

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH
Lumbricus rubellus SECARA *in vitro* DAN EVALUASI PENGARUHNYA
TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS PADA
MONYET EKOR PANJANG *Macaca fascicularis* SEHAT**

Oleh
ERWIN OVIANTO
F02400106



2004
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR

F/1116
2004
109

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH
Lumbricus rubellus SECARA *in vitro* DAN EVALUASI PENGARUHNYA
TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS PADA
MONYET EKOR PANJANG *Macaca fascicularis* SEHAT**

Oleh
ERWIN OVIANTO
F02400106

2004
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR

RINGKASAN

Lumbricus rubellus merupakan salah satu cacing tanah yang memiliki potensi besar sebagai antitrombosis (trombolitik). Cacing ini mengandung enzim protease yang bersifat fibrinolitik, yang disebut lumbrokinase. Untuk menggali lebih dalam potensi cacing tanah sebagai antitrombosis, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas fibrinolitik ekstrak cacing *L. rubellus* secara *in vitro* dengan dua metode, yaitu cakram fibrin dan zimogram. Pada kedua uji tersebut dilakukan pengamatan secara kualitatif. Pada metode cakram fibrin, aktivitas fibrinolitik ditandai dengan terbentuknya area berwarna bening (halo). Pengamatan dilakukan setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1, 3, 6, dan 24 jam. Ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial yang digunakan sebanyak 5 µL, dengan konsentrasi protein berturut-turut sebesar 9.65 µg dan 2.50 µg, serta aktivitas enzim berturut-turut sebesar 4.44×10^{-3} UA dan 1.28×10^{-3} UA. Aktivitas fibrinolitik ekstrak cacing *L. rubellus* dibandingkan dengan lumbrokinase komersial. Berdasarkan hasil cakram fibrin dapat disimpulkan bahwa ekstrak cacing *L. rubellus* menunjukkan aktivitas fibrinolitik yang terus meningkat hingga 24 jam pada inkubasi dengan suhu 37°C. Ekstrak tersebut memiliki aktivitas fibrinolitik yang hampir sama dengan lumbrokinase komersial. Pada uji zimogram digunakan sampel yang sama, masing-masing sebanyak 10 µL. Ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial yang digunakan memiliki konsentrasi protein berturut-turut sebesar 19.30 µg dan 5.00 µg, serta aktivitas enzim berturut-turut sebesar 8.88×10^{-3} UA dan 2.55×10^{-3} UA. Hasil uji zimogram menunjukkan bahwa ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial memiliki enam pita hasil digesti fibrinogen pada posisi yang sama.

Uji *in vivo* dilakukan dengan menggunakan monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* sehat terhadap beberapa parameter aterosklerosis. Parameter-parameter yang diukur adalah kadar trombosit, konsentrasi D-dimer, waktu protrombin, volume serum hasil retraksi bekuan, waktu lisis bekuan darah utuh, kadar glukosa sewaktu, dan kadar trigliserida. Pengamatan juga dilakukan terhadap perubahan berat badan. Monyet tersebut dibagi ke dalam tiga kelompok: C, L, dan H. Kelompok C merupakan kontrol sedangkan kelompok L dan H berturut-turut adalah kelompok yang diberi tepung cacing *L. rubellus* 150 mg dan 450 mg dalam bentuk suspensi sirup. Tepung cacing *L. rubellus* yang diberikan kepada kelompok L dan H berturut-turut memiliki aktivitas enzim sebesar 69 UA dan 207 UA.

Perubahan berat badan diukur setiap kali pengambilan darah. Pada pengambilan darah I (baseline), kelompok C, L, dan H memiliki berat badan rata-rata berturut-turut 3.65 ± 0.25 , 3.41 ± 0.53 , dan 4.24 ± 1.12 kg. Pada pengambilan darah IV (final) monyet-monyet dalam kelompok C, L dan H memiliki berat badan rata-

rata berturut-turut sebesar 3.76 ± 0.31 , 3.30 ± 0.47 , dan 4.37 ± 1.14 kg. Tidak adanya perubahan berat badan secara signifikan menunjukkan bahwa tepung cacing tidak mempengaruhi nafsu makan atau asupan pakan pada monyet-monyet yang digunakan. Kadar trombosit diukur untuk kelompok C dan H saja. Kadar trombosit rata-rata untuk kelompok C dan H pada baseline berturut-turut sebesar $328.6 \pm 75.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah dan $237.0 \pm 51.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah dan menjadi $327.0 \pm 55.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah dan $250.4 \pm 19.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah pada pengambilan darah IV. Konsentrasi D-dimer untuk kelompok C dan H tidak mengalami perubahan yaitu 0.1 mg/L. Waktu protrombin diukur hanya untuk kelompok C dan H. Pada baseline, kelompok C dan H memiliki waktu protrombin rata-rata berturut-turut 13.7 ± 0.61 detik (INR: 0.78 ± 0.04) dan 13.5 ± 0.31 detik (INR: 0.78 ± 0.04). Pada pengambilan darah IV, kelompok C dan H memiliki waktu protrombin rata-rata berturut-turut 14.5 ± 0.48 detik (INR: 0.96 ± 0.05) dan 14.9 ± 0.70 detik (INR: 1.00 ± 0.07). Untuk retraksi bekuan, pada baseline kelompok C, L, dan H memiliki volume serum rata-rata berturut-turut sebesar 37.6 ± 6.4 , 30.0 ± 7.9 dan $33.0 \pm 4.5\%$. Pada pengambilan darah IV, volume serum rata-rata untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut adalah 54.0 ± 19.5 , 52.0 ± 10.4 , dan $55.0 \pm 11.2\%$. Persentase perubahan volume serum antara baseline dan final untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut sebesar 30.37%, 42.31%, dan 40.00%. Waktu lisis bekuan darah utuh pada baseline untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut sebesar 91.2 ± 20.1 , 81.6 ± 13.1 , dan 105.6 ± 13.1 jam. Pada pengambilan darah IV waktu lisis rata-rata kelompok C sebesar 100.8 ± 26.3 jam, sedangkan untuk kelompok L dan H sama yaitu 105.6 ± 13.1 jam. Kadar glukosa rata-rata kelompok C, L dan H pada baseline berturut-turut sebesar 85.4 ± 18.0 , 80.4 ± 39.6 , dan 75.0 ± 31.5 mg/dL, menjadi 81.2 ± 25.5 , 76.2 ± 54.2 , dan 61.4 ± 23.8 mg/dL pada final. Pada pengukuran kadar trigliserida, ada beberapa kadar trigliserida yang tidak terukur oleh alat. Kadar trigliserida rata-rata pada baseline untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut sebesar 92.0 ± 24.0 , 91.0 ± 15.0 , dan 103.0 ± 24.5 mg/dL, dan menjadi 28.2 ± 5.4 , 79.3 ± 7.7 , dan 29.2 ± 7.8 mg/dL pada final. Secara umum dapat disimpulkan bahwa tidak ada perubahan yang signifikan untuk masing-masing parameter uji selama penelitian berlangsung. Hal ini menunjukkan bahwa tepung cacing *L. rubellus* tidak berpengaruh negatif terhadap parameter-parameter aterosklerosis yang diuji dan aman untuk dikonsumsi.

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH
Lumbricus rubellus SECARA *in vitro* DAN EVALUASI PENGARUHNYA
TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS PADA
MONYET EKOR PANJANG *Macaca fascicularis* SEHAT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi,

Fakultas Teknologi Pertanian,

Institut Pertanian Bogor

Oleh

ERWIN OVIANTO

F02400106

2004

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH
Lumbricus rubellus SECARA *in vitro* DAN EVALUASI PENGARUHNYA
TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS PADA
MONYET EKOR PANJANG *Macaca fascicularis* SEHAT**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN
Pada Departemen Teknologi Pangan dan Gizi,
Fakultas Teknologi Pertanian,
Institut Pertanian Bogor

Oleh

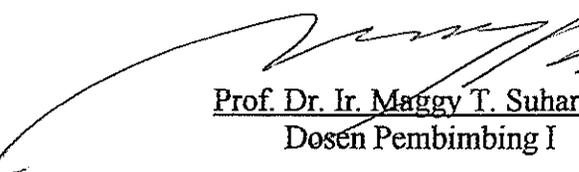
ERWIN OVIANTO

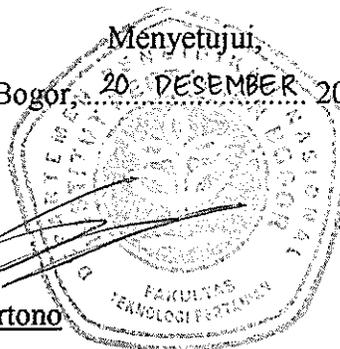
F02400106

Dilahirkan pada tanggal 25 Oktober 1981
di Bogor

Tanggal lulus : 8 DESEMBER 2004

Menyetujui,
Bogor, 20 DESEMBER 2004


Prof. Dr. Ir. Maggy T. Suhartono
Dosen Pembimbing I




dr. Irma H. Suparto, MS
Dosen Pembimbing II

BIODATA PENULIS

Penulis dilahirkan di Bogor pada tanggal 25 Oktober 1981. Penulis bernama lengkap Erwin Ovianto dan biasa dipanggil Erwin. Pada tahun 1988 penulis menginjak bangku Sekolah Dasar untuk pertama kalinya di SD Mardi Yuana Cibinong. Setelah itu penulis melanjutkan sekolah di SMP Regina Pacis Bogor pada tahun 1994–1997, lalu ke jenjang pendidikan berikutnya di SMU Regina Pacis Bogor dan menempuh pendidikan selama 3 tahun. Setelah lulus dari SMU, pada tahun 2000 penulis melanjutkan studi ke Institut Pertanian Bogor (IPB) melalui Ujian Masuk Perguruan Tinggi Negeri (UMPTN). Penulis menjadi salah satu mahasiswa di Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

Selama menjadi mahasiswa penulis telah mengikuti berbagai kegiatan yang berhubungan dengan studi yang diambil penulis, seperti: Laboratorium Terpadu, Seminar HACCP, Pelatihan GLP, dan aktif dalam kegiatan *Food Chat Club*. Berkaitan dengan kegiatan yang terakhir, penulis pernah menjadi juara kedua dalam *3rd National Students' Paper Competition on Food Issues* pada tahun 2004 di IPB. Penulis telah mengambil berbagai mata kuliah, baik yang bersifat wajib maupun pilihan, dan telah menyelesaikan sebanyak 144 SKS termasuk seminar dan tugas akhir dengan nilai yang baik.

Penulis

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Kasih karena atas anugerah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi ini berjudul “Uji Aktivitas Fibrinolitik Tepung Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* Secara *in vitro* dan Evaluasi Pengaruhnya Terhadap Beberapa Parameter Aterosklerosis pada Monyet Ekor Panjang *Macaca fascicularis* Sehat”. Skripsi ini disusun dalam rangkaian kegiatan penelitian yang telah dilakukan penulis mulai dari bulan Juni hingga Oktober, baik uji *in vivo* yang dilakukan di unit karantina Pusat Studi Satwa Primata LPPM-IPB Darmaga, maupun uji *in vitro* yang dilakukan di laboratorium.

Dalam merampungkan skripsi ini, penulis mendapat banyak bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Maggy T. Suhartono, sebagai Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing I dalam penelitian ini yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta memberikan motivasi, bimbingan, dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
2. dr. Irma H. Suparto, MS sebagai Pembimbing II dalam penelitian ini yang telah memberikan jurnal, referensi, bimbingan, dan saran dalam penyusunan skripsi ini, terutama yang berkaitan dengan monyet *Macaca fascicularis*.
3. drh. Joko Pamungkas, MSc sebagai Kepala Pusat PSSP LPPM-IPB
4. drh. I Nengah Budiarsa sebagai Kepala Unit Karantina yang telah memberikan izin untuk melakukan penelitian di Unit Karantina Pusat Studi Satwa Primata LPPM-IPB.
5. drh. Diah Pawitri dari Unit Karantina Pusat Studi Satwa Primata LPPM-IPB yang telah banyak membantu, terutama dalam tahap seleksi dan pengambilan darah monyet *Macaca fascicularis*, serta memberikan literatur yang berguna dalam penulisan skripsi ini.
6. Ir. Yanti, MSi yang banyak membantu secara langsung sejak awal hingga akhir penelitian ini, serta memberikan jurnal, referensi, dan saran dalam

penyusunan skripsi ini, terutama yang berkaitan dengan cacing *Lumbrius rubellus*.

7. Ibu Tami Idiyanti, MSc. dari Puspiptek LIPI yang telah menyediakan waktu untuk membantu kami dalam pengeringan cacing *L. rubellus*.
8. Staf Unit Karantina Pusat Studi Satwa Primata LPPM-IPB, terutama drh. Susi, drh. Nyoman, drh. Esther, Mas Yana, Mas Agus, Mas Umang, dan Mas Slamet, yang telah banyak membantu dalam pemberian sampel dan pengambilan darah monyet *Macaca fascicularis*, serta membagi pengalaman-pengalaman yang berguna.
9. Rani, “teman seperjuanganku”, terima kasih banyak untuk kesabaran, pengertian, dorongan, dan bantuanmu selama penelitian ini.
10. Papi, Mami, dan adikku yang selalu memberikan doa, motivasi, dan semangat, serta dorongan materiil.
11. Teman-teman TPG, terutama Miranti dan Atik yang telah memberikan dorongan dan semangat.
12. Semua pihak yang tidak mungkin disebutkan satu per satu, yang telah banyak membantu sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat berguna bagi pihak yang membutuhkannya.

Bogor, Oktober 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN DAN SASARAN	2
C. MANFAAT	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
A. CACING TANAH <i>Lumbricus rubellus</i>	3
B. TROMBOSIS DAN MASALAH-MASALAH KLINIS YANG DITIMBULKANNYA	5
C. LUMBROKINASE	8
D. <i>Macaca fascicularis</i> SEBAGAI HEWAN PERCOBAAN	16
III. METODE PENELITIAN	21
A. BAHAN DAN ALAT	21
B. METODE	22
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
A. UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH <i>Lumbricus rubellus</i> SECARA <i>in vitro</i>	35
B. EVALUASI PENGARUH TEPUNG CACING TANAH <i>Lumbricus rubellus</i> TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS SECARA <i>in vivo</i>	40
V. KESIMPULAN DAN SARAN	56
A. KESIMPULAN	56
B. SARAN	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi kandungan gizi pada cacing tanah	4
Tabel 2. Karakteristik biokimiawi protease kasar dari cacing tanah <i>L. rubellus</i>	10
Tabel 3. Perbandingan beberapa enzim trombolitik komersial	12
Tabel 4. Kebutuhan zat makanan monyet	18
Tabel 5. Kebutuhan nutrisi Rhesus	18
Tabel 6. Komposisi gel elektroforesis zimogram 12% dengan substrat fibrinogen	24
Tabel 7. Pengenceran larutan stok BSA 1 mg/mL	24
Tabel 8. Komposisi larutan protein dan pereaksi Bradford	25
Tabel 9. Komposisi pereaksi dalam analisis aktivitas protease menurut Bergmeyer dan Grassl	26
Tabel 10. Nilai konsentrasi protein, aktivitas enzim, aktivitas spesifik, dan aktivitas per gram sampel untuk ekstrak cacing <i>L. rubellus</i> dan lumbrokinase komersial	34
Tabel 11. Hubungan antara konsentrasi larutan standar BSA dengan nilai absorbansi	70
Tabel 12. Data perubahan berat badan (kg) <i>Macaca fascicularis</i>	71
Tabel 13. Data perubahan kadar trombosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$ darah)	71
Tabel 14. Data konsentrasi D-dimer (mg/L)	71
Tabel 15. Data perubahan waktu protrombin (detik)	72
Tabel 16. Data perubahan waktu protrombin (INR)	72
Tabel 17. Data perubahan volume serum pada retraksi bekuan (%)	72
Tabel 18. Data perubahan waktu lisis bekuan darah utuh (jam)	72
Tabel 19. Data perubahan kadar glukosa (mg/dL)	73
Tabel 20. Data perubahan kadar trigliserida (mg/dL)	73

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Proses pembekuan darah secara sederhana	6
Gambar 2. Mekanisme kerja lumbrokinase sebagai obat trombolitik	14
Gambar 3. Diagram alir uji tepung cacing tanah <i>Lumbricus rubellus</i>	22
Gambar 4. Cakram fibrin sebelum inkubasi (a) dan setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (b), 3 jam (c), 6 jam (d), dan 24 jam (e) ...	37
Gambar 5. Digesti substrat fibrinogen (0.1% b/v) oleh R: presipitat protein <i>L. rubellus</i> 2 % b/v (presipitasi dengan garam amonium sulfat 65%); E: ekstrak cacing <i>L. rubellus</i> 2% b/v; dan P: lumbrokinase komersial 2% b/v pada analisis zimogram fibrinogen 12%	39
Gambar 6. Perubahan berat badan rata-rata	41
Gambar 7. Perubahan kadar trombosit rata-rata	43
Gambar 8. Konsentrasi D-dimer	45
Gambar 9. Perubahan waktu protrombin dalam satuan detik (A) dan INR (B)	47
Gambar 10. Perubahan volume serum rata-rata	48
Gambar 11. Perubahan waktu lisis bekuan darah utuh rata-rata	50
Gambar 12. Perubahan kadar glukosa darah rata-rata	53
Gambar 13. Kurva standar Bradford	70
Gambar 14. Cacing <i>Lumbricus rubellus</i>	74
Gambar 15. Pemberian sirup pada monyet <i>Macaca fascicularis</i>	75
Gambar 16. Penimbangan monyet <i>Macaca fascicularis</i>	75
Gambar 17. Pengambilan darah monyet <i>Macaca fascicularis</i>	76
Gambar 18. Kandang individu <i>Macaca fascicularis</i>	76

DAFTAR LAMPIRAN ..

