihitung dan dinyatakan dalam bentuk persentase lisis bekuan darah. Persentase lisis dapat dihitung dengan rumus berikut (Setyowati, 2015) :

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

Analisis Data

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi gen fibrinolitik pada tempe gembus menggunakan NCBI, bertujuan untuk memastikan adanya gen pengkode atau penyandi fibrinolitik. Tahapan ini dilakukan guna mengetahui kandungan enzim yang berpotensi sebagai obat fibrinolitik dari kedelai “Glycine max”. NCBI merupakan sebuah platform yang menyediakan basis data mengenai informasi kesehatan dan biologi molekuler.

Pada gambar 3, dapat dilihat bahwa kelima sekuens yang dianalisis menunjukkan tingkat kemiripan yang tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan banyaknya simbol "*" (asterisk) pada hasil *alignment*, yang menandakan kesamaan identik antar asam amino pada posisi yang sama. Simbol ":" dan "." juga muncul dalam jumlah signifikan, yang menunjukkan adanya kesamaan konservatif dan semi-konservatif, mengindikasikan bahwa residu asam amino tersebut memiliki sifat kimia yang serupa. Salah satu sekuens yang menjadi fokus utama adalah XP_006588518.1, yang berasal dari spesies *Glycine max* (kedelai), yang digunakan sebagai bahan dasar tempe gembus. Kesamaan sekuens antara *Glycine max* dengan protein dari entri lainnya, termasuk sekuens yang diketahui memiliki aktivitas fibrinolitik, memberikan indikasi kuat bahwa protein dari kedelai juga memiliki potensi fungsi yang serupa. Kemiripan struktur dan susunan asam amino sering kali berkorelasi dengan kemiripan fungsi biologis, termasuk aktivitas sebagai enzim protease atau fibrinolitik.

Ekstraksi enzim dari tempe gembus dilakukan dengan menggunakan pelarut buffer fosfat yang akan dihaluskan dan kemudian akan disaring. Hasil saringan akan diproses sentrifugasi untuk memisahkan fraksi supernatan (cairan atas) dari endapan atau pelet.

Tabel. 1 Hasil Ekstraksi

Sampel (g)	Pelarut (mL)	Hasil supernatan (mL)	Hasil Pelet (g)
200	500	490	9,8

Pada tabel 1, hasil ekstraksi diperoleh 490 mL supernatan dari 500 mL pelarut, menunjukkan sebagian besar pelarut masih dapat diselamatkan sebagai fraksi enzimatik. Hal ini menandakan bahwa metode ekstraksi yang digunakan cukup efisien. Sementara itu, pelet yang terbentuk relatif kecil (9,8 g) dibandingkan massa awal sampel (200 g), menunjukkan bahwa sebagian besar biomassa tempe gembus berhasil disaring pada tahap awal. Dengan demikian, supernatan dari hasil ekstraksi ini menjadi bahan utama yang digunakan dalam tahap selanjutnya, yakni uji aktivitas fibrinolitik dan proses pemurnian enzim.

Hasil yang didapatkan dari proses ekstraksi dilanjutkan proses pemurnian, dengan penambahan ammonium sulfat 80%. Tujuan dari tahap ini untuk memperoleh enzim dalam bentuk yang lebih murni dan memiliki aktivitas yang lebih tinggi. Hasil pemurnian dari 250 mL ekstrak enzim tempe gembus yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pemurnian

Sampel (mL)	Hasil supernatan (mL)	Hasil Pelet (g)
250	247	5,2

Hasil proses pemurnian ekstrak enzim dari tempe gembus dengan metode fraksinasi menggunakan ammonium sulfat sebanyak 247 mL. Pemurnian dilakukan dengan pencampuran secara bertahap ammonium sulfat 135,24 gram hingga mencapai tingkat kejenuhan sebesar 80%. Selanjutnya, campuran disentrifugasi pada kecepatan 500 rpm selama 30 menit untuk memisahkan fraksi cair (supernatan) dan fraksi padat (pelet). Sehingga berdasarkan hasil yang ditampilkan pada tabel 2, dari 250 mL sampel awal diperoleh 247 mL supernatan dan 5,2 gram pelet.

Tingkat kemurnian protein dari ekstrak enzim yang telah dimurnikan dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, dengan membandingkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ethica *et al* (2018), panjang gelombang 260 nm digunakan karena merupakan panjang gelombang maksimum untuk penyerapan DNA dan RNA, sedangkan protein menunjukkan penyerapan maksimum pada panjang gelombang 280 nm. Perbandingan rasio absorbansi A260/A280 digunakan sebagai indikator kemurnian sampel.