	Halaman
Lampiran 1. Larutan pereaksi	64
Lampiran 2. Penentuan dosis tepung cacing	69
Lampiran 3. Kurva standar Bradford	70
Lampiran 4. Data hasil uji parameter fibrinolitik, kadar glukosa, dan kadar trigliserida	71
Lampiran 5. Cacing <i>Lumbricus rubellus</i>	74
Lampiran 6. Monyet <i>Macaca fascicularis</i>	75

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Cacing tanah telah lama dikenal oleh manusia. Hewan ini hidup di tempat atau tanah yang terlindung dari sinar matahari, lembab, gembur, dan mengandung banyak serasah. Habitat ini sangat spesifik bagi cacing tanah untuk tumbuh dan berkembang biak dengan baik. Tubuh cacing tanah banyak mengandung lendir sehingga seringkali orang menganggapnya menjijikan. Walaupun demikian, cacing tanah memegang peranan penting dalam menguraikan limbah organik untuk menghasilkan pupuk organik yang dapat menyuburkan tanaman. Oleh karena itu, orang mulai tertarik untuk membudidayakan cacing tanah yang potensial bagi lingkungan, seperti *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida*, *Pheretima asiatica*, dan *Eudrilus eugeniae*. Peternak banyak memperoleh keuntungan dari hasil pemeliharaan cacing tanah berupa kascing (bekas cacing), yang laku dijual di pasaran sebagai kompos untuk menyuburkan tanaman (Palungkun, 1999).

Cacing tanah memang sangat potensial untuk dikembangkan, tidak hanya karena peranannya yang besar bagi lingkungan, tetapi juga karena kandungan gizinya yang cukup tinggi. Beberapa spesies cacing tanah merupakan sumber protein yang baik. Cacing tanah juga merupakan salah satu bahan baku obat tradisional yang banyak digunakan oleh bangsa Cina. Sejak dahulu cacing tanah telah digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, seperti penyakit tifus, kencing manis, maag, batuk, dan rematik (Palungkun, 1999). Cacing tanah juga telah digunakan sebagai obat antitrombosis di Asia Timur selama beribu-ribu tahun.

Pada tahun 1883, Charles Darwin mengamati bahwa cairan dari saluran pencernaan cacing tanah dapat melarutkan fibrin. Sekitar tahun 1980, para peneliti Jepang mengekstrak enzim yang mampu melarutkan fibrin dari *L. rubellus*, dan menemukan bahwa enzim tersebut terdiri dari enam enzim proteolitik. Enzim tersebut diberi nama lumbrokinase (Anonim, 2003). Enzim ini pertama kali dikarakterisasi pada tahun 1983 di Jepang. Studi lanjut dari komponen-komponen lumbrokinase juga telah dilaporkan oleh kelompok peneliti

di Cina, Korea Selatan, maupun negara lain. Protease *L. rubellus* memiliki aktivitas fibrinolitik yang potensial dalam menghidrolisis substrat fibrinogen pada suhu 37°C dan 60°C (Yanti, 2003). Lumbrokinase diketahui stabil dalam waktu lama untuk penyimpanan pada suhu kamar (Nurachman, 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Padjajaran Bandung menyatakan bahwa enzim dalam cacing tanah mampu memperbaiki proses fisiologis tubuh sehingga gangguan pada sirkulasi darah dapat berkurang (Palungkun, 1999).

Budidaya cacing tanah *L. rubellus* relatif tidak memerlukan investasi yang terlalu besar. Cacing tersebut berkembang biak dengan cepat dan produktivitasnya cukup tinggi, apalagi keadaan alam di Indonesia sangat mendukung dikembangkannya peternakan cacing tanah jenis ini (Palungkun, 1999). Di lain pihak manfaat lumbrokinase dari *L. rubellus* dalam memperlancar sirkulasi darah dapat menjadi terobosan baru dalam terapi pengobatan penderita stroke atau aterosklerosis. Apalagi hal ini didukung oleh berbagai studi dan uji klinis terhadap aktivitas fibrinolitik enzim ini yang memperlihatkan bahwa enzim ini bersifat aman dikonsumsi, nontoksik, nonalergik, dan tidak berefek samping terhadap organ vital tubuh seperti jantung, ginjal, hati, sistem pernafasan, dan sistem saraf (Mihara *et al.*, 1991). Berdasarkan pertimbangan tersebut, perlu dilakukan pengujian tepung cacing tanah *L. rubellus* secara *in vivo*.

B. TUJUAN DAN SASARAN

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas fibrinolitik tepung cacing dan ekstrak cacing *L. rubellus* secara *in vitro* dan *in vivo*. Sasaran penelitian ini adalah untuk mengembangkan produk pangan dari cacing tanah *L. rubellus*.

C. MANFAAT

Manfaat penelitian ini adalah untuk pengembangan aplikasi cacing tanah sebagai bahan pangan yang memiliki aktivitas medis.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. CACING TANAH *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah *Lumbricus rubellus* tergolong ke dalam hewan avertebrata (tidak bertulang belakang) sehingga sering disebut binatang lunak. Jenis cacing ini bukan asli dari Indonesia (Palungkun, 1999). *Lumbricus rubellus* berasal dari Eropa, sehingga sering dikenal dengan sebutan cacing Eropa atau cacing introduksi. Di Indonesia, cacing ini disebut juga dengan nama cacing Jayagiri (Rukmana, 1999). Cacing tanah *L. rubellus* diklasifikasikan oleh Hegner dan Engemann (1968) sebagai berikut:

dunia : Animalia
divisi : Vermes
filum : Annelida
kelas : Oligochaeta
ordo : Opisthopora
famili : Lumbricidae
genus : *Lumbricus*
spesies : *rubellus*

Menurut Palungkun (1999), selain cacing *L. rubellus*, cacing tanah *Eisenia foetida*, *Pheretima asiatica*, dan *Eudrilus eugeniae* pun banyak dibudidayakan di berbagai negara. *Lumbricus rubellus* merupakan spesies cacing tanah yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia. Budidaya cacing tanah jenis ini relatif tidak memerlukan investasi yang terlalu besar. Cacing tersebut berkembang biak dengan cepat dan produktivitasnya cukup tinggi, apalagi keadaan alam di Indonesia sangat mendukung dikembangkannya peternakan cacing tanah jenis ini. Menurut Rukmana (1999), cacing ini mampu menghasilkan kompos dari bahan organik dalam jumlah besar, berkembang biak pada media yang rendah nutrisi, dan daya reproduksinya tinggi. Seekor cacing *L. rubellus* dapat menghasilkan sebanyak 106 kokon/tahun, dimana setiap kokon mampu menghasilkan 1–4 juta anak cacing (Palungkun, 1999).

Ciri-ciri fisik *L. rubellus* antara lain: tubuh gilig dengan bagian ventral pipih, bagian dorsal berwarna coklat cerah sampai ungu kemerah-merahan sedangkan bagian ventral berwarna krem, warna ekor kekuning-kuningan, panjang tubuh 7.5–10 cm, jumlah segmen 95–100, klitelum berbentuk sadel dan menonjol yang menempati segmen ke-27 sampai ke-32, lubang kelamin jantan terletak pada segmen ke-14 dan lubang kelamin betina pada segmen ke-13, penyebaran seta Lumbricine, dan bergerak kurang aktif (Edward dan Lofty, 1977; Minnich, 1977; Rukmana, 1999). Secara umum, cacing tanah memiliki lendir, prostomium, tidak bergigi, mengandalkan kulit sebagai alat pernapasan, bersifat hermaprodit biparental, nokturnal, serta peka terhadap cahaya, sentuhan, dan getaran (Palungkun, 1999).

Kandungan protein cacing tanah jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan lemaknya. Komposisi asam amino cacing tanah terdiri atas 9 asam amino esensial dan 4 asam amino non esensial. Selain itu, cacing tanah juga mengandung fosfor, kalsium, dan serat kasar. Tabel 1 menunjukkan komposisi kandungan gizi pada cacing tanah.

Tabel 1. Komposisi kandungan gizi pada cacing tanah

Zat Gizi	Komposisi (%)
Protein	64–76
<u>Asam amino esensial</u>	
- Arginin	4.13
- Histidin	1.56
- Isoleusin	2.58
- Leusin	4.84
- Lisin	4.33
- Metionin	2.18
- Fenilalanin	2.25
- Treonin	2.95
- Valin	3.01
<u>Asam amino nonesensial:</u>	
- Sistin	2.29
- Glisin	2.92
- Serin	2.88
- Tirosin	1.36
Lemak	7–10
Serat kasar	1.08
Fosfor (P)	1.00
Kalsium (Ca)	0.55

Sumber: Palungkun (1999)

Penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh Yanti (2003) menunjukkan bahwa ekstrak cacing *L. rubellus* menunjukkan aktivitas berbagai enzim pada substrat tertentu, antara lain: protease, α -amilase, lipase, amiloglukosidase, kitinase, dan selulase. Hewan ini juga diketahui mengandung auksin yang merupakan zat perangsang tumbuh untuk tanaman dan asam arakhidonat yang dikenal dapat menurunkan panas tubuh yang disebabkan oleh infeksi (Palungkun, 1999). Mihara *et al.* (1991) juga menyebutkan bahwa studi farmakologi secara detail telah dilakukan pada lumbrofebrin sebagai antipiretik.

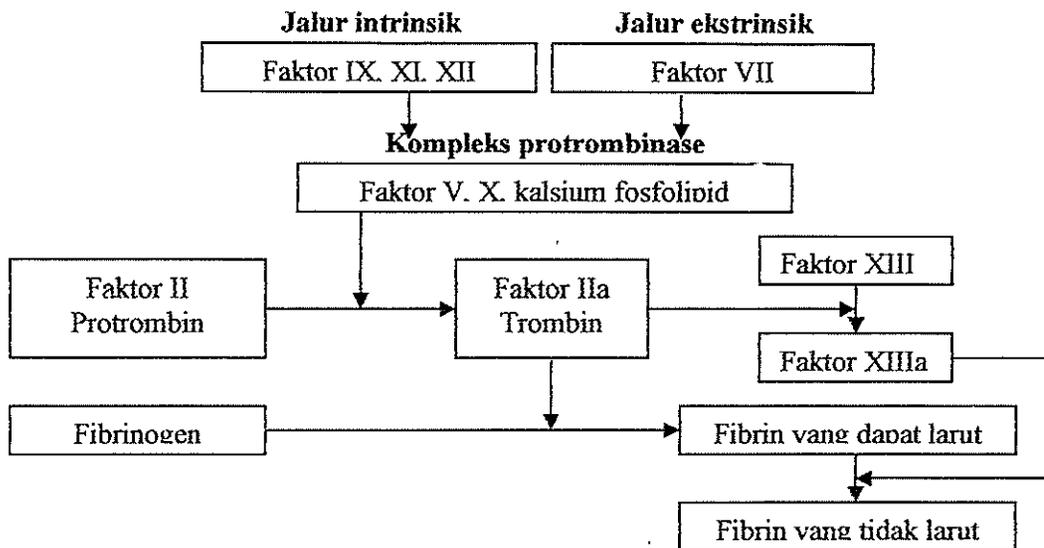
Cacing tanah memiliki kemampuan untuk mengakumulasi unsur-unsur perunut, terutama ion-ion logam seperti kadmium, tembaga, dan seng. Respon cacing tanah terhadap kontaminasi logam dihubungkan dengan induksi dan ekspresi protein metalothionein (MT), suatu strategi detoksifikasi yang analog dengan sistem-sistem biologis lain (Grüber *et al.*, 2000). Metalothionein dapat didefinisikan berdasarkan karakteristik berat molekul yang rendah, kandungan logam yang tinggi, sedikit atau tidak adanya residu aromatik, dan jumlah sistein yang tinggi hingga 30% (Stürzenbaum *et al.*, 2001).

Cho *et al.* (1998) telah mengisolasi dan mengkarakterisasi peptida antimikroba dari cacing *L. rubellus*. Peptida tersebut dinamakan lumbricin I. Lumbricin I merupakan peptida antimikroba yang kaya akan prolin dari total 62 asam amino (15% prolin dalam rasio molar dengan massa molekul 7231 Da). Peptida tersebut menunjukkan aktivitas antimikroba *in vitro* pada sejumlah besar mikroorganisme tanpa aktivitas hemolitik. Sebuah peptida dengan 29 asam amino yang dinamakan lumbricin I(6-34), yang diturunkan dari residu-residu 6-34 dari lumbricin I, menunjukkan aktivitas antimikroba yang secara marginal lebih tinggi daripada lumbricin I. Ekspresi gen lumbricin I spesifik pada *L. rubellus* dewasa.

B. TROMBOSIS DAN MASALAH-MASALAH KLINIS YANG DITIMBULKANNYA

Hemostasis memegang peranan penting di dalam tubuh. Pada dasarnya hemostasis adalah proses untuk menghentikan pendarahan pada pembuluh darah yang luka, dengan adanya kombinasi dari aktivitas vaskular, platelet, dan faktor-

faktor plasma, yang dibatasi oleh berbagai mekanisme pengatur untuk mencegah akumulasi platelet dan fibrin pada bagian luka tersebut. Abnormalitas pada hemostasis akan mengakibatkan pendarahan yang berlebihan atau trombosis (Merck & Co., Inc., 1995). Gambar 1 menyajikan proses koagulasi darah secara sederhana.



Gambar 1. Proses pembekuan darah secara sederhana (Blann *et al.*, 2002)

Pada dasarnya trombosis merupakan proses pembentukan trombus. Menurut Feied dan Handler (2002) trombosis lokal merupakan bagian penting dari respon hemostatis normal, yang akan membatasi terjadinya pendarahan akibat luka mikroskopis atau makroskopis pada pembuluh darah. Trombosis dibatasi oleh adanya mekanisme antikoagulasi dan fibrinolisis secara fisiologis. Enzim-enzim trombolitik yang terdapat secara alami di dalam tubuh untuk menghancurkan trombus dibentuk pada sel-sel endotelium pada pembuluh darah. Namun semakin meningkat usia seseorang, produksi enzim-enzim tersebut melambat sehingga darah menjadi lebih mudah terkoagulasi. Hal ini akan menyebabkan pembentukan bekuan darah (clot) atau trombus (Milner dan Makise, 2002). Pada kondisi normal, pembentukan trombus terbatas pada daerah luka saja dan tidak menghambat aliran darah ke bagian-bagian kritis. Pada kondisi patologis, trombus dapat menyebar ke pembuluh-pembuluh darah yang normal. Trombus ini dapat menghambat aliran darah pada pembuluh-pembuluh

darah yang kritis dan dapat merusak katup-katup atau struktur-struktur lainnya, yang sangat penting bagi fungsi hemodinamis normal (Feied dan Handler, 2002).

Berdasarkan tempat terjadinya trombus dapat dibagi menjadi dua, yaitu trombus pada arteri dan trombus pada vena. Trombus pada arteri terbentuk pada kondisi tekanan tinggi dan laju aliran darah yang cepat serta terbentuk dari platelet-platelet teragregasi yang diikat oleh benang-benang fibrin intrinsik. Trombus pada vena terbentuk pada kondisi laju aliran darah yang lambat dan kebanyakan terbentuk dari sel-sel darah merah dengan beberapa platelet serta mengandung banyak sekali benang-benang fibrin diantara sel-sel tersebut (Milner dan Makise, 2002).

Trombosis berkaitan erat dengan aterosklerosis. Aterosklerosis adalah proses penyempitan pembuluh darah karena penimbunan lemak pada dinding pembuluh darah. Plak aterosklerosis yang banyak mengandung lemak bersifat rapuh. Plak dapat rontok bila aliran darah deras, misalnya karena tekanan darah yang tinggi atau bila pembuluh darah mengerut karena stres. Plak yang rontok dapat meninggalkan luka pada dinding pembuluh darah sehingga terjadi pendarahan di tempat tersebut. Untuk menghentikan proses pendarahan, fibrinogen diubah menjadi benang-benang fibrin sehingga terbentuk bekuan darah yang menutupi luka tersebut. Timbunan bekuan darah semakin mempersempit bahkan dapat menyumbat aliran darah. Hal ini dapat mengakibatkan penyakit jantung koroner apabila terjadi pada pembuluh koroner.

Trombus yang terbentuk dapat tetap dalam keadaan statis di dalam pembuluh darah. Namun trombus juga dapat berpindah, yang sering disebut dengan emboli. Jika trombus berpindah dari bagian tertentu melalui pembuluh vena ke paru-paru, maka akan mengakibatkan embolisme pulmonari. Jika trombus berpindah dari jantung atau arteri karotid menuju otak, maka akan menyebabkan stroke (Milner dan Makise, 2002). Stroke adalah gangguan peredaran darah di otak yang menyebabkan gangguan pada fungsi otak. Menurut Bick (2004), penyakit-penyakit yang dapat disebabkan oleh trombosis arteri dan trombosis vena antara lain: paralisis, disabilitas kardiak, kehilangan penglihatan, sindrom keguguran berulang, tukak stasis, dan bentuk-bentuk lain dari sindrom pascaflebitis (inflamasi pada membran vena bagian dalam).

C. LUMBROKINASE

1. Karakteristik Lumbrakinase *Lumbricus rubellus*

Mihara *et al.* (1986, 1991) pertama kali berhasil mengekstrak dan memurnikan enam fraksi protease dari cacing *L. rubellus* dengan ukuran molekul 23.5, 27.4, 27.0, 28.5, 34.0, dan 34.2 kD (hasil uji SDS-PAGE), yang diberi nama generik lumbrakinase. Menurut Nakajima *et al.* (2000), enzim tersebut memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik yang potensial. Berdasarkan hasil uji SDS-PAGE yang dilakukan oleh Nakajima *et al.* (1993), protease fibrinolitik ini terdiri atas enam fraksi dengan ukuran molekul 24, 27, 36, 38, 40, dan 43 kD. Dengan menggunakan metode yang sama, Park *et al.* (1998) hanya mendapatkan dua fraksi enzim fibrinolitik dengan ukuran molekul 34 dan 34.2 kD, sedangkan Yanti (2003) memperoleh sembilan fraksi dengan kisaran berat molekul 17–61 kD pada protease kasar *L. rubellus*. Ekstraksi protease cacing dapat dilakukan dengan cara pengeringan (oven vakum dan liofilisasi) dengan tujuan mendapatkan produk berupa tepung cacing. Kelebihan tepung cacing adalah lebih tahan lama, karakteristik sifat tetap dan seimbang, tidak mempengaruhi penampakan fisik (warna dan bau), kandungan bakteri kontaminan rendah, dan tidak mengalami degradasi selama proses.

Lumbrakinase dikelompokkan dalam proteinase yang bekerja menghidrolisis protein menjadi fragmen-fragmen polipeptida. Berdasarkan pemecahan ikatan peptidanya, enzim ini termasuk endopeptidase karena menguraikan ikatan peptida pada rantai dalam protein secara acak sehingga didapatkan produk peptida dan polipeptida (Nakajima *et al.*, 1996). Struktur protease cacing *L. rubellus* berupa satu rantai polipeptida tunggal yang tersusun atas 282 asam amino dengan ukuran molekul 30 kD (Choi *et al.*, 1996). Komposisi asam aminonya memperlihatkan bahwa lumbrakinase kaya akan asam amino asparagin dan asam aspartat, tetapi miskin akan lisin dan prolin (Mihara *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1993). Selain itu, lumbrakinase tidak mengandung gula (Nakajima *et al.*, 1993).

Bila ditinjau dari sifat kimia sisi aktifnya, lumbrakinase tergolong ke dalam protease serin (EC 3.4.21.99), yang memiliki asam amino serin pada

sisi aktifnya dan memotong ikatan peptida protein secara acak. Stabilitas enzim terhadap pH pada uji fibrinolitik menunjukkan bahwa enzim relatif stabil pada kisaran pH luas, yaitu 3–10 (Mihara *et al.*, 1991), pH 1–11 (Nakajima *et al.*, 1993), pH 2–11 (Park *et al.*, 1998), dan pH 2–12 (Yanti, 2003). Nilai pH isoelektrik (pI) dari protease kasar *L. rubellus* dilaporkan sebesar 3.52–4.12 (Mihara *et al.*, 1991) dan 3.40–4.85 (Nakajima *et al.*, 1993).

Kestabilan enzim terhadap suhu dipengaruhi oleh interaksi nonkovalen, pH, kekuatan ion medium, dan molekul efektor (ion logam). Uji fibrinolitik dengan metode *plating fibrin* menunjukkan protease tersebut relatif stabil hingga suhu 60°C (Mihara *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1993) dan suhu 65°C (Park *et al.*, 1998). Menurut Yanti (2003), protease *L. rubellus* relatif termostabil pada suhu 55°C hingga inkubasi 60 menit. Menurut Mihara *et al.* (1991), suhu optimum enzim fibrinolitik dari ekstrak cacing tersebut dicapai pada suhu 37°C sedangkan Nakajima *et al.* (1993) dan Yanti (2003) menyatakan suhu optimumnya adalah 60°C. Protease cacing dari tepung *L. rubellus* diketahui cukup stabil (aktivitas relatif >80%) pada penyimpanan suhu ruang hingga lima tahun (Nakajima *et al.*, 2000).

Mihara *et al.* (1991) melaporkan bahwa ekstrak lumbrokinase dari *L. rubellus* dihambat secara spesifik oleh senyawa DFP, LBTI, dan SBTI. Lumbrokinase juga dihambat oleh TLCK, tapi tidak dipengaruhi oleh EDTA dan ϵ -asam amino kaproat. Hal ini membuktikan bahwa enzim tersebut tergolong protease serin serupa tripsin (Park *et al.*, 1998). Selain itu, uji sekuen N-terminal asam amino pada protease cacing tersebut menunjukkan bahwa enzim memiliki similaritas lokal dengan protease serin lainnya seperti plasmin, tripsin, kimotripsin, elastase, dan faktor koagulan IX (Nakajima *et al.*, 1993, 1996). Menurut Yanti (2003), PMSF yang merupakan inhibitor protease serin mampu menghambat aktivitas protease kasar *L. rubellus* hingga kehilangan aktivitas sebesar 75%. Adanya reaksi antara gugus hidroksil dari residu serin pada sisi aktif enzim dengan senyawa PMSF menyebabkan enzim mengalami inaktivasi. Dengan demikian, protease *L. rubellus* digolongkan dalam kelompok protease serin.

Menurut Nakajima *et al.* (1993), protease cacing *L. rubellus* mampu mendigesti berbagai substrat protein, seperti kasein, elastin, hemoglobin, kolagen, albumin, dan keratin, serta mengkatalisis hidrolisis ester, terutama etil asetat dan bioplastik poli (R)3-hidroksibutirat. Yanti (2003) menyatakan bahwa protease tersebut juga mampu menghidrolisis substrat gelatin, protein susu, fibrinogen, dan fibrin. Beberapa hasil penelitian yang berkaitan dengan karakteristik biokimiawi protease kasar dari cacing tanah *L. rubellus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik biokimiawi protease kasar dari cacing tanah *L. rubellus*

Acuan	Mihara <i>et al.</i> (1991)	Nakajima <i>et al.</i> (1993)	Park <i>et al.</i> (1998)	Yanti (2003)
Fraksi lumbrokinase	6 fraksi ^a	6 fraksi ^a	2 fraksi ^a	9 fraksi ^a
Bobot molekul (kD)	23.5–34.2 ^a	24.0–43.0 ^a	34.0 dan 34.2 ^a	17.0–61.0 ^a
pI	3.52–4.12 ^b	3.40–4.85 ^b	–	–
pH optimum	7.4–9.0 ^c	9–11 ^c	–	8.0 ^d
Suhu optimum (°C)	37 ^c	60 ^c	–	60 ^d
Stabilitas enzim (pH, suhu)	3–10, 37–60°C ^c	1–11, 60°C ^c	2–11, 65°C ^c	2–12, 55°C ^{d,e}
Inhibitor	DFP, SBTI, LBTI ^c	DFP, SBTI, aprotinin ^c	TLCK ^c	PMSF ^{d,e}
Jenis enzim	Protease serin	Protease tripsin	Protease tripsin	Protease serin
Spesifisitas substrat	–	Kasein, elastin, kolagen, albumin, keratin, dan hemoglobin	–	Kasein, albumin, protein susu, gelatin, fibrinogen, fibrin ^{a,d}

Keterangan: ^a analisis SDS-PAGE, ^b analisis *isoelectric focusing*, ^c analisis aktivitas fibrinolitik dengan metode *plating fibrin* (dengan/tanpa plasminogen), ^d spektrofotometri, ^e hasil zimogram kasein, DFP: diisopropil fluorofosfat, SBTI: *soybean trypsin inhibitor*, LBTI: *lima bean trypsin inhibitor*, TLCK: Na-p-tosil-L-lisin klorometilketon, PMSF: fenilmetilsulfonilfluorida.

2. Potensi Lumbrokinase sebagai Enzim Trombolitik Dibandingkan Enzim-Enzim Sejenis Lainnya

Aplikasi protease cacing sebagai obat trombolitik sudah banyak diteliti. Obat trombolitik berperan untuk melarutkan trombus dengan cara mengubah plasminogen menjadi plasmin, suatu protease serin yang menghidrolisis fibrin dan melarutkan bekuan (Mycek *et al.*, 2001). Fibrin merupakan zat pengikat dari bekuan darah (trombin). Aplikasi obat trombolitik ditujukan untuk pencegahan penyakit-penyakit trombosis. Secara umum obat trombolitik dibedakan atas dua kelompok, yaitu fibrinolisin (elase) dan zat aktivator plasminogen/ZAP (Tjay dan Rahardja, 2002). Umumnya ZAP berupa enzim yang berdaya fibrinolitik. Plasminogen sendiri dapat diaktifkan secara endogen oleh aktivator plasminogen-jaringan (t-PA), suatu protease serin yang berasal dari sel melanoma manusia. Enzim ini akan mengaktifkan plasminogen yang terikat pada fibrin dan membatasi fibrinolisis pada thrombus yang terbentuk saja (Mycek *et al.*, 2001).

Enzim-enzim fibrinolitik yang tersedia pada saat ini adalah protease serin yang bekerja dengan mengubah plasminogen menjadi senyawa fibrinolitik alami yaitu plasmin. Plasmin menghancurkan bekuan darah (clot) dengan memecah fibrinogen dan fibrin yang terdapat pada bekuan tersebut. Aktivator plasminogen serupa urokinase diproduksi di sel-sel ginjal (renal). Senyawa ini bersirkulasi di dalam darah dan diekskresikan dalam urin. Kemampuan senyawa ini untuk mengkatalisis konversi plasminogen menjadi plasmin hanya sedikit dipengaruhi oleh ada tidaknya bekuan darah (clot). Aktivator plasminogen jaringan (t-PA = tissue-type plasminogen activator) kebanyakan ditemukan pada sel-sel endotelium vaskular. Aktivitas senyawa ini meningkat dengan adanya fibrin. Senyawa ini telah dinyatakan spesifik terhadap bekuan darah (clot), walaupun pada kenyataannya aktivitas senyawa ini dalam sirkulasi darah secara umum mendekati urokinase (Feied dan Handler, 2002).

Beberapa enzim trombolitik komersial telah beredar di pasaran dengan kelebihan dan kekurangan masing-masing. Perbandingan antara beberapa enzim trombolitik komersial diberikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan beberapa enzim trombolitik komersial

Acuan	Reteplase (retavase)	Alteplase (aktivase)	Urokinase (abbo-kinase)	Streptokinase
Sumber/teknik pembuatan komersial	<i>Escherichia coli</i> dengan teknik rekombinan DNA	Teknik rekombinan DNA	Purifikasi urin manusia; kultur jaringan	Streptokoki β -hemolitik
Cara pemberian	Intravena	Intravena	Intravena	Intravena
Aplikasi	Penderita MI akut, PE, DVT, penyumbatan kateter, penyakit arteri perifer	Penderita MI akut, PE, DVT, penyumbatan kateter, stroke akut, penyakit arteri perifer	Penderita MI akut, PE, DVT, penyumbatan kateter, penyakit arteri perifer	Penderita MI akut, PE, DVT, penyumbatan kateter, penyakit arteri perifer
Mekanisme secara umum	Berdifusi ke dalam bekuan darah (clot) Mengikat fibrin tidak sekuat t-PA alami	Identik dengan t-PA alami Hanya efektif pada permukaan gumpalan fibrin	Memecah plasminogen secara langsung untuk memproduksi plasmin	Membentuk kompleks dengan plasminogen atau plasmin bebas untuk mengubah lebih banyak plasminogen menjadi plasmin
Waktu paruh	11-19 menit	Tidak ada data	15 menit	80 menit
Ada tidaknya efek samping	Tidak antigenik; hampir tidak pernah diasosiasikan dengan alergi; resiko pendarahan lebih kecil dibandingkan alteplase	Tidak antigenik; hampir tidak pernah diasosiasikan dengan alergi; resiko pendarahan sistemik yang besar	Reaksi alergi jarang terjadi; dapat diberikan berulang tanpa masalah antigenik	Sangat antigenik; timbul demam; masalah alergi; peningkatan antibodi antistreptokoki

Sumber: Feied dan Handler (2002)

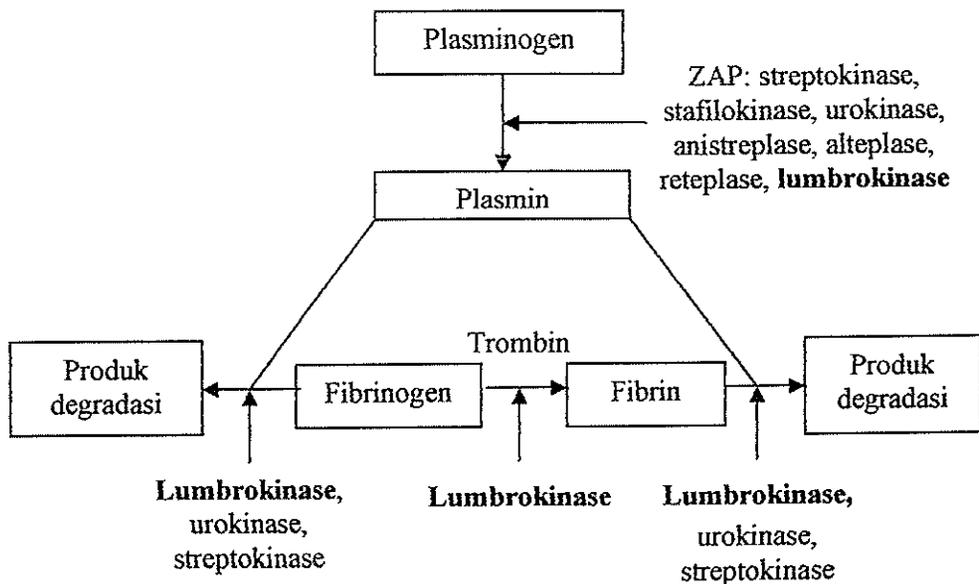
Keterangan: MI: *myocardial infarction*, PE: *pulmonary embolism*, DVT: *deep vein thrombosis*, t-PA: *tissue-type plasminogen activator*

Keunggulan utama lumbrokinase dibandingkan enzim-enzim trombolitik komersial lainnya (reteplase, alteplase, urokinase, dan streptokinase) adalah dosisnya diberikan secara administrasi oral, sedangkan enzim-enzim tersebut harus diberikan secara injeksi intravena. Selain itu lumbrokinase dinyatakan bersifat aman, tidak menimbulkan alergi, tidak toksik, dan tidak menimbulkan efek samping terhadap fungsi jantung, hati, ginjal, sistem respirasi, dan sistem saraf (Mihara *et al.*, 1991). Lumbrokinase juga memiliki tiga mekanisme trombolitik yang bekerja secara simultan, sedangkan enzim-enzim trombolitik komersial umumnya hanya memiliki mekanisme tunggal.

Beberapa enzim trombolitik alami selain lumbrokinase dari cacing tanah telah diteliti dari bisa ular (venom), empedu ular dan saliva kelelawar vampir. Enzim trombolitik dari bisa ular memiliki beberapa nama tergantung dari sumbernya, seperti fibrolase dari ular kepala tembaga *Agkistrodon contortrix contortrix* dan atroxase dari ular derik *Crotalus atrox*. Fibrolase menunjukkan aktivitas fibrinolitik secara langsung tanpa aktivasi plasminogen (Jones *et al.*, 2001). Atoxase dapat melarutkan fibrin terutama dengan menghidrolisis polimer alfa, serta rantai alfa dan beta yang tidak terpolimerisasi. Atoxase juga memotong rantai alfa A pada fibrinogen diikuti dengan rantai beta B, dan tidak menunjukkan efek pada rantai gamma (Tu *et al.*, 1996). Protease fibrinolitik dari empedu ular *A. halys* hanya bekerja spesifik pada substrat fibrinogen dan fibrin (Yanti, 2003). Liberatore *et al.* (2003) menemukan bahwa desmoteplase dari kelelawar vampir *Desmodus rotundus* merupakan aktivator plasminogen yang efektif, yang hampir tidak aktif tanpa keberadaan kofaktor fibrin. Berbeda dari t-PA enzim ini tidak menimbulkan degenerasi sel saraf. Penelitian menunjukkan bahwa t-PA dapat meningkatkan neurotoksisitas yang diinduksi oleh hemoglobin secara signifikan pada kultur sel saraf tikus.

Selain dari hewan, enzim trombolitik alami juga dapat diperoleh dari tumbuhan seperti nenas atau produk fermentasi seperti *natto* dan *shiokara* (Jepang), *chungkook-jang* (Korea), dan *douchi* (Cina). Menurut De-Giuli dan Pirota (1978), aktivitas fibrinolitik bromelin dari nenas mampu

meningkatkan konversi plasminogen menjadi plasmin yang akan mendegradasi fibrin. Berbeda dengan bromelin, nattokinase yang dihasilkan oleh *Bacillus natto* pada *natto* dapat melisis fibrin secara langsung, mengubah prourokinase menjadi urokinase, dan meningkatkan t-PA (Milner dan Makise, 2002). Karakterisasi dan purifikasi enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 pada *douchi* telah dilakukan oleh Peng *et al.* (2002). Enzim ini sangat stabil pada pH 6.0–10.0 pada suhu 37°C selama 60 menit. Kim *et al.* (1996) melakukan purifikasi dan karakterisasi enzim fibrinolitik yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. strain CK 11-4 pada *chungkook-jang*. Enzim ini memiliki berat molekul 28 200 Da, dengan pH dan suhu optimum berturut-turut 10.5 dan 70°C.



Gambar 2. Mekanisme kerja lumbrokinase sebagai obat trombolitik (Yanti, 2003)

Lumbrokinase dari cacing *L. rubellus* menunjukkan potensinya sebagai alternatif obat trombolitik baru. Lumbrokinase memiliki aktivitas fibrinolitik seperti aktivitas serupa tripsin dengan memotong rantai- β fibrinogen. Laju pemotongan rantai- γ fibrinogen oleh lumbrokinase lebih lambat dibandingkan laju pemotongan rantai- β (Hwang *et al.*, 2002). Gambar 2 menggambarkan mekanisme kerja lumbrokinase, yaitu menstimulasi

plasminogen menjadi plasmin, menghidrolisis fibrin hingga larut, dan mendegradasi fibrinogen.

Nakajima *et al.* (1996) melakukan uji SDS-PAGE terhadap digesti fibrinogen dan fibrin pada konsentrasi 2% b/v oleh enzim lumbrokinase dan plasmin pada suhu 37°C selama 0–360 menit. Ternyata lumbrokinase mampu menghidrolisis kedua substrat lebih cepat daripada plasmin (kontrol) pada kondisi aktivitas dan waktu sama. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yanti (2003) terhadap digesti fibrinogen oleh protease *L. rubellus* secara *in vitro* dengan SDS-PAGE 12%, protease tersebut memiliki aktivitas fibrinolitik yang potensial dalam menghidrolisis substrat fibrinogen pada suhu 37°C dan 60°C. Hal tersebut ditandai dengan terdegradasinya pita fibrinogen berukuran besar menjadi produk-produk degradasi fibrinogen atau fibrinopeptida yang berbobot molekul lebih rendah. Hwang *et al.* (2002) juga menyatakan bahwa lumbrokinase memiliki efek antitrombosis yang potensial dalam prostesis vaskular berdiameter kecil.

Ryu *et al.* (1995) melaporkan bahwa lumbrokinase memiliki aktivitas fibrinolitik pada fibrinogen dan fibrin, namun enzim ini tidak menghidrolisis protein-protein plasma lain termasuk plasminogen dan albumin. Uji *in vitro* aktivitas fibrinolitik dari lumbrokinase cair maupun amobil (Mihara *et al.*, 1991; Ryu *et al.*, 1994, 1995; Park *et al.*, 1999) memperlihatkan bahwa enzim tersebut mampu mendigesti fibrin dengan atau tanpa plasminogen sehingga dapat berpotensi sebagai ZAP dan digesti langsung. Penelitian selanjutnya, uji *in vivo* lumbrokinase pada hewan laboratorium (tikus, kelinci) menunjukkan bahwa enzim tersebut mampu menghambat pembekuan darah, dengan cara memacu plasminogen dalam sel-sel pembuluh darah sehingga aktivitas penguraian darah meningkat (Kim *et al.*, 1993, 1998; Fan *et al.*, 2001).