Penetapan kadar protein dalam penelitian ini menggunakan metode Lowry karena memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan metode Biuret, sehingga hanya memerlukan volume sampel yang relatif kecil. Prinsip metode ini melibatkan dua reaksi utama, yaitu pembentukan kompleks tembaga monovalen (Cu^+) dalam kondisi basa, dan reaksi reduksi oleh reagen Folin–Ciocalteu. Pada reaksi pertama, ion Cu^{2+} dari larutan tembaga sulfat berikatan dengan gugus peptida protein dalam suasana basa (Na_2CO_3 dalam NaOH), kemudian direduksi menjadi Cu^+ . Hasil optimasi menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum berada pada 757 nm dengan waktu baca optimal (*operating time*) pada menit ke50-60 setelah penambahan reagen.

Tabel 3. Hasil penetapan kemurnian

Samnel	Jumlah sampel (μL)	Absorbansi 260 (nm ± SD)	Absorbansi 280 (nm ± SD)	Rasio A260/280
Sebelum pemurnian	50	0,391 ± 0,0065	0,270 ± 0,0297	1,4481
Setelah pemurnian	50	0,432 ± 0,0088	0,405 ± 0,0115	1,0667

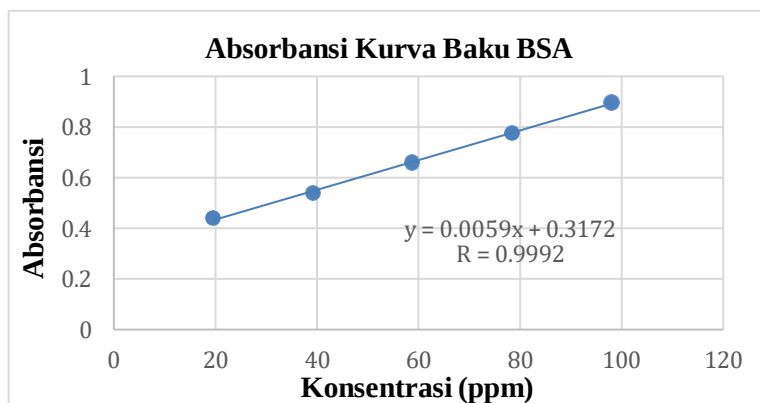
Pada tabel 3, perbedaan nilai absorbansi sebelum dan sesudah pemurnian tercermin dari rasio A260/280. Sampel sebelum pemurnian memiliki rasio 1,4481, mengindikasikan adanya kontaminasi asam nukleat. Setelah pemurnian dengan amonium sulfat 80%, rasio menurun menjadi 1,0667, menunjukkan adanya peningkatan kemurnian protein. Menurut Ethica *et al.*, (2018), rasio ideal protein murni mendekati 0,6, sedangkan rasio $\geq 1,8$ menunjukkan kontaminasi tinggi. Penurunan rasio A260/280 menunjukkan bahwa metode *salting out* efektif dalam mengurangi kontaminan non-protein pada protein dari tempe gembus.

Kurva baku standar dibuat dengan cara mengencerkan larutan standar BSA dengan konsentrasi 980 ppm untuk menghasilkan 5 seri konsentrasi yaitu 19,6; 39,2; 58,8; 78,4; dan 98 ppm. Pembuatan seri konsentrasi yang berbeda-beda memiliki tujuan untuk menentukan kadar protein dalam sampel dengan persamaan regresi linier atau garis lurus dari grafik yang diperoleh. Hasil absorbansi dari 5 seri konsentrasi dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Kurva baku standar BSA

Konsentrasi	Absorbansi
19,6	0.441
39,2	0.538
58,8	0.659
78,4	0.776
98	0.897

Dari beberapa seri pengenceran konsentrasi kurva baku standar akan didapatkan nilai absorbansi yang selanjutnya digunakan untuk mencari persamaan regresi linier, dimana untuk mencari kadar protein (x) dari ekstrak enzim tempe kedelai hitam. Persamaan regresi yang didapatkan pada penelitian ini adalah $y = 0,3172 + 0,0059x$.

**Gambar 5.** Kurva baku absorbansi BSA

Pada gambar 5, persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva baku BSA yaitu $y = 0,3172 + 0,0059x$ dengan nilai koefisien determinasi (R) sebesar 0,9992 menunjukkan bahwa terdapat hubungan linier yang sangat kuat antara konsentrasi standar BSA dengan nilai absorbansi yang diukur. Nilai R yang mendekati 1 menandakan hampir seluruh variasi absorbansi dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi BSA, sehingga persamaan regresi ini valid digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi protein dalam sampel.

Adanya nilai *intercept* (a) sebesar 0,3172 menunjukkan bahwa pada konsentrasi BSA mendekati nol masih terdapat nilai absorbansi awal. Sementara itu, *slope* (b) sebesar 0,0059 menunjukkan sensitivitas respon absorbansi terhadap perubahan konsentrasi protein. Semakin besar nilai *slope*, semakin sensitif metode dalam mendeteksi perubahan konsentrasi protein. Dengan demikian, persamaan regresi ini digunakan untuk menentukan kadar protein dalam sampel ekstrak enzim tempe gembus, baik sebelum maupun setelah proses pemurnian. Hasil perhitungan dari persamaan tersebut mencerminkan efektivitas metode pemurnian dalam

meningkatkan kandungan protein atau memisahkan komponen non-protein dari sampel. Analisis ini penting karena kadar protein menjadi salah satu indikator utama keberhasilan proses isolasi dan pemurnian enzim.

Tabel 5. Kadar protein sampel dengan metode Lowry

Sampel	Jumlah sampel (μL)	Absorbansi	Kadar protein (μg/mL)	Rata-rata (μg/mL) ±SD
Sebelum pemurnian	50	0,530	40,15	40,02 ± 0,2193
		0,528	39,77	
		0,530	40,15	
Setelah pemurnian	50	0,870	104,30	104,27 ± 0,2312
		0,870	104,30	
		0,871	104,49	

Berdasarkan Tabel 5, kadar protein meningkat signifikan setelah proses pemurnian menggunakan ammonium sulfat 80%, dari 40,02 μg/mL ± 0,2193 menjadi 104,27 μg/mL ± 0,2312. Pemurnian berhasil mengonsentrasikan fraksi protein aktif melalui mekanisme *salting out*, yaitu pengendapan protein akibat penurunan kelarutan oleh garam. Selain meningkatkan konsentrasi, pemurnian juga membantu memisahkan protein dari senyawa pengotor, menghasilkan protein yang lebih murni dan aktif. Hasil ini mendukung potensi tempe gembus sebagai sumber protein bioaktif untuk pengembangan agen fibrinolitik alami.

Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak enzim tempe gembus menggunakan metode *clot lysis*. Metode ini dipilih untuk membuktikan adanya aktivitas fibrinolitik dalam ekstrak enzim. Metode *clot lysis* memiliki beberapa keunggulan, antara lain prosedur lebih sederhana, tidak memerlukan detail teknis yang rumit, serta waktu pengujian relatif lebih singkat (Zaman *et al.*, 2015). Hasil uji aktivitas fibrinolitik dapat dilihat pada tabel 6.

Mekanisme kerja enzim fibrinolitik adalah dengan menghidrolisis fibrin yang menyebabkan bekuan darah menjadi produk terlarut yang dapat dibuang dari peredaran darah, sehingga 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 lisis. Sampel yang digunakan untuk pengujian *clot lysis* ini adalah pelet tanpa pemurnian dan pelet pemurnian dengan ammonium sulfat, kemudian dibandingkan persentase lisis untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik.

Tabung eppendorf berisi bekuan darah ditambahkan sampel enzim dengan konsentrasi 15; 25; 50 dan 100% yang diperoleh ditambahkan ke 4 tabung eppendorf dengan masing-masing tabung berisi 100 μL. Sampel dengan konsentrasi 15; 25; 50 dan 100% enzim yang diendapkan dengan ammonium sulfat juga dimasukkan ke dalam 4 tabung eppendorf lainnya hingga sebanyak 100 μL tiap tabungnya. Sisa dua eppendorf diisi dengan kontrol positif nattokinase dan kontrol negatif berupa air suling (aquades). 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 6.

Tabel 6. Potensi aktivitas fibrinolitik ekstrak enzim tempe gembus

Sampel (%)	Uji Fibrinolitik Clot Lysis			Rata-rata replikasi (%) ± SD
	Replikasi 1 (%)	Replikasi 2 (%)	Replikasi 3 (%)	
S ₁ 15	41	32	31	35 ± 5,507
S ₁ 25	48	38	37	41 ± 6,082
S ₁ 50	56	40	42	46 ± 8,717
S ₁ 100	59	48	46	51 ± 7
S ₂ 15	45	32	36	38 ± 6,658
S ₂ 25	51	40	44	45 ± 5,567
S ₂ 50	60	44	45	50 ± 8,962
S ₂ 100	62	51	59	57 ± 5,686
Nattokinase (kontrol positif)	78	76	72	75 ± 3,055
Buffer fosfat pH 7 (kontrol negatif)	8	10	9	9 ± 1