Administrasi enzim secara oral seringkali menimbulkan keraguan terhadap mekanisme penyerapan enzim itu sendiri di dalam usus. Namun lumbrokinase mampu bertahan terhadap pH lambung dan masih dapat diserap di usus halus. Fan *et al.* (2001) telah melakukan studi terhadap EFE-III-I (earthworm fibrinolytic enzyme III-1) yang diisolasi dari *L. rubellus*. Hasil

uji imunologi menunjukkan bahwa 10–15% EFE-III-1 diabsorpsi secara utuh oleh sel-sel epitelium intestinal. Selain itu, EFE-III-1 utuh yang bersifat imunoreaktif juga ditemukan pada serum atau plasma setelah injeksi intraperitoneal pada tikus. Kira-kira 10% dari enzim tersebut dapat ditranspor secara utuh melalui epitelium intestinal. Aktivitas maksimum yang tersisa di dalam darah dapat dianalisis sekitar 60 menit setelah injeksi intraperitoneal (Fan *et al.*, 2001).

D. *Macaca fascicularis* SEBAGAI HEWAN PERCOBAAN

Hewan primata telah banyak digunakan dalam berbagai penelitian biomedis maupun tingkah laku, dimana kemiripan hewan ini dengan manusia menjadikannya hewan penelitian yang berharga (Fortman *et al.*, 2002). Hewan ini merupakan salah satu satwa primata yang mempunyai kemiripan dengan manusia, baik dalam anatomi, fisiologis maupun patologis (Ismanto, 1999). Pada dasarnya primata bukan hewan yang jinak sekalipun telah banyak dikembangbiakkan secara khusus. Pemahaman akan lingkungan alami asal primata ini, pengaruh lingkungan terhadap perkembangannya, dan bagaimana perkembangan ini mempengaruhi tingkah lakunya di dalam laboratorium sangat penting (Fortman *et al.*, 2002). Salah satu jenis monyet yang telah banyak digunakan dalam penelitian adalah monyet ekor panjang *Macaca fascicularis*. Hewan primata ini memiliki kesamaan genom dengan manusia kira-kira sebesar 90%. Distribusi, karakteristik seluler, dan tingkat lesi monyet ini sangat mirip dengan pola yang diamati pada manusia (Williams dan Suparto, 2004).

Macaca fascicularis termasuk ke dalam monyet Dunia Lama, yang memiliki ciri umum berbadan besar, omnivora, dan terestrial (Fortman *et al.*, 2002). Monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut (Ismanto, 1999):

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Primata
Subordo	: Anthropoidae

Famili	: Cercopithecidae
Subfamili	: Cercopithecinae
Genus	: <i>Macaca</i>
Spesies	: <i>Macaca fascicularis</i>

Ada beberapa ciri fisik *Macaca fascicularis* yang khas. Rambut spesies ini cenderung berwarna coklat keabu-abuan hingga coklat kemerahan dan selalu lebih pucat pada bagian punggung. Muka monyet spesies ini berwarna abu-abu kecoklatan dengan jambang pada bagian pipi. Hidung spesies ini datar serta lubang hidungnya sempit dan berdekatan (Bonadio, 2000). Pada pipi dan sekeliling wajah terdapat rambut lebat dan lebih panjang daripada bagian lain. Panjang tubuh spesies ini berkisar antara 40–47 cm (tidak termasuk ekor). Monyet ini memiliki ekor yang berwarna coklat keabu-abuan atau kemerahan dengan panjang 50–60 cm. Bagian ekor *Macaca fascicularis* tertutup oleh rambut yang pendek, halus, dan bentuk ekornya seperti silinder dan berotot (Astuti, 2000). Berat tubuh monyet jantan berkisar antara 4.8–7 kg, sedangkan berat monyet betina 3–4 kg atau kira-kira 69% berat rata-rata monyet jantan (Bonadio, 2000), sedangkan menurut Fortman *et al.* (2002) berat tubuh *Macaca fascicularis* jantan 4–8 kg dan betina 2–6 kg.

Penentuan umur monyet selain memperhatikan kedewasaan kelaminnya dapat juga melalui pertumbuhan giginya (Astuti, 2000). Monyet dewasa mempunyai gigi sebanyak 32 buah dengan susunan gigi sebagai berikut:

$$\text{ICPM} = \frac{2123}{2123} \times 2$$

Keterangan:

I (Incisivus) : gigi seri

C (Canine) : gigi taring

P (Premolar) : gigi geraham depan

M (Molar) : gigi geraham belakang

Penentuan jenis dan kebutuhan nutrisi pada satwa primata yang ideal didasarkan pada umur, jenis kelamin, berat badan, status reproduksi, dan periode kematangan seksualnya. Hewan primata dapat tumbuh baik dengan makanan yang berprotein tinggi dan memerlukan makanan yang banyak mengandung

vitamin, terutama vitamin B-kompleks. Monyet yang dikandangkan dapat diberikan makanan dalam bentuk pelet yang mengandung protein kasar (24.0%), lemak (7.5%), dan serat kasar (2.5%). Pakan tambahan untuk satwa primata dapat diberikan untuk melengkapi gizi (Astuti, 2000). Kebutuhan zat makanan monyet secara umum dapat dilihat pada Tabel 4. Kebutuhan nutrisi Rhesus (Tabel 5) memberikan komposisi vitamin dengan lengkap yang sesuai untuk *Macaca fascicularis*.

Tabel 4. Kebutuhan zat makanan monyet

Zat makanan	Kadar (%)
Karbohidrat	45–55
Protein kasar	15–20
Lemak kasar	3–5
Serat kasar	2.5–5.5
Kalsium	0.86
Fosfor	0.47

Sumber: Ismanto (1999)

Tabel 5. Kebutuhan nutrisi Rhesus

Unsur Nutrisi	Kebutuhan per kg Berat Badan
Energi (kal)	70
Protein (g)	3
Asam linoleat (g)	0.25
Kalsium (g)	0.150
Magnesium (g)	0.040
Vitamin A (IU)	400
Vitamin D (IU)	25
Vitamin E (mg/g asam lemak tak jenuh)	0.33–0.83
Vitamin K (µg)	0.1
Asam askorbat (mg)	25
Biotin (mg)	0.01
Asam folat (mg)	0.040
Niasin (mg)	2.0
Riboflavin (mg)	0.03
Thiamin (mg)	0.33
Vitamin B2 (mg)	0.05–0.50
Vitamin B12 (mg)	0.070

Sumber: Astuti (2000)

Macaca fascicularis di unit karantina PSSP-LPPM IPB diberi pakan berupa pakan olahan, yaitu *monkey chow* impor dari Bangkok dan *monkey chow* lokal yang dibuat sendiri oleh PSSP LPPM-IPB. Selain itu pakan tambahan yang

diberikan adalah pisang dan jambu, tergantung dari persediaan. Ada beberapa jenis pisang yang diberikan, misalnya pisang siam, pisang uli, pisang nangka, dan pisang raja. Pisang siam tampaknya paling baik dibandingkan pisang-pisang lainnya karena tidak menyebabkan feses menjadi cair. Jambu yang sering diberikan adalah jambu klutuk yang mengandung banyak vitamin C.

Penggunaan *Macaca fascicularis* sebagai hewan percobaan dalam uji-uji klinis secara *in vivo* seringkali berkaitan erat dengan uji parameter-parameter darah. Pembedahan (anestesi) sangat diperlukan sebelum pengambilan darah dilakukan. Pembedahan dapat dilakukan menggunakan ketamin dengan dosis 5–6 mg/kg berat badan (0.25–0.3 mL/5kg berat badan) secara intramuskular. Dosis ketamin dapat diberikan antara 5–25 mg/kg berat badan secara intramuskular. Pada penggunaan ketamin tanpa kombinasi dengan anestesia lain, mata monyet akan tetap terbuka dan akan terdapat rigiditas otot (Fortman *et al.*, 2002). Pada saat pengaruh ketamin mulai hilang, monyet akan tersadar kembali. Efek samping ketamin adalah timbulnya rasa mual dan ingin muntah. Oleh karena itu, pemberian makanan kepada monyet paling cepat dilakukan 3–4 jam setelah pembedahan.

Manajemen pemeliharaan *Macaca fascicularis* di unit karantina PSSP dibantu oleh dokter hewan, paramedis, pegawai kandang, dan satpam. Dokter hewan memiliki tugas untuk melakukan pemeriksaan kesehatan terhadap semua monyet yang berada di PSSP, menentukan pengobatan untuk monyet yang sakit, melakukan operasi, tes tuberkulin, vaksinasi, dan pemeriksaan kebuntingan. Paramedis mempunyai tugas melakukan pemeriksaan kesehatan pada pagi hari dan membantu pemberian obat. Pegawai kandang mempunyai tugas untuk membersihkan kandang dua kali sehari, yaitu pagi dan sore hari, memberikan makanan dan minuman, dan melaporkan kondisi hewan kepada paramedis atau dokter hewan. Satpam bertugas untuk menjaga keamanan dan melaporkan setiap kejadian yang berkaitan dengan monyet, terutama kejadian di malam hari kepada dokter hewan atau paramedis. Kesehatan pegawai PSSP juga sangat diperhatikan, dengan dilakukannya pemeriksaan kesehatan minimal setahun sekali dan rontgen paru-paru. PSSP juga memberikan vaksin kepada semua pegawainya, seperti vaksin rabies atau hepatitis (Astuti, 2000).

Sistem pengandangan di unit karantina PSSP Darmaga, Bogor menggunakan sistem pengandangan dalam bangunan yang tertutup (indoor enclosures) dengan kandang-kandang individu. Menurut Sajuthi (1991) pada sistem ini satwa primata ditempatkan dalam bangunan yang tertutup. Tipe kandang ini harus dilengkapi dengan sistem sirkulasi udara untuk mengatur suhu dan kelembaban udara serta lampu yang dinyalakan terus-menerus pada siang hari selama 12 jam. Menurut Fortman *et al.* (2002) kandang-kandang individu harus dibangun dari bahan nontoksik, terbuat dari *stainless steel* (tipe 304), tahan lama, tahan terhadap oksidasi dan korosi dari ekskresi hewan serta asam dan desinfektan yang digunakan untuk sanitasi. Untuk monyet ekor panjang dengan bobot 3–10 kg, luas lantai kandang untuk setiap hewan adalah 0.40 m² dengan tinggi kandang 76.2 cm. Suhu dalam kandang tertutup disarankan antara 64–84°F (17.8–28.9°C) dengan kelembaban relatif antara 30–70%.

Pembersihan kandang di unit karantina PSSP dilakukan dengan sistem basah, yaitu dengan cara menyemprotkan air ke kandang individu, tempat minum, dinding dan lantai kandang menuju saluran pembuangan yang mengarah ke *septic tank*. Lantai kandang disikat setiap hari dan diberi desinfektan. Kegiatan ini dilakukan dua kali sehari, yaitu pagi dan sore hari serta dilakukan sebelum pemberian pakan dan sesudah pemberian minum, agar tidak mengganggu waktu makan monyet (Astuti, 2000).

III. METODE PENELITIAN

A. BAHAN DAN ALAT

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah cacing tanah *Lumbricus rubellus*, sirup jeruk (Tropicana Slim[®]), ketamin (Ketamil[®]), *bovine fibrinogen* (Sigma[®]), *bovine thrombin* (Calbiochem[®]), bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0, bufer Tris-HCl 2 M pH 8.8, bufer Tris-HCl 1 M pH 6.8, bufer fosfat 50 mM pH 8.0, lumbrokinase komersial (PLASMIN[™]), akuades, akrilamida, bis-akrilamida, SDS 10% b/v, amonium persulfat (APS) 10% b/v, TEMED, tris, glisin, SDS, gliserol 50% v/v, bromfenol biru 1% b/v, *Coomassie brilliant blue R-250*, metanol, asam asetat glasial, dan Tween 20 2.5% v/v.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah oven vakum, *freezer*, *blender*, neraca analitik, alufo, timbangan badan, *syringe*, tabung darah sitrat dan EDTA (Vacuette[®]), tabung serum (Vacutainer[®]), termos, pengukur kadar trombosit (Automated Hematology Analyzer SF-3000, TOA Med. Elec. Co., Ltd), pengukur waktu protrombin (Simplastin[®] Excel S), pengukur D-dimer (NycoCard[®] D-dimer Single Test), pengukur kadar glukosa dan trigliserida (Accutrend[®]), pengukur kadar trigliserida (DiaLINE Diagnostic Systems[®]), cawan petri, tabung sentrifusi 15 mL dan 50 mL, tabung eppendorf, sentrifusi (Sorvall[®]), lidi, inkubator (Mettler[®]), pipet mikro, tip, *stopwatch*, GelDoc (BioRad[®]), sel elektroforesis (BioRad[®]), *power supply* (BioRad[®]), vorteks, pH-meter (Istek[®]), *magnetic stirrer*, dan spektrofotometer (Optima[®]).

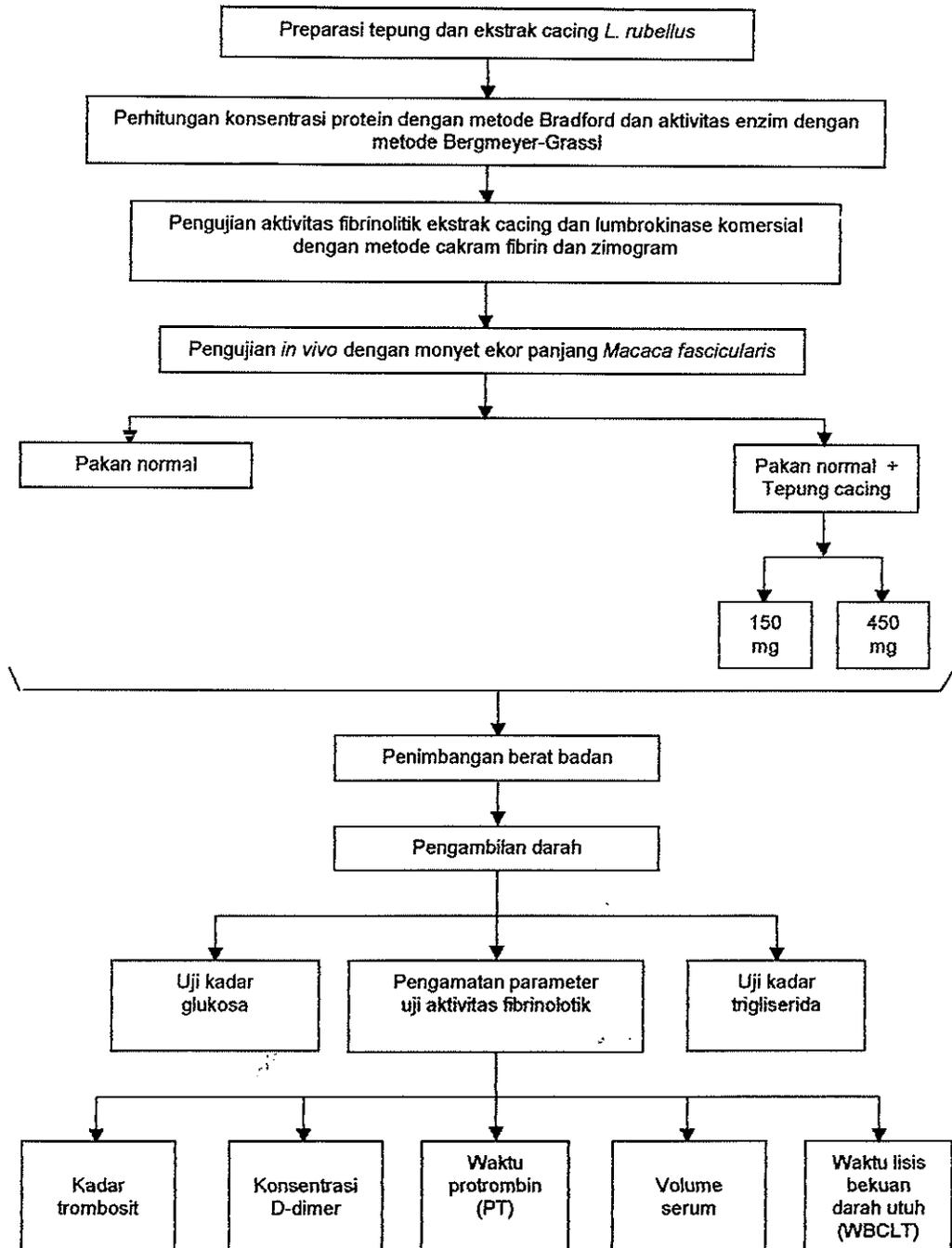
3. Hewan Laboratorium

Hewan laboratorium untuk uji potensi antitrombosis menggunakan monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* berjenis kelamin jantan, dewasa (6–8 tahun), dan kondisi normal/sehat yang diberi pakan *monkey chow*.



B. METODE

Gambar 3 menunjukkan diagram alir uji tepung cacing *Lumbricus rubellus* yang dibagi ke dalam empat tahap utama, yaitu: (1) produksi tepung cacing *L. rubellus*, (2) pengujian aktivitas fibrinolitik dengan zimogram, (3) pengujian aktivitas fibrinolitik dengan metode cakram fibrin, dan (4) pengujian *in vivo* dengan monyet ekor panjang *Macaca fascicularis*.



Gambar 3. Diagram alir uji tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus*

1. Preparasi Tepung dan Ekstrak Cacing *Lumbricus rubellus* (Yanti *et al.* 2003; modifikasi Mihara *et al.*, 1991)

Sebanyak 3 kg cacing *L. rubellus* dibersihkan dengan air mengalir, lalu direndam dalam air beberapa kali untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang melekat. Cacing yang telah bersih ditiriskan menggunakan saringan. Setelah itu, cacing tersebut disebarakan merata dan diusahakan tidak bertumpuk-tumpuk di atas *aluminium foil*, kemudian dibungkus rapi dengan ukuran 31 x 23 cm, lalu dimasukkan ke dalam *freezer* selama 24 jam. Setelah itu, cacing dikeringkan menggunakan oven vakum pada suhu 50°C dan tekanan 300 psi selama 48 jam. Cacing kering dihancurkan dengan *blender* dan disaring dengan alat saringan biasa sehingga diperoleh tepung cacing *L. rubellus*.

Ekstrak cacing dengan konsentrasi 2% b/v dibuat dengan cara melarutkan 0,5 g tepung cacing *L. rubellus* menggunakan 25 mL bufer fosfat 50 mM pH 8.0 ke dalam tabung sentrifusi 50 mL. Setelah itu, tabung disentrifugasi dengan kecepatan 12 074 g selama 30 menit.

2. Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Cakram Fibrin (Modifikasi Astrup dan Mullertz, 1952)

Sebanyak 100 µL larutan trombin (*bovine thrombin* 50 NIH dalam bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0) dipipet ke dalam cawan petri yang berisi 15 ml larutan fibrinogen bebas plasminogen (*bovine fibrinogen* 0,5% dalam bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0). Setelah itu didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang sampai terbentuk lapisan benang-benang fibrin.

Sebanyak 5 µL ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial, masing-masing dengan konsentrasi 2% b/v dalam bufer fosfat 50 mM pH 8.0, dipipet ke dalam cawan petri berisi lapisan fibrin yang telah mengeras. Setelah itu, cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pengamatan setiap interval 1, 3, 6, dan 24 jam. Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya area/zona bening.

3. Uji Aktivitas Fibrinolitik dengan Zimogram

Cetakan gel berupa dua lempeng kaca berukuran 7.25 x 10.25 cm dihimpitkan, diberi karet penahan, kemudian dijepit pada semua sisinya kecuali sisi bagian atas. Komposisi gel diberikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Komposisi gel elektroforesis zimogram 12% dengan substrat fibrinogen

Pereaksi	Gel Pemisah (μL)	Gel Penahan (μL)
Larutan A	2 000	670
Larutan B	1 250	--
<i>Bovine fibrinogen</i> 0.1% b/v	1 000	--
<i>Bovine thrombin</i> 10 NIH	100	
Larutan C	--	1 250
Akuades	650	3 000
Amonium persulfat 10% b/v	100	50
TEMED	10	5

Setelah itu sebanyak 10 μL ekstrak cacing dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V, 400 mA selama 150 menit. Setelah proses elektroforesis, gel yang berisi sampel enzim direnaturasi dalam larutan Tween 2.5% v/v sambil digoyang selama satu jam. Setelah itu, gel tersebut dibilas dengan akuades dan dilanjutkan dengan proses digesti dalam bufer fosfat 50 mM pH 8.0 pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan larutan pewarna selama 10 menit dan dilunturkan dengan larutan peluntur berulang kali hingga didapatkan pita enzim fibrinolitik berwarna putih dengan latar gel berwarna biru.

4. Perhitungan Konsentrasi Protein (Metode Bradford)

Larutan stok BSA (Bovine Serum Albumin) dibuat dengan konsentrasi 1 mg/mL, kemudian diencerkan sebagai berikut:

Tabel 7. Pengenceran larutan stok BSA 1 mg/mL

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Volume BSA 1 mg/mL (mL)	Volume akuades (mL)
0.8	2.0	0.5
0.6	1.5	1.0
0.4	1.0	1.5
0.2	0.5	2.0
0.1	0.25	2.25

Setelah itu sebanyak 9 tabung reaksi dipersiapkan dan diisi dengan larutan BSA (tabung 1–6), sampel enzim (tabung 7–8), dan akuades (tabung 9) sebagai berikut:

Tabel 8. Komposisi larutan protein dan pereaksi Bradford

Tabung	Volume protein (mL)	Volume pereaksi Bradford (mL)
1	1.0 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
2	0.8 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
3	0.6 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
4	0.4 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
5	0.2 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
6	0.1 mg/mL: 0.1 mL	2 mL
7	Ekstrak cacing <i>L. rubellus</i> 2% : 0.1 mL	2 mL
8	Lumbrokinase komersial 2%: 0.1 mL	2 mL
9	Akuades: 0.1 mL	2 mL

Masing-masing tabung divorteks lalu didiamkan sekitar 5 menit. Setelah itu larutan pada masing-masing tabung-tabung diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar BSA dibuat dengan nilai absorbansi sebagai ordinat (sumbu-Y) dan konsentrasi protein sebagai absis (sumbu-X), kemudian konsentrasi protein dalam masing-masing sampel dihitung (mg/mL).

5. Perhitungan Aktivitas Enzim dengan Metode Bergmeyer dan Grassl (Modifikasi Yanti, 2003)

Satu unit aktivitas sampel enzim dihitung dengan persamaan berikut:

$$UA = \frac{A_{sp} - A_{bl}}{A_{st} - A_{bl}} \times P \times \frac{1}{T}$$

Keterangan:

UA = jumlah tirosin yang dihasilkan per mL enzim per menit

A_{sp} = nilai absorbansi sampel

A_{bl} = nilai absorbansi blanko

A_{st} = nilai absorbansi standar

P = faktor pengenceran

T = waktu inkubasi

Setiap sampel yang dianalisis harus disertai dengan blanko dan standar dengan perincian sebagai berikut:

Tabel 9. Komposisi pereaksi dalam analisis aktivitas protease menurut Bergmeyer dan Grassl (modifikasi Yanti, 2003)

Pereaksi	Sampel	Blanko	Standar
Bufer universal	250	250	250
Kasein 2% b/v	250	250	250
Tirosin standar	--	--	50
Akuades	--	50	--
Enzim	50	--	--
Inkubasi selama 10 menit pada 50°C			
Asam trikloroasetat (TCA)	500	500	500
Akuades	50	--	--
Enzim	--	50	50
Didiamkan selama 10 menit pada 37°C			
Dilanjutkan dengan sentrifusi pada 13 684 g selama 10 menit			
Supernatan	375	375	375
Na ₂ CO ₃	1250	1250	1250
Pereaksi Folin (1:2)	250	250	250
Didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C			
Dilakukan pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 578 nm			

6. Pemberian Sirup dan Tepung Cacing *Lumbricus rubellus* pada Monyet Ekor Panjang *Macaca fascicularis*

Cacing *L. rubellus* diberikan pada monyet ekor panjang dalam bentuk tepung yang disuspensikan menggunakan sirup bebas glukosa dengan dosis tertentu, dengan cara administrasi oral melalui pencekokan menggunakan *syringe* tanpa jarum. Sirup yang akan digunakan diencerkan terlebih dulu dengan akuades dengan perbandingan 1:3. Monyet ekor panjang yang digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu: (1) kelompok C: setiap monyet diberi 5 mL sirup saja, (2) kelompok L: setiap monyet diberi 150 mg tepung cacing dalam 5 mL sirup, yang ekuivalen dengan dosis standar untuk orang dewasa, dan (3) kelompok H: setiap monyet diberi 450 mg tepung cacing dalam 5 mL sirup, yang ekuivalen dengan tiga kali dosis pada kelompok L.

7. Seleksi Monyet Ekor Panjang *Macaca fascicularis*

Monyet-monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari koleksi unit karantina Pusat Studi Satwa Primata Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat IPB (PSSP LPPM-IPB), Darmaga, Bogor. Sebelum monyet-monyet tersebut dapat digunakan, terlebih dahulu harus mendapat persetujuan dari Tim Komisi dan Kepala PSSP LPPM-IPB setelah menjawab berbagai pertanyaan yang tercantum dalam ACUC (Animal Care Use Committee). Seleksi monyet ekor panjang yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 30 ekor monyet berjenis kelamin jantan dengan masa adaptasi selama tujuh hari. Monyet-monyet tersebut berumur antara enam sampai delapan tahun. Sebanyak enam ekor monyet diantaranya hanya digunakan untuk melihat respon monyet secara umum terhadap tepung cacing itu sendiri dan tidak digunakan dalam penelitian. Setelah masa adaptasi berakhir, dari 24 ekor monyet yang tersisa dipilih sebanyak 15 ekor yang memiliki kesukaan terhadap sirup untuk digunakan dalam penelitian. Monyet-monyet tersebut dibagi ke dalam tiga kelompok seperti pada Prosedur 6, dimana setiap kelompok terdiri dari lima ekor monyet.

8. Uji Aktivitas Fibrinolitik, Uji Glukosa, dan Uji Trigliserida pada Monyet Ekor Panjang *Macaca fascicularis*

Uji *in vivo* tepung cacing *L. rubellus* dilakukan pada tiga kelompok hewan laboratorium yang diberi formulasi pakan yang berbeda (Prosedur 4). Setiap sebelum pengambilan darah dilakukan, berat badan monyet ekor panjang ditimbang. Setelah itu dilakukan uji kadar glukosa dan trigliserida, serta pengamatan parameter uji aktivitas fibrinolitik. Parameter analisis yang dilakukan meliputi perhitungan jumlah trombosit, konsentrasi D-dimer, waktu protrombin (PT= *Prothrombin Time*), volume serum hasil retraksi bekuan, dan waktu lisis bekuan darah utuh (WBCLT= *Whole Blood Clot Lysis Time*).

a. Pengambilan darah

Monyet dipuaskan terlebih dahulu selama satu malam. Sebelum darah diambil, monyet dibius dengan ketamin dengan dosis 5–6 mg/kg berat badan secara intravena (0.25–0.30 mL/5 kg berat badan IV). Darah monyet diambil dari vena femoralis dengan volume 12–19 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung darah yang sesuai untuk masing-masing uji yang akan dilakukan. Selang waktu setiap pengambilan darah adalah 10 hari.

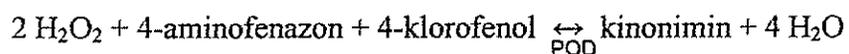
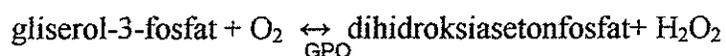
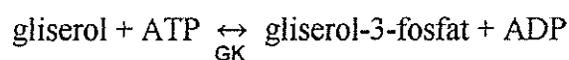
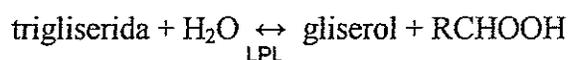
b. Kadar glukosa

Uji ini dilakukan menggunakan sebuah alat komersial Accutrend[®]. Dengan menggunakan strip uji khusus, alat ini dapat mengukur kadar glukosa darah antara 20–600 mg/dL. Jika darah yang diuji memiliki kadar glukosa yang lebih rendah daripada nilai batas bawah kisaran tersebut, alat tersebut akan memberikan hasil “Lo”. Alat ini dapat memberikan hasil kadar glukosa dalam 12 detik.

c. Kadar trigliserida

Uji trigliserida pada pengambilan darah pertama (baseline) menggunakan Accutrend[®], yang dapat mengukur kadar trigliserida darah antara 70–600 mg/dL. Hasil “Lo” akan diperoleh jika kadar trigliserida pada darah yang diuji lebih rendah daripada nilai batas bawah kisaran tersebut. Alat ini memberikan hasil kadar trigliserida dalam 174 detik.

Pada pengambilan darah terakhir, darah dimasukkan ke dalam tabung serum (Vacutainer[®]) 5 mL dan dibawa menggunakan termos yang berisi es batu ke Laboratorium Prodia di Bogor. Uji ini dilakukan dengan alat DiaLINE Diagnostic Systems[®]. Prinsip pengujiannya sebagai berikut:



Analisis dilakukan menggunakan panjang gelombang Hg 546 nm, dengan kuvet setebal 1 cm pada suhu 20–25°C/37°C. Larutan sampel merupakan campuran dari 10 µL serum dan 1000 µL larutan pereaksi, sedangkan larutan blanko adalah larutan pereaksi itu sendiri sebanyak 1000 µL. Campuran tersebut diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20–25°C atau selama 10 menit pada suhu 37°C. Larutan pereaksi yang digunakan mengandung bufer Good 50 mmol/L pH 7.2, 4-klorofenol 4 mmol/L, ATP 2 mmol/L, Mg²⁺ 15 mmol/L, gliserokinase (GPO) ≥0.4 KU/L, peroksidase (POD) ≥2 KU/L, lipoprotein lipase (LPL) ≥2 KU/L, 4-aminofenazon 0.5 mmol/L, dan gliserolkinase (GK) ≥0.5 KU/L. Konsentrasi trigliserida dihitung dengan rumus: $c = 1150 \times \Delta A_{\text{sampel}}$ (mg/dL). Nilai ΔA_{sampel} adalah selisih antara absorbansi sampel dengan absorbansi blanko.

d. Kadar trombosit (Platelet)

Darah yang diambil dari monyet dimasukkan ke dalam tabung EDTA (Vacuette[®]) 3 mL dan dibawa menggunakan termos yang berisi es batu ke Laboratorium Prodia di Bogor. Uji kadar trombosit dilakukan dengan Automated Hematology Analyzer SF-3000 (TOA Med. Elec. Co., Ltd). Di dalam alat tersebut, sampel darah akan melalui dua tahap pengenceran terlebih dahulu. Pengenceran pertama adalah 4.0 mL sampel darah dalam 1.996 mL pengencer (CELLPACK[®]). Pengenceran kedua adalah 40.0 mL larutan dari pengenceran pertama dalam 1.960 mL pengencer. Dua tahap pengenceran tersebut akan menghasilkan sampel darah dengan pengenceran 1 : 25 000. Setelah itu 0.25 mL sampel yang telah diencerkan dimasukkan melalui lubang berdiameter 75 µm. Jumlah platelet dihitung dengan metode hitung langsung dan metode diskriminasi otomatis. Hasil analisis akan ditampilkan pada layar LCD.

e. Retraksi bekuan (Gandasoebrata, 2001)

Sebanyak 5 ml darah dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifusi, lalu didiamkan pada suhu kamar selama 2–3 jam (atau

semalam dalam lemari es). Bekuan darah dilepaskan dengan hati-hati dari dinding tabung dan dipisahkan dari tabung sentrifusi. Volume serum termasuk sel-sel yang masih tertinggal dalam tabung dicatat volumenya sebagai persentase dari volume darah semula. Persentase perubahan volume serum antara pengambilan darah pertama dan terakhir dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Chg} = \frac{VS_t - VS_0}{VS_t} \times 100\%$$

Keterangan:

% Chg = persentase perubahan volume serum

VS_t = volume serum rata-rata pada pengambilan darah final

VS_0 = volume serum rata-rata pada pengambilan darah baseline

f. Waktu lisis bekuan darah utuh (WBCLT = Whole Blood Clot Lysis Time) dengan modifikasi Gandasoebrata (2001)

Bekuan darah yang diperoleh dari uji retraksi bekuan dapat digunakan untuk menguji adanya lisis bekuan yang semakin cepat. Bekuan itu disimpan dalam inkubator bersuhu 37°C dan setelah lewat 24, 48, 72, 96, dan 120 jam diperiksa apakah terjadi lisis, yakni mencairnya bekuan.

g. Waktu protrombin (PT = Prothrombin Time)

Darah yang diambil dari monyet dimasukkan ke dalam tabung sitrat (Vacuette®) 3 mL dan dibawa menggunakan termos yang berisi es batu ke Laboratorium Prodia di Bogor. Uji ini dilakukan dengan menggunakan Simplastin® Excel S yang merupakan pereaksi tromboplastin jaringan dari otak kelinci untuk digunakan dalam uji waktu protrombin (PT = *Prothrombin Time*) secara *in vitro*. Pereaksi Simplastin® Excel S terdiri dari dua komponen utama, yaitu: (1) pereaksi tromboplastin, yang mengandung tromboplastin jaringan dari otak kelinci, ion kalsium, dan bufer, dan (2) pengencer, sebagai zat penstabil

dan pengawet yang terdiri dari 0.05% natrium azida sebagai pengawet. Waktu protrombin ditentukan dengan menggunakan prosedur pengujian seperti di bawah ini.

Sebanyak 0.2 mL pereaksi Simplastin® Excel S dipanaskan hingga bersuhu 37°C. Pereaksi tidak boleh dibiarkan tanpa tutup pada suhu 37°C selama lebih dari 60 menit. Jika hal ini terjadi, pereaksi tersebut harus dibuang. Setelah itu masing-masing tabung uji untuk sampel dan kontrol diberi label. Sebanyak 0.1 mL sampel atau kontrol dipipet ke dalam tabung yang sesuai, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3–10 menit. Setelah itu, sebanyak 0.2 mL pereaksi Simplastin® Excel S di atas ditambahkan ke dalam masing-masing tabung, dan pada saat yang bersamaan waktu pembentukan bekuan mulai dihitung. Waktu yang diperlukan (dalam detik) hingga bekuan terbentuk dicatat.

Nilai waktu protrombin dalam detik dapat dikonversi menjadi INR (International Normalized Ratio) dengan terlebih dahulu menghitung rasio waktu protrombin. Rasio waktu protrombin adalah perbandingan nilai waktu protrombin sampel dengan waktu protrombin rata-rata pada kisaran normal laboratorium, yang dapat dinyatakan dengan rumus:

$$\text{Rasio PT} = \frac{\text{PT sampel}}{\text{Rataan PT normal}}$$

Nilai INR dihitung dengan menggunakan ISI (International Sensitivity Index) sebagai berikut:

$$\text{INR} = (\text{Rasio PT})^{\text{ISI}}$$

Nilai ISI untuk masing-masing lot Simplastin® Excel S ditentukan dengan kalibrasi terhadap *International Reference Preparation* yang tersedia pada tabel nilai INR.

h. D-dimer

Darah yang diambil dari monyet dimasukkan ke dalam tabung sitrat (Vacuette[®]) 3 mL dan dibawa menggunakan termos yang berisi es batu ke Laboratorium Prodia di Bogor. Uji ini dilakukan dengan menggunakan NycoCard[®] D-dimer Single Test, yang merupakan uji *in vitro* untuk menentukan konsentrasi produk degradasi fibrin D-dimer dalam plasma dengan cepat.

NycoCard[®] D-dimer Single Test bekerja berdasarkan prinsip aliran imunometrik (immunometric flow-through). Sampel plasma dimasukkan ke dalam sumur uji alat tersebut. Ketika sampel telah membasahi alat tersebut, molekul-molekul D-dimer diikat oleh sebuah membran yang mengandung antibodi monoklonal spesifik untuk D-dimer. Setelah itu, larutan konjugasi ditambahkan. Larutan ini mengandung antibodi monoklonal spesifik untuk D-dimer yang terkonjugasi partikel-partikel emas yang sangat kecil. Molekul-molekul D-dimer pada membran akan mengikat molekul-molekul dari larutan konjugasi tersebut dalam reaksi menyerupai *sandwich*. Larutan konjugasi yang berlebih dihilangkan dari membran dengan larutan pencuci. Untuk konsentrasi D-dimer di atas 0.1 mg/L pada sampel, membran akan terlihat kemerahan, dimana intensitas warna berbanding lurus dengan konsentrasi D-dimer. Intensitas warna tersebut diukur dengan NycoCard[®] READER II.

Sampel yang digunakan adalah plasma bebas platelet dalam sitrat. Sampel plasma dipersiapkan dengan cara mensentrifugasi sampel darah dalam tabung sitrat dengan kecepatan 2000 g selama 15 menit. Plasma (supernatan) dipindahkan dari bagian atas tabung menggunakan pipet. Plasma tidak boleh dituang untuk menghindari kontaminasi oleh sel-sel darah. Sampel darah harus disentrifugasi dalam waktu 6 jam, lebih baik lagi segera setelah pengambilan sampel darah. Plasma harus diuji dalam waktu 24 jam.

Ada empat tahap utama dalam prosedur pengujian, yaitu: (1) pencucian awal (prewashing) dilakukan dengan memasukkan 50 μ L

larutan pencuci ke dalam alat uji. Membran tidak boleh disentuh dengan pipet. Larutan pencuci dibiarkan untuk membasahi membran tersebut, (2) sebanyak 50 μL plasma bebas platelet atau kontrol (tanpa pengenceran) dimasukkan ke dalam alat uji. Sampel akan diabsorpsi oleh membran dalam waktu kurang dari 50 detik, (3) sebanyak 50 μL larutan konjugasi dimasukkan ke dalam alat uji. Larutan ini akan diserap oleh membran dalam waktu kurang dari 50 detik, dan (4) sebanyak 50 μL larutan pencuci dimasukkan ke dalam alat uji. Setelah itu, NycoCard[®] D-dimer Single Test harus segera diukur dalam waktu 2 menit menggunakan NycoCard[®] READER II. Alat ini dapat mengukur konsentrasi D-dimer dengan kisaran 0.1–20.0 mg/L, dengan interval pengukuran sebesar 0.1 mg/L.

NycoCard[®] READER II merupakan sebuah alat yang terdiri dari kotak instrumen dan pena pembaca. Kisaran suhu yang direkomendasikan pada saat pengukuran adalah 18–25°C. Prinsip kerja alat ini adalah pengukuran intensitas warna yang dihasilkan sampel pada alat NycoCard[®] D-dimer Single Test oleh pemantulan spektrum pada tiga bagian dari spektrum tampak. LED (Light Emitting Diodes) mengiluminasi sampel untuk diukur dengan satu warna setiap waktu. Cahaya yang dipantulkan dari sampel diukur dengan detektor dan dikonversikan menjadi nilai konsentrasi oleh sebuah mikroprosesor.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum uji *in vitro* dan *in vivo* dilakukan, konsentrasi protein dan aktivitas enzim dari sampel tepung cacing dan lumbrokinase komersial dihitung terlebih dahulu. Persamaan kurva standar BSA pada Lampiran 2 ($y = 1.3460x + 0.0761$, $R^2 = 0.9638$) digunakan untuk menghitung konsentrasi protein dari masing-masing sampel. Ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial berturut-turut memiliki konsentrasi protein 1.93 mg/mL dan 0.50 mg/mL. Berdasarkan perhitungan aktivitas enzim (AE), aktivitas enzim pada ekstrak cacing *L. rubellus* sebesar 0.88 UA/mL sedangkan lumbrokinase komersial memiliki aktivitas sebesar 0.99 UA/mL. Aktivitas spesifik (AS) suatu enzim dapat dihitung dengan cara membagi aktivitas enzim dengan konsentrasi protein. Berdasarkan perhitungan, aktivitas spesifik ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial tidak berbeda jauh yaitu berturut-turut sebesar 0.46 UA/mg dan 0.51 UA/mg. Ekstrak cacing *L. rubellus* memiliki nilai aktivitas per gram sampel sebesar 44.21 UA/g. Lumbrokinase komersial memiliki nilai aktivitas enzim per gram sampel yang sedikit lebih tinggi daripada ekstrak cacing *L. rubellus* sebesar 49.29 UA/g. Nilai-nilai konsentrasi protein dan aktivitas enzim pada masing-masing sampel diberikan secara ringkas pada Tabel 10.

Tabel 10. Nilai konsentrasi protein, aktivitas enzim, aktivitas spesifik, dan aktivitas per gram sampel untuk ekstrak cacing *Lumbricus rubellus* dan lumbrokinase komersial

	Satuan	Ekstrak cacing <i>Lumbricus rubellus</i>	Lumbrokinase komersial
Konsentrasi protein (x)	mg/mL	1.93	0.50
Aktivitas enzim (AE)	UA/mL	0.88	0.99
Aktivitas spesifik (AS)	UA/mg	0.46	0.51
Aktivitas enzim per gram sampel	UA/g	44.21	49.29

A. UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK TEPUNG CACING TANAH *Lumbricus rubellus* SECARA *in vitro*

1. Uji Cakram Fibrin (Plating Fibrin)

Uji cakram fibrin (plating fibrin) digunakan untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik suatu enzim selama interval tertentu, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Pada uji ini trombin yang ditambahkan berfungsi untuk mengubah fibrinogen menjadi benang-benang fibrin. Setelah penambahan trombin, larutan fibrinogen yang berwarna bening akan menjadi putih keruh seluruhnya setelah 30 menit. Hal ini menandakan bahwa fibrin telah terbentuk.

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah ekstrak cacing dan presipitat protein *L. rubellus* (presipitasi dengan garam amonium sulfat 65%) serta lumbrokinase komersial, masing-masing sebanyak 5 μL dengan konsentrasi 2%*b/v*. Berdasarkan perhitungan menggunakan Tabel 10, ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial memiliki konsentrasi protein berturut-turut sebesar 9.65 μg dan 2.50 μg , serta aktivitas enzim berturut-turut sebesar 4.44×10^{-3} UA dan 1.28×10^{-3} UA. Presipitat protein *L. rubellus* yang digunakan memiliki aktivitas enzim sebesar 3.20×10^{-2} UA (data tidak dipublikasikan). Pengamatan hanya dilakukan secara kualitatif. Aktivitas fibrinolitik ditandai dengan terbentuknya zona bening (halo) pada cakram fibrin, yang menandakan bahwa sampel enzim telah mencerna fibrin.

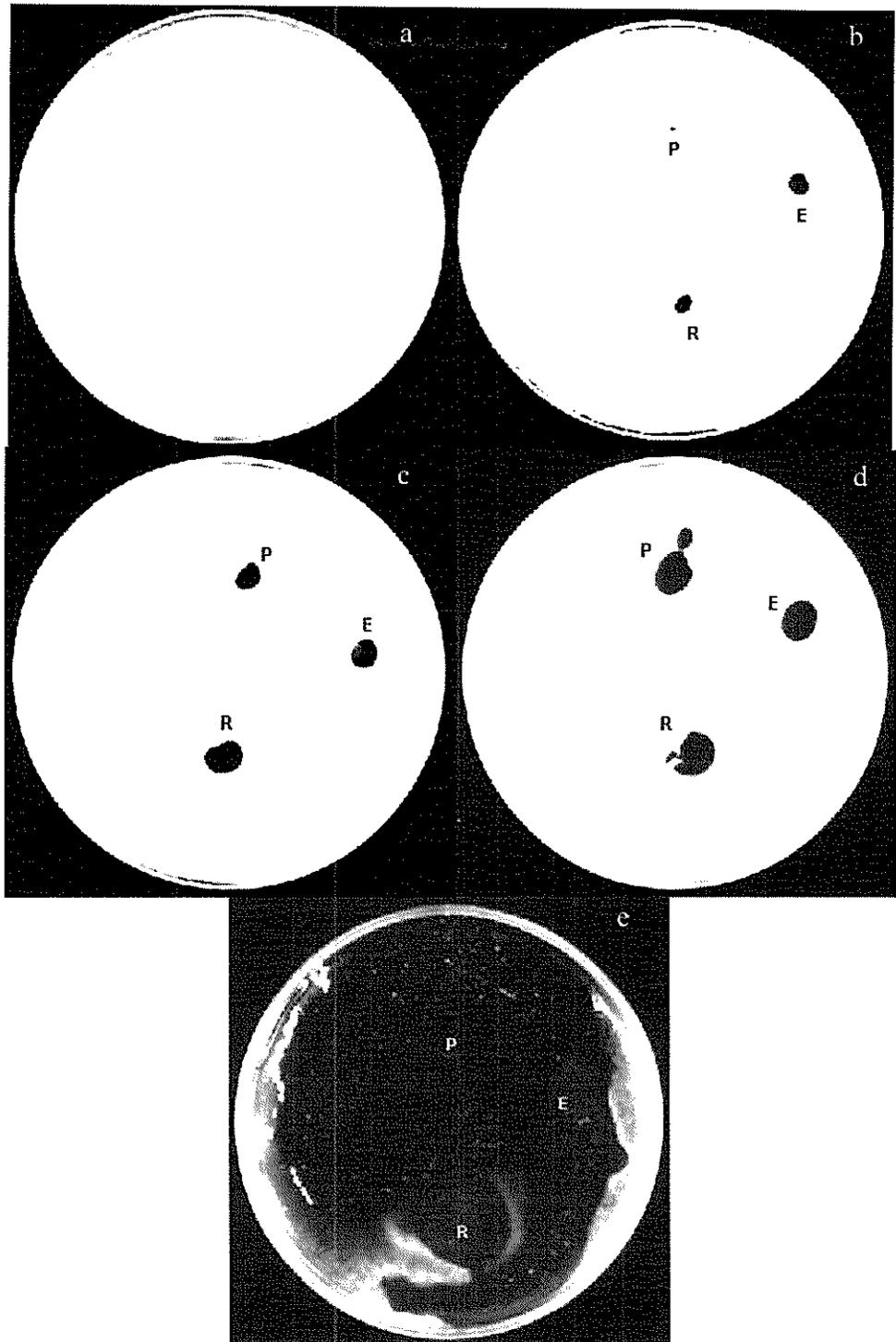
Setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, masing-masing sampel yang digunakan sudah terlihat mampu mencerna fibrin. Lumbrokinase komersial (P) membentuk halo yang paling kecil. Hal ini menunjukkan bahwa setelah 1 jam, lumbrokinase komersial baru mulai aktif untuk mencerna fibrin. Ekstrak cacing (E) dan presipitat protein *L. rubellus* (R) membentuk halo yang lebih besar dibandingkan dengan lumbrokinase komersial. Halo yang dibentuk oleh ekstrak cacing sedikit lebih besar dibandingkan halo yang dibentuk oleh presipitat protein *L. rubellus*. Hal ini menunjukkan bahwa dalam interval 1 jam kedua sampel enzim tersebut mampu mencerna fibrin lebih banyak dan lebih cepat dibandingkan dengan lumbrokinase komersial.

Aktivitas fibrinolitik yang dimiliki masing-masing sampel enzim semakin terlihat setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Lumbrokinase komersial (P) membentuk halo yang jauh lebih besar dibandingkan halo yang terbentuk setelah inkubasi selama 1 jam. Hal ini menunjukkan bahwa laju reaksi lumbrokinase komersial dalam mencerna substrat fibrin meningkat pesat. Ekstrak cacing *L. rubellus* (E) memiliki halo yang kurang lebih sama besar dengan halo yang dibentuk oleh lumbrokinase komersial. Akan tetapi halo yang terbentuk hanya sedikit lebih besar daripada halo yang terbentuk setelah inkubasi selama 1 jam. Halo yang paling besar pada pengamatan kali ini dimiliki oleh presipitat protein *L. rubellus* (R). Halo tersebut berukuran kurang lebih dua kali lebih besar daripada halo yang terbentuk setelah inkubasi selama 1 jam. Hal ini menunjukkan bahwa setelah 3 jam presipitat protein *L. rubellus* mampu mencerna fibrin lebih banyak dibandingkan kedua sampel enzim lainnya.

Jika dibandingkan dengan halo pada pengamatan sebelumnya, ekstrak cacing (E) dan presipitat protein (R) *L. rubellus* serta lumbrokinase komersial (P) membentuk halo dua kali lipat lebih besar pada pengamatan setelah inkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C. Halo yang dibentuk oleh masing-masing sampel enzim terlihat hampir sama besar. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga sampel enzim tersebut masih menunjukkan aktivitas fibrinolitik hingga 6 jam setelah enzim mulai mencerna substrat fibrin, dengan laju reaksi yang hampir sama.

Pengamatan terakhir dilakukan setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37°C. Pengamatan pada cakram fibrin menunjukkan bahwa hampir seluruh fibrin telah dicerna oleh ketiga sampel enzim yang digunakan. Ekstrak cacing *L. rubellus* (E) dan lumbrokinase komersial (P) telah mencerna seluruh fibrin di sekelilingnya. Warna putih di sekeliling kedua sampel enzim tersebut telah berubah menjadi bening sehingga tidak ada lagi halo yang dapat diamati. Halo masih dapat diamati di sekeliling presipitat protein *L. rubellus* (R) walaupun bentuknya tidak terlihat jelas lagi. Hal ini menunjukkan bahwa setelah 24 jam, ketiga sampel enzim tersebut masih memiliki aktivitas fibrinolitik dan mampu mencerna substrat fibrin hampir seluruhnya. Gambar 4 memperlihatkan

cakram fibrin sebelum inkubasi dan setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1, 3, 6, dan 24 jam.



Gambar 4. Cakram fibrin sebelum inkubasi (a) dan setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam (b), 3 jam (c), 6 jam (d), dan 24 jam (e)
Keterangan: E: ekstrak cacing *L. rubellus* 2% b/v, R: presipitat protein *L. rubellus* 2% b/v (presipitasi dengan garam amonium sulfat 65%), P: lumbrokinase komersial 2% b/v

Mihara *et al.* (1991) juga menggunakan metode cakram fibrin untuk mengamati aktivitas fibrinolitik dari cacing *L. rubellus*. Seekor cacing utuh dipotong-potong dan ditempatkan pada cakram fibrin yang kaya akan plasminogen. Aktivitas fibrinolitik diamati pada bagian anterior dari tubuh cacing. Enzim-enzim fibrinolitik tampak disekresikan dari daerah sekitar kerongkongan, tembolok, empedal dan bagian anterior dari usus. Cakram fibrin dengan komposisi yang sama juga digunakan untuk mengukur aktivitas fibrinolitik dari tepung cacing yang telah diliofilisasi, yang dilarutkan dalam larutan salin yang mengandung 0.1% NaN₃ setelah diinkubasi selama 37°C selama beberapa hari. Aktivitas enzim fibrinolitik meningkat pesat selama 10 hari pertama dan terus meningkat secara bertahap hingga dan setelah 75 hari.

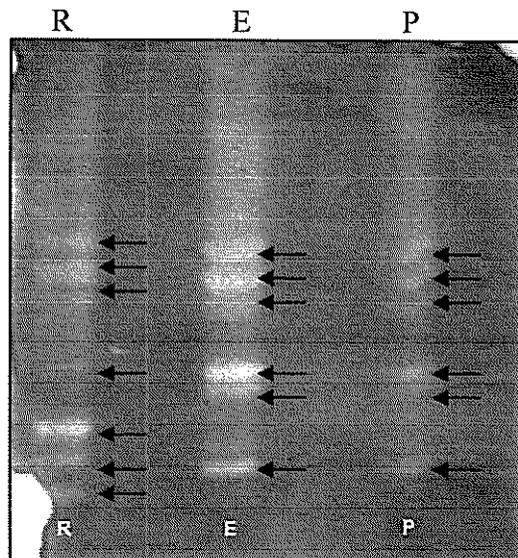
Selain itu, Mihara *et al.* (1991) juga membandingkan aktivitas urokinase dan supernatan cacing *L. rubellus* (konsentrasi 0.1% b/v) yang telah diinkubasi selama 50 hari pada suhu 37°C. Cakram fibrin yang kaya akan plasminogen menunjukkan adanya aktivitas urokinase 10, 100 dan 1 000 IU/mL. Supernatan cacing *L. rubellus* menunjukkan aktivitas fibrinolitik, baik pada cakram fibrin yang kaya akan plasminogen maupun cakram fibrin bebas plasminogen. Berdasarkan area lisis yang terbentuk, supernatan cacing *L. rubellus* tersebut memiliki aktivitas fibrinolitik ekuivalen dengan 8 700 IU/mL jika dibandingkan dengan aktivitas urokinase.

2. Uji Zimogram

Berkaitan dengan aktivitas fibrinolitik ekstrak cacing dan presipitat protein *L. rubellus* serta lumbrokinase komersial, enzim-enzim tersebut diuji secara *in vitro* menggunakan analisis zimogram fibrinogen 12% (Gambar 5). Uji ini bersifat kualitatif karena pengamatan hanya dilakukan terhadap ada tidaknya pita-pita hasil degradasi fibrinogen, tanpa menghitung bobot molekulnya. Fibrinogen merupakan protein larut dalam plasma dengan bobot molekul sekitar 340 kD. Protein ini terdiri dari enam rantai polipeptida yang masing-masing berupa dua rantai A, B, dan C. Fibrinogen yang larut dapat membentuk molekul fibrin yang tak larut melalui polimerisasi monomer

fibrinogen menjadi molekul fibrinogen raksasa yang berbentuk serat/jaring yang tak larut dengan bantuan katalisator trombin (Yanti, 2003).

Sampel yang digunakan pada uji ini sama dengan sampel yang digunakan pada uji cakram fibrin, masing-masing sebanyak 10 μL dengan konsentrasi 2% b/v. Berdasarkan perhitungan dengan menggunakan Tabel 10, ekstrak cacing *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial yang digunakan memiliki konsentrasi protein berturut-turut sebesar 19.30 μg dan 5.00 μg , serta aktivitas enzim berturut-turut sebesar 8.88×10^{-3} UA dan 2.55×10^{-3} UA. Presipitat protein yang digunakan memiliki aktivitas enzim sebesar 6.40×10^{-2} UA (data tidak dipublikasikan).



Gambar 5. Digesti substrat fibrinogen (0.1% b/v) oleh R : presipitat protein *L. rubellus* 2 % b/v (presipitasi dengan garam amonium sulfat 65%); E : ekstrak cacing *L. rubellus* 2% b/v; dan P : lumbrokinase komersial 2% b/v pada analisis zimogram fibrinogen 12%. Tanda panah (\leftarrow) menunjukkan posisi pita hasil degradasi fibrinogen oleh ketiga sampel enzim.

Sebelum tahap digesti, renaturasi ketiga sampel enzim tersebut dilakukan dengan menggunakan Tween 20 2.5% v/v. Proses digesti dilakukan dengan menggunakan bufer fosfat 50 mM pH 8.0 pada suhu 60°C . Menurut Yanti (2003) proses hidrolisis substrat oleh protease *L. rubellus* berlangsung lebih cepat pada kondisi suhu optimum (60°C) daripada suhu tubuh normal (37°C). Digesti fibrinogen oleh ketiga sampel enzim ditandai dengan terbentuknya pita-pita berwarna bening dengan latar belakang berwarna biru.

Pada analisis zimogram ini diperoleh bahwa ekstrak cacing *L. rubellus* (E) dan lumbrokinase komersial (P) masing-masing memiliki 6 pita hasil digesti fibrinogen pada posisi yang sama. Oleh karena itu, lumbrokinase komersial tersebut diperkirakan juga berasal dari cacing *L. rubellus*. Presipitat protein *L. rubellus* menunjukkan hasil yang berbeda. Sampel enzim ini memiliki 7 pita hasil digesti fibrinogen, dimana 4 pita teratas memiliki posisi yang sama seperti kedua sampel enzim lainnya, sedangkan 3 pita lainnya berbeda posisinya. Sebagai perbandingan, berdasarkan analisis zimogram kasein 12% yang dilakukan oleh Yanti (2003), ekstrak protease kasar *L. rubellus* memiliki enam pita enzim proteolitik dengan ukuran bobot molekul 20, 23, 26, 31, 36, dan 41 kD.

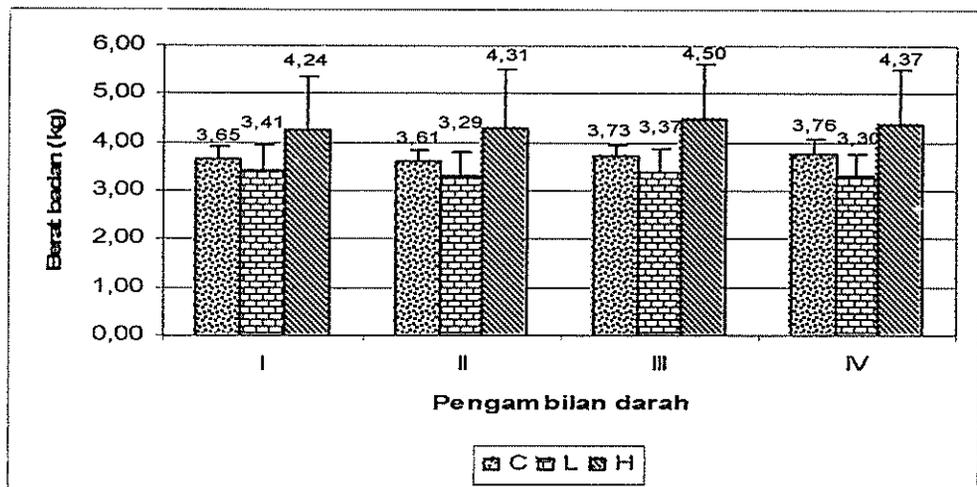
B. EVALUASI PENGARUH TEPUNG CACING TANAH *Lumbricus rubellus* TERHADAP BEBERAPA PARAMETER ATEROSKLEROSIS SECARA *in vivo*

Parameter-parameter aterosklerosis yang digunakan pada uji ini secara umum dapat dibagi menjadi tiga, yaitu: (1) parameter fibrinolitik, (2) kadar glukosa, dan (3) kadar trigliserida. Parameter-parameter fibrinolitik yang diukur meliputi kadar trombosit, konsentrasi D-dimer, waktu protrombin, retraksi bekuan, dan waktu lisis bekuan darah utuh. Parameter-parameter di atas diukur dengan metode yang sesuai, dengan menggunakan sampel darah monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* normal/sehat. Data hasil pengukuran diberikan secara lengkap pada Lampiran 3. Dosis tepung cacing yang diberikan kepada kelompok L dan H berturut-turut sebesar 150 mg dan 450 mg. Dengan menggunakan Tabel 10, aktivitas enzim pada masing-masing dosis tersebut dapat dihitung. Tepung cacing *L. rubellus* yang diberikan kepada kelompok L dan H berturut-turut memiliki aktivitas enzim sebesar 69 UA dan 207 UA.

1. Perubahan Berat Badan

Sebelum pengambilan darah dilakukan, berat badan setiap monyet ditimbang terlebih dahulu. Pada pengambilan darah I (baseline), monyet-monyet dalam kelompok C memiliki berat badan antara 3.45–3.95 kg dengan

berat badan rata-rata sebesar 3.65 ± 0.25 kg. Monyet-monyet dalam kelompok L memiliki berat tubuh antara 2.50–3.80 kg dengan berat badan rata-rata sebesar 3.41 ± 0.53 kg. Standar deviasi berat badan pada kelompok C dan L tidak terlalu besar. Hal ini menunjukkan bahwa berat badan monyet-monyet pada kelompok C dan L tidak berbeda jauh satu sama lain. Monyet-monyet dalam kelompok H memiliki berat badan antara 2.95–5.90 kg dengan berat badan rata-rata sebesar 4.24 ± 1.12 kg. Jika dibandingkan dengan nilai standar deviasi kelompok C, kelompok H memiliki standar deviasi yang jauh lebih besar. Hal ini disebabkan oleh perbedaan berat badan antara monyet yang berbobot paling ringan dengan yang paling berat dalam kelompok tersebut mencapai 50%, yaitu sebesar 2.95 kg. Nilai berat badan rata-rata pada kelompok H juga paling besar karena kebanyakan monyet dalam kelompok ini berbadan besar dibandingkan monyet-monyet kelompok lain. Gambar 6 memperlihatkan perubahan berat badan selama penelitian.



Gambar 6. Perubahan berat badan rata-rata

Pada pengambilan darah II, berat badan rata-rata untuk kelompok C terlihat sedikit meningkat sedangkan untuk kelompok L dan H agak menurun. Berat badan rata-rata untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut adalah 3.61 ± 0.23 kg, 3.29 ± 0.52 kg, dan 4.31 ± 1.18 kg. Namun nilai-nilai tersebut tidak berubah secara signifikan dari nilai-nilai sebelumnya. Demikian pula pada pengambilan darah III, tidak ada perubahan berat badan secara signifikan meskipun terdapat peningkatan berat badan rata-rata untuk masing-

masing kelompok jika dibandingkan pada saat pengambilan darah II. Berat badan rata-rata untuk kelompok C, L, dan H pada pengambilan darah III berturut-turut adalah 3.73 ± 0.24 kg, 3.37 ± 0.51 kg, dan 4.50 ± 1.13 kg.

Pada pengambilan darah IV monyet-monyet dalam kelompok C, L dan H memiliki berat badan rata-rata berturut-turut sebesar 3.76 ± 0.31 kg, 3.30 ± 0.47 kg, dan 4.37 ± 1.14 kg. Jika dibandingkan pada saat pengambilan darah III, nilai berat badan rata-rata yang mengalami penurunan terdapat pada kelompok L dan H. Namun kenaikan itu juga tidak signifikan.

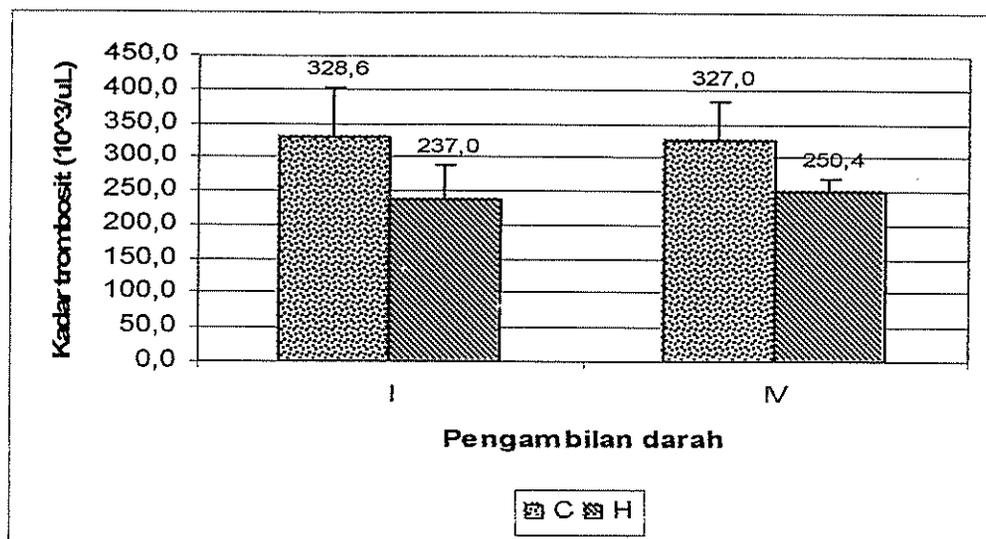
Berdasarkan data berat badan rata-rata, secara umum dapat dinyatakan bahwa selama penelitian ini tidak ada perubahan berat badan yang signifikan dari monyet-monyet tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa sirup dan tepung cacing yang digunakan sebagai sampel tidak mempengaruhi nafsu makan atau asupan pakan pada monyet-monyet tersebut. Seharusnya perbedaan berat badan monyet-monyet yang digunakan dalam penelitian ini tidak boleh terlalu jauh satu sama lain. Namun hal ini tetap dilakukan dengan memepertimbangkan dua hal, yaitu adanya keterbatasan jumlah monyet dalam seleksi dan faktor kesukaan terhadap sampel sirup dan tepung cacing yang diberikan pada masa seleksi.

2. Kadar Trombosit

Dalam istilah medis trombosit sering juga disebut platelet. Kadar trombosit merupakan salah satu parameter terapi antitrombosis. Aktivasi platelet dan ekspresi permukaan dari glikoprotein yang bersifat adhesif memainkan peranan penting dalam komplikasi trombosis setelah intervensi koroner (Gawaz *et al.*, 1996).

Dalam penelitian ini kadar trombosit diukur sebanyak dua kali yaitu pada pengambilan darah I dan pengambilan darah IV, untuk dua kelompok saja yaitu kelompok C dan H. Pada pengambilan darah I, kadar trombosit monyet-monyet pada kelompok C berkisar antara $239-411 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah, dengan rata-rata $328.6 \pm 75.2 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah. Untuk kelompok H kadar trombosit berkisar antara $192-321 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah, dengan rata-rata $237.0 \pm 51.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah. Pada pengambilan darah IV, kadar trombosit rata-rata

untuk kelompok C mengalami sedikit penurunan menjadi $327.0 \pm 55.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah, sedangkan kadar trombosit rata-rata untuk kelompok H mengalami sedikit peningkatan menjadi $250.4 \pm 19.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ darah. Namun peningkatan dan penurunan kadar trombosit yang terjadi tidak signifikan jika dibandingkan total jumlah trombosit setiap mikroliter darah. Gambar 7 menggambarkan perubahan kadar trombosit.



Gambar 7. Perubahan kadar trombosit rata-rata

Hasil yang diperoleh berbeda dengan hasil yang diperoleh oleh Jin *et al.* (2000), yang melaporkan bahwa uji *in vivo* lumbrokinase ternyata berdaya efektif untuk penderita aterosklerosis yang pembuluh darahnya mengalami pengapuran. Parameter yang diamati adalah kadar trombosit pasien aterosklerosis yang meningkat sehingga menyulitkan kerja plasminogen mengurai bekuan darah. Terapi lumbrokinase sebagai obat trombolitik mampu menurunkan kadar trombosit para pasien tersebut. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh penggunaan monyet ekor panjang sehat/normal dalam penelitian ini, sehingga hasil yang diperoleh tidak memberikan gambaran perubahan kadar trombosit (platelet) secara signifikan. Aterosklerosis berkaitan erat dengan trombosis. Menurut Li *et al.* (2000) trombosis dan inflamasi melibatkan interaksi platelet-leukosit yang kompleks. Keduanya adalah proses-proses patofisiologi yang berkaitan erat dengan aktivasi multiseluler, yang melibatkan platelet, leukosit, dan sel-sel endotelium.

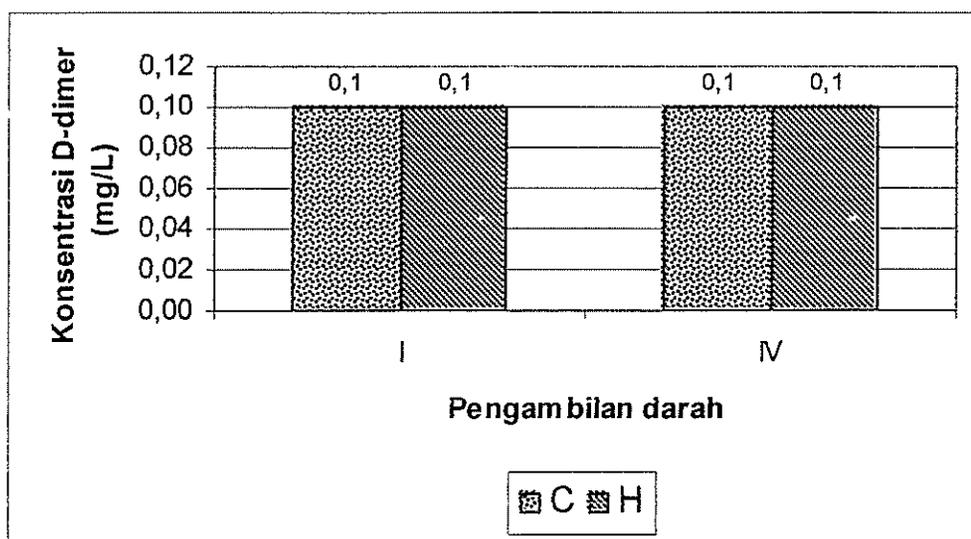
Kadar platelet normal untuk monyet *Macaca fascicularis* adalah 300–512 x 10³/μL darah (Fortman *et al.*, 2002). Dengan demikian, kadar trombosit rata-rata kelompok H pada pengambilan darah I dan IV berada di bawah kisaran normal tersebut. Sebagai perbandingan, nilai normal trombosit pada manusia berkisar antara 200–500 x 10³/μL darah (Gandasoebrata, 2001). Dengan demikian, kadar trombosit normal pada monyet *Macaca fascicularis* tidak berbeda jauh dengan kadar trombosit normal pada manusia. Menurut Gandasoebrata (2001), trombosit sukar dihitung karena mudah sekali pecah dan sulit dibedakan dari kotoran-kotoran kecil. Selain itu trombosit cenderung melekat pada permukaan asing dan menggumpal. Jumlah trombosit dalam keadaan normal sangat dipengaruhi oleh cara menghitungnya.

3. Konsentrasi D-dimer

D-dimer adalah produk degradasi fibrin spesifik, yang hanya terbentuk dengan adanya degradasi fibrin oleh plasmin dan bukan karena degradasi fibrinogen oleh plasmin (Freyburger *et al.*, 1998). Konsentrasi D-dimer plasma meningkat pada penderita trombosis vena akut karena D-dimer adalah penanda (marker) pembentukan fibrin dan fibrinolisis yang reaktif. Pada uji klinis, konsentrasi D-dimer yang rendah berguna untuk menyatakan tidak adanya trombosis akut. Diantara individu-individu yang sehat terdapat variabilitas konsentrasi D-dimer yang signifikan dalam kisaran normal. D-dimer dapat mewakili adanya keseimbangan prokoagulan atau faktor-faktor genetik, tingkat aterosklerosis subklinis, atau adanya kelainan pada proses koagulasi yang mempengaruhi trombosis koroner (Cushman *et al.*, 2003).

Dalam penelitian ini konsentrasi D-dimer dalam plasma darah diukur sebanyak dua kali yaitu pada pengambilan darah I dan pengambilan darah IV (Gambar 8). Darah hanya diambil dari dua monyet pada masing-masing kelompok C dan H. Konsentrasi D-dimer pada keempat monyet tersebut adalah 0.1 mg/L, baik pada pengambilan darah I maupun pengambilan darah IV. Sebagai perbandingan, nilai rujukan normal konsentrasi D-dimer untuk manusia adalah <0.3 mg/L. Belum ada data penelitian sebelumnya mengenai

konsentrasi D-dimer normal pada *Macaca fascicularis*. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa tidak ada perubahan konsentrasi D-dimer akibat pemberian tepung cacing. Penggunaan monyet sehat/normal dalam penelitian ini menjadi alasan utama tidak adanya perubahan konsentrasi D-dimer. Peningkatan konsentrasi D-dimer jauh lebih mudah diamati pada kasus-kasus trombosis.



Gambar 8. Konsentrasi D-dimer

Berkaitan dengan hubungan antara D-dimer dan beberapa faktor resiko untuk trombosis vena, konsentrasi D-dimer yang lebih tinggi diasosiasikan dengan umur yang lebih tua, ras bukan kulit putih, dan faktor VIII:c yang lebih tinggi. Asosiasi antara D-dimer dan trombosis lebih tinggi pada wanita daripada pria. Konsentrasi D-dimer memang lebih tinggi dengan adanya faktor V Leiden, protrombin 20210A, atau peningkatan faktor VIII:c. Ketiga hal tersebut dikenal sebagai faktor-faktor resiko umum untuk trombosis. Namun demikian D-dimer tetap dihubungkan dengan trombosis tanpa dipengaruhi faktor-faktor tersebut (Cushman *et al.*, 2003).

4. Waktu Protrombin (Prothrombin Time)

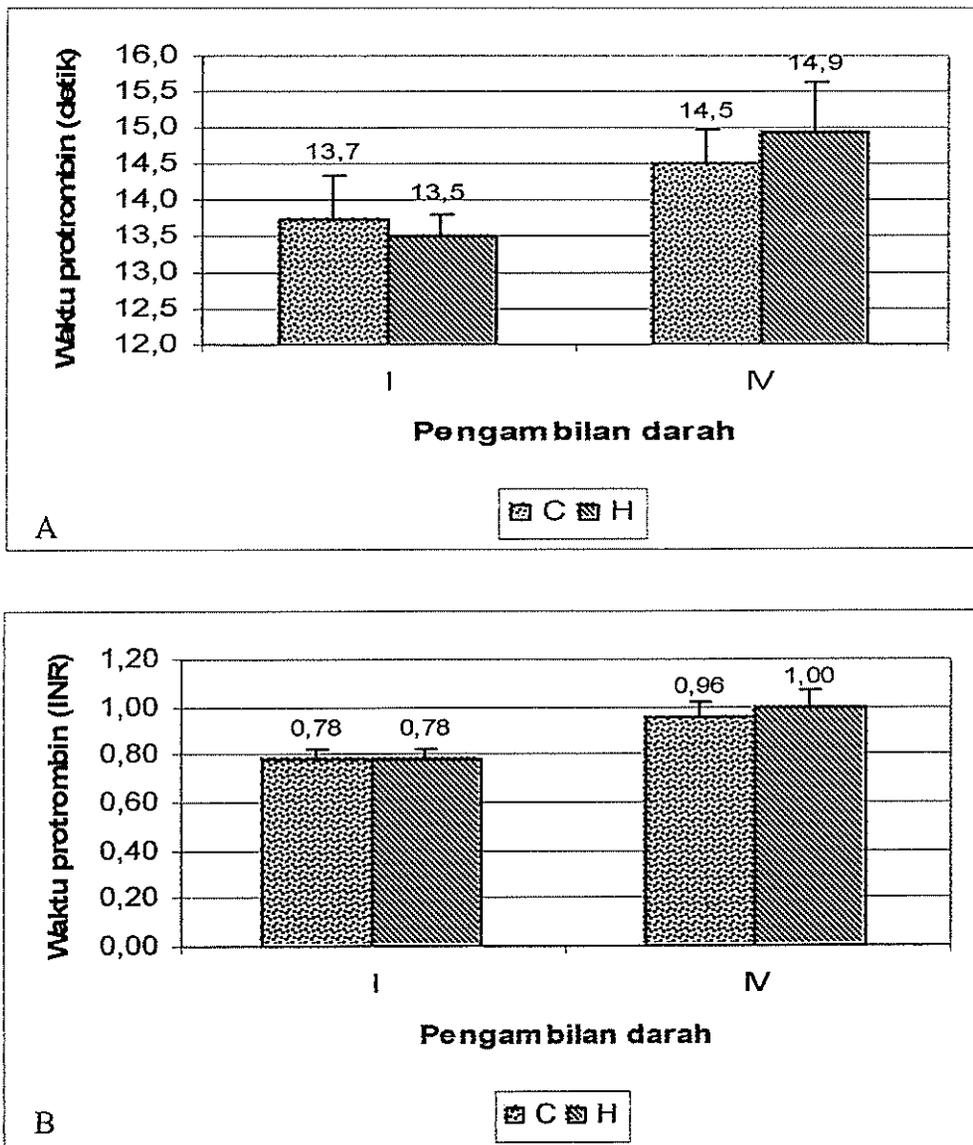
Uji waktu protrombin kebanyakan digunakan untuk mendeteksi masalah-masalah pendarahan yang potensial. Waktu protrombin yang abnormal atau semakin lama biasanya mengindikasikan penurunan kadar satu

atau beberapa faktor pada jalur ekstrinsik atau jalur umum koagulasi darah. Kondisi ini dapat disebabkan oleh kelainan koagulasi turunan, kekurangan vitamin K, penyakit liver, atau pemberian obat. Waktu protrombin juga merupakan analisis laboratorium yang paling umum dilakukan untuk memonitor terapi antikoagulan yang diberikan secara oral, karena uji ini sensitif terhadap faktor II, VII, dan X (Hirsh dan Hull, 1987). Uji ini dapat digunakan untuk menganalisis faktor-faktor pada sistem ekstrinsik, yaitu faktor II, V, VII, dan X. Uji waktu protrombin tidak sensitif terhadap defisiensi sistem koagulasi intrinsik (faktor VIII, IX, XI, dan XII) atau disfungsi platelet dan tidak dapat digunakan untuk memonitor terapi heparin. Nilai waktu protrombin dapat dinyatakan dengan satuan detik atau INR.

Mekanisme lumbrokinase dalam memperpanjang waktu protrombin diduga berkaitan dengan peranannya sebagai zat aktivator plasminogen. Dengan adanya lumbrokinase, aktivasi plasminogen menjadi plasmin akan semakin cepat. Plasmin adalah enzim proteolitik yang menyerupai tripsin. Selain mencerna fibrin dan fibrinogen, plasmin juga menguraikan faktor VIII, faktor V, dan faktor XIII (Sacher dan McPherson, 2000). Dengan terurainya faktor V, protrombin tidak dapat berubah menjadi trombin. Hal ini menyebabkan protrombin berada dalam jumlah berlebih. Berkaitan dengan sistem homeostasis dalam tubuh, pembentukan protrombin akan diperlambat hingga keseimbangan tercapai kembali.

Dalam penelitian ini waktu protrombin diukur pada pengambilan darah I dan pengambilan darah IV untuk dua kelompok, yaitu kelompok C dan H. Untuk kelompok C, pada pengambilan darah I nilai waktu protrombin rata-rata adalah 13.7 ± 0.61 detik (INR: 0.78 ± 0.04) dan sedikit meningkat menjadi 14.5 ± 0.48 detik (INR: 0.96 ± 0.05) pada pengambilan darah IV. Untuk kelompok H, waktu protrombin rata-rata pada pengambilan darah I adalah 13.5 ± 0.31 detik (INR: 0.78 ± 0.04) dan mengalami sedikit peningkatan hingga 14.9 ± 0.70 detik (INR: 1.00 ± 0.07). Nilai-nilai waktu protrombin pada penelitian ini berada di luar kisaran nilai rujukan waktu protrombin normal pada *Macaca fascicularis*, yaitu sebesar 9.9–11.1 detik (Fortman *et al.*, 2002). Perbedaan ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor

dan kondisi pada saat penelitian dan pengukuran. Sebagai perbandingan, nilai rujukan normal waktu protrombin untuk manusia adalah 12–18 detik. Berdasarkan data yang diperoleh tidak ada perubahan waktu protrombin secara signifikan pada kedua kelompok tersebut. Hal ini menyatakan bahwa pemberian tepung cacing pada monyet sehat/normal tidak mempengaruhi faktor-faktor ekstrinsik yang berperan dalam koagulasi darah dan tidak menyebabkan kelainan pada jalur umum koagulasi secara normal. Dengan demikian aktivitas fibrinolitik lumbrokinase pada tepung cacing tidak menyebabkan timbulnya pendarahan. Gambar 9 memperlihatkan perubahan nilai waktu protrombin rata-rata.



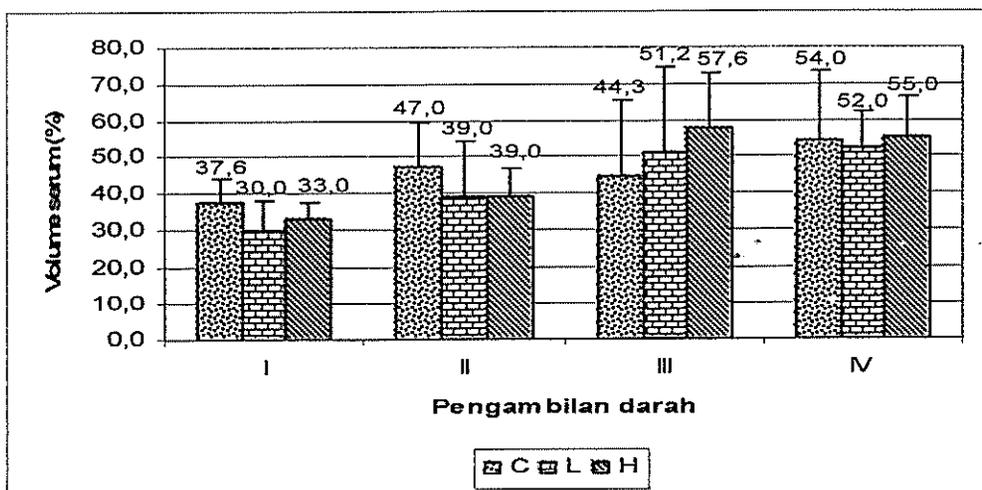
Gambar 9. Perubahan waktu protrombin rata-rata dalam detik (A), INR (B)

Menurut Gandasoebata (2001) jika faktor-faktor lain dalam proses pembekuan darah pada jalur ekstrinsik normal, maka waktu protrombin menjadi ukuran untuk aktivitas protrombin. Prinsip dasar uji ini adalah pada plasma diberikan sejumlah tromboplastin dan ion kalsium yang optimal dan lamanya waktu untuk membentuk fibrin diukur. Uji waktu protrombin dipengaruhi oleh kualitas tromboplastin yang digunakan dan teknik pengujiannya. Oleh karena itu, pengujian ini setidaknya harus selalu disertai kontrol dengan plasma normal.

5. Retraksi Bekuan

Menurut Gandasoebata (2001) retraksi bekuan digunakan untuk menguji fungsi trombosit. Setelah darah membeku, bekuan darah mengerut dan pada proses pengerutan itu sejumlah serum akan keluar dari bekuan sehingga bekuan itu menjadi kenyal. Proses ini ditentukan oleh jumlah trombosit per volume darah dan fungsi trombosit. Sebenarnya retraksi itu ditentukan oleh faktor-faktor lain, seperti kadar fibrinogen, jenis permukaan yang bersentuhan dengan darah beku, dan faktor-faktor lain dalam serum.

Pada penelitian ini perubahan volume serum diamati pada setiap kelompok setiap kali pengambilan darah dilakukan (Gambar 10). Pada pengambilan darah I (baseline), kelompok C memiliki volume serum rata-rata yang paling tinggi yaitu $37.6 \pm 6.4\%$. Kelompok L dan H memiliki volume serum rata-rata berturut-turut sebesar $30.0 \pm 7.9\%$ dan $33.0 \pm 4.5\%$.



Gambar 10. Perubahan volume serum rata-rata

Pada pengambilan darah II, volume serum rata-rata pada masing-masing kelompok meningkat. Kelompok C memiliki volume serum rata-rata tertinggi yaitu $47.0 \pm 12.0\%$. Nilai standar deviasi pada kelompok ini cukup besar karena adanya perbedaan volume serum antarindividu yang berkisar antara 30–60%. Volume serum rata-rata kelompok L adalah sebesar $39.0 \pm 15.2\%$. Nilai standar deviasi pada kelompok ini juga cukup besar karena adanya perbedaan volume serum antarindividu yang berkisar antara 20–60%. Perbedaan volume serum antarindividu pada kelompok H tidak terlalu jauh dibandingkan kedua kelompok lainnya yaitu berkisar antara 30–50%, sehingga nilai standar deviasi pada kelompok ini juga relatif lebih kecil. Nilai volume serum rata-rata kelompok H sebesar $39.0 \pm 7.4\%$.

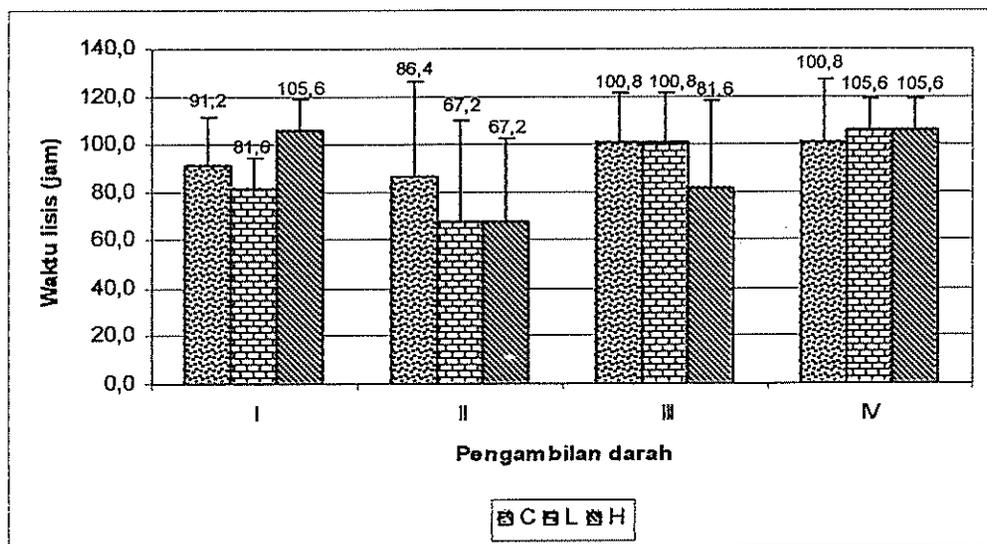
Pada pengambilan darah III, kelompok H memiliki volume serum rata-rata paling tinggi sebesar $57.6 \pm 15.4\%$. Standar deviasi cukup besar karena perbedaan volume serum antarindividu yang cukup besar pula yaitu berkisar antara 40–80%. Nilai volume serum rata-rata terendah dimiliki oleh kelompok C yaitu $44.3 \pm 21.1\%$, dengan perbedaan volume serum antarindividu berkisar antara 16.7–75%. Kelompok L memiliki volume serum rata-rata sebesar $51.2 \pm 23.1\%$. Perbedaan volume serum antarindividu pada kelompok C berkisar antara 14–70%. Pada pengambilan darah IV, volume serum rata-rata pada masing-masing kelompok berada di atas 50% dan tidak berbeda jauh satu sama lain. Volume serum rata-rata pada kelompok C, L, dan H berturut-turut adalah $54.0 \pm 19.5\%$, $52.0 \pm 10.4\%$, dan $55.0 \pm 11.2\%$. Persentase perubahan volume serum antara pengambilan darah I dan IV untuk kelompok C, L, dan H berturut-turut sebesar 30.37%, 42.31%, dan 40.00%.

Berdasarkan data volume serum terlihat adanya perubahan volume serum akibat pemberian tepung cacing *L.rubellus*. Jika dibandingkan dengan persentase perubahan volume serum pada kelompok kontrol (C), persentase perubahan volume serum pada kelompok yang diberi tepung cacing *L.rubellus* (kelompok L dan H) mencapai 40% atau kurang lebih lebih tinggi 10% daripada kelompok kontrol. Belum ada data mengenai kisaran normal

volume serum untuk monyet *Macaca fascicularis* sehingga nilai tersebut sulit untuk dibandingkan. Volume serum yang dikeluarkan secara spontan dari bekuan menjadi ukuran bagi retraksi bekuan yang terjadi. Untuk manusia dalam keadaan normal, jumlah serum itu 40–60% dari jumlah darah. Jika kurang dari 40% mungkin berarti abnormal (Gandasoebrata, 2001). Jika mengacu pada kisaran normal volume serum untuk manusia, nilai-nilai volume serum rata-rata pada penelitian ini masih berada dalam batas normal. Hal ini menunjukkan bahwa pada monyet sehat/normal fungsi trombosit tidak terganggu oleh adanya administrasi tepung cacing *L. rubellus* secara oral.

6. Waktu Lisis Bekuan Darah Utuh (Whole Blood Clot Lysis Time)

Uji ini dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas fibrinolitik. Uji ini sangat mudah dilakukan dengan menggunakan bekuan darah hasil retraksi bekuan. Selain mengukur jumlah serum, konsistensi bekuan yang terbentuk harus diperhatikan. Konsistensi itu harus kenyal. Jika retraksi tidak terjadi dengan baik, konsistensi bekuan menjadi lembek dan lapuk sehingga bekuan lebih mudah dapat dipecahkan (Gandasoebrata, 2001). Peningkatan aktivitas fibrinolitik menyebabkan waktu lisis bekuan darah utuh menjadi semakin singkat, sebaliknya penurunan aktivitas fibrinolitik menyebabkan waktu lisis bekuan darah utuh menjadi semakin lama. Gambar 11 menggambarkan perubahan waktu lisis bekuan darah utuh rata-rata selama penelitian.



Gambar 11. Perubahan waktu lisis bekuan darah utuh rata-rata

Pada penelitian ini waktu lisis bekuan darah utuh diamati pada semua kelompok perlakuan setiap kali pengambilan darah dilakukan. Pada pengambilan darah I (baseline), kelompok H memiliki waktu lisis rata-rata paling lama yaitu 105.6 ± 13.1 jam. Kelompok L memiliki waktu lisis rata-rata tercepat yaitu 81.6 ± 13.1 jam. Waktu lisis rata-rata pada kelompok C adalah 91.2 ± 20.1 jam.

Pada pengambilan darah II waktu lisis rata-rata pada masing-masing kelompok perlakuan menjadi semakin cepat, terutama pada kelompok H dengan waktu lisis 67.2 ± 35.6 jam, sekitar 40 jam lebih cepat daripada waktu lisis rata-rata pada pengambilan darah I (baseline). Kelompok L memiliki waktu lisis rata-rata 67.2 ± 42.9 jam. Kelompok C memiliki waktu lisis rata-rata sekitar 5 jam lebih cepat daripada waktu lisis rata-rata pada pengambilan darah I, yaitu 86.4 ± 40.2 jam. Nilai standar deviasi pada masing-masing kelompok sangat besar karena perbedaan waktu lisis antarindividu pada masing-masing kelompok yang sangat bervariasi antara 24–120 jam.

Peningkatan nilai waktu lisis rata-rata terdapat pada pengambilan darah ke III. Kelompok C memiliki nilai waktu lisis rata-rata yang sama dengan kelompok L sebesar 100.8 ± 20.1 jam, sedangkan nilai waktu lisis rata-rata kelompok H menjadi 81.6 ± 36.4 jam. Dengan demikian, kelompok L mengalami peningkatan waktu lisis rata-rata paling tinggi dibandingkan pada pengamatan sebelumnya yaitu sekitar 34 jam. Sebagai perbandingan, waktu lisis rata-rata kelompok C dan H hanya meningkat sekitar 14 jam.

Pada pengambilan darah IV, waktu lisis rata-rata kelompok C tidak mengalami perubahan