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

Nattokinase digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan enzim fibrinolitik yang dihasilkan dari fermentasi kedelai oleh bakteri *Bacillus subtilis*. Enzim ini memiliki kemampuan untuk langsung menghancurkan bekuan darah melalui hidrolisis fibrin serta substrat plasmin. Cara kerja nattokinase melibatkan beberapa mekanisme, seperti mengubah pro-urokinase menjadi urokinase (uPA), menurunkan kadar inhibitor aktivator plasminogen tipe 1 (PAI-1), dan meningkatkan jumlah aktivator jaringan plasminogen (t-PA). Kombinasi aktivitas ini berperan penting dalam mendukung proses fibrinolisis secara optimal (Pratiwi, 2020).

Berdasarkan data pada Tabel 6, terlihat bahwa ekstrak enzim tempe gembus, baik sebelum maupun sesudah proses pemurnian menunjukkan aktivitas fibrinolitik. Persentase lisis tertinggi ditunjukkan oleh kontrol positif berupa nattokinase, yaitu sebesar 75%. Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian oleh Nadea *et al.*, (2023) yang mengungkapkan bahwa nattokinase merupakan enzim protease jenis serin yang telah dimurnikan dan terbukti efektif dalam lisis bekuan darah. Kontrol negatif menunjukkan persentase lisis paling rendah sebesar 9%, hal ini dikarenakan buffer fosfat merupakan larutan yang tidak memiliki aktivitas fibrinolitik. Pada penelitian ini kontrol negatif memiliki persentase lisis, hal ini dapat disebabkan oleh proses penambahan sampel yang membuat bagian atas gumpalan larut atau terjadi saat proses pengambilan cairan sehingga gumpalan darah berkurang dan terjadi lisis.

Pengujian aktivitas fibrinolitik pada ekstrak enzim tempe gembus sebelum pemurnian, dengan variasi konsentrasi 15%, 25%, 50%, dan 100%, menunjukkan persentase lisis berturut-turut sebesar 35%, 41%, 46%, dan 51%. Sementara itu, pada ekstrak enzim setelah pemurnian, masing-masing konsentrasi tersebut menghasilkan persentase lisis sebesar 38%, 45%, 50%, dan 57%. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak enzim sebelum pemurnian memiliki aktivitas fibrinolitik yang lebih rendah dibandingkan dengan enzim yang telah dimurnikan. Peningkatan aktivitas fibrinolitik setelah pemurnian kemungkinan disebabkan oleh enzim yang lebih murni, aktif, dan terkonsentrasi, serta minimnya zat pengotor. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi dan kemurnian enzim berbanding lurus dengan aktivitas fibrinolitiknya. Meski demikian, aktivitas tertinggi pada konsentrasi 100% setelah pemurnian masih lebih rendah dibandingkan kontrol positif (nattokinase), kemungkinan disebabkan oleh perbedaan mikroorganisme fermentasi, yakni *Rhizopus oligosporus* pada tempe gembus dan *Bacillus subtilis* pada nattokinase, yang menghasilkan enzim fibrinolitik dengan jenis dan jumlah berbeda.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Karina *et al.*, (2022) menggunakan tempe kedelai menunjukkan aktivitas fibrinolitik tertinggi pada konsentrasi 80%, dengan persentase lisis mencapai 88%. Hasil ini menunjukkan bahwa tempe kedelai memiliki potensi lebih besar sebagai agen fibrinolitik. Hal ini didukung oleh kandungan protein yang relatif lebih tinggi pada tempe kedelai dibandingkan tempe gembus. Oleh karena itu, secara keseluruhan, tempe kedelai memiliki kemampuan fibrinolitik yang lebih baik dari sisi aktivitas enzim maupun kemurnian protein, dibandingkan dengan tempe gembus.

Hasil uji aktivitas fibrinolitik kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS. Hasil uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk menunjukkan data memiliki distribusi normal, yang ditunjukkan oleh nilai signifikansi $> 0,05$. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dimana hasil uji ini menunjukkan data homogen, dengan nilai signifikansi $> 0,05$. Apabila data tidak homogen, maka digunakan pengujian non-parametrik yaitu dengan metode *Kruskal-wallis*. Setelah data dinyatakan memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, analisis dilanjutkan menggunakan metode *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok sampel dengan variasi konsentrasi ekstrak enzim tempe gembus. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($< 0,05$), mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan antara masing-masing variasi konsentrasi ekstrak terhadap persentase lisis yang dihasilkan.

KESIMPULAN

Kadar protein dari ekstrak enzim tempe gembus yang telah diperoleh sebelum dan setelah pemurnian adalah 40,02 μ g/mL dan 104,27 μ g/mL. Ekstrak enzim tempe gembus memiliki aktivitas fibrinolitik dibuktikan dengan kemampuan ekstrak melisiskan bekuan darah. Konsentrasi optimum dari ekstrak enzim tempe gembus adalah 100% pada sampel setelah pemurnian dan sebelum pemurnian yaitu menunjukkan persentase lisis bekuan darah sebesar 57% dan 51%.

DAFTAR PUSTAKA

- Altschul Sf, Gish W, Miller W, Myers Ew, L.D. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403–410.
- Ethica, S.N., Oedjijono, Semiarti, E., Widada, J., Raharjo, T.J. 2018. Genotypic And Phenotypic Characterization Of *Alcaligenes Javaensis* Jg3 Potential As An Effective Biodegrader. *Biotropia*.25(1):1–10.
- Inayatul, W.O., Muchlisin, S.I., Mukaromah, A.H., Darmawati, S. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Protease *Pseudomonas Stutzeri* Istd 4 Dari Tempe Gembus Pasca Fermentasi 1 Hari. *Seminar Nasional Edusaintek*. 102–109.
- Iswendi. 2010. Amilase 2. *Jurnal Sainstek*. 94–98.
- Karina, K.I., Indrayati, A. dan Leviana, F. 2022. Potensi Ekstrak Kasar Enzim Dari Tempe Kedelai (*Glycine Max* L. Merrill) Sebagai Obat Fibrinolitik Alami Dengan Metode Clot Lysis In Vitro. *Paket Industri Pangan Untuk Daerah Pedesaan*. 48.
- Larsen, J.B. dan Hvas, A.M. 2020. Fibrin Clot Formation And Lysis In Plasma. *Methods And Protocols*. 3(4): 1–12.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *The Journal Of Biological Chemistry*. 193(1): 265–275.
- Michail, M., Vasiliadou, M. dan Zotos, A. 2006. Partial Purification And Comparison Of Precipitation Techniques Of Proteolytic Enzymes From Trout (*Salmo Gairdnerii*) Heads. *Food Chemistry*. 97(1): 50–55.
- Nadea, N.S.W.P., Indrayati, A. dan 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. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*. 5(2):115–125.
- Peng, Y., Yang, X. dan Zhang, Y. 2005. Microbial Fibrinolytic Enzymes: An Overview Of Source, Production, Properties, And Thrombolytic Activity In Vivo. *Applied Microbiology And Biotechnology*.69(2):126–132.
- Poernomo, A.T., Isaeni dan Purwanto. 2014. Aktivitas Invitro Enzim Fibrinolitik Ekstrak Tempe Hasil Fermentasi *Rhizopus Oligosporus* Atcc 6010 Pada Substrat Kedelai Hitam. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*.4(2):18–24.
- Pratiwi, D.A.R. 2020. Aktivitas Fibrinolitik Pada Makanan Fermentasi Berbasis Kacang (Bean) Di Kawasan Asia Sebagai Pangan Fungsional Anti-Atherotrombosis. *Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Soegijapranata Semarang 2020*. 1–23.
- Setyowati, R. 2015. Uji Aktivitas Antiplatelet Dan Trombolitik Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Purut (*Citrus Hystrix* D.C.) In Vitro. *Skripsi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember
- Sine, Y. dan Soetarto, E.S. 2018. Isolasi Dan Identifikasi Kapang *Rhizopus* Pada Tempe Gude (*Cajanus Cajan* L.). *Savana Cendana*. 3(04): 67–68.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. dan Gibson, T.J. 1994. Clustal W : Improving The Sensitivity Of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting , Position-Specific Gap Penalties And Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22): 4673–4680.
- Yowani, S.C. dan Wirajana, I.N. 2014. Identifikasi Mutasi Gen RpoB Isolat Mdr *Mycobacterium Tuberculosis* Di Bali Dengan Metode Nested Pcr. *Respirasi Care*: 5–11.
- Zaman, R., Parvez, M., Jakaria, Sayeed, M.A. 2015. In Vitro Clot Lysis Activity Of Different Extracts Of *Mangifera Sylvestica* Roxb. Leaves. *Research Journal Of Medicinal Plant*. 9(3): 135–140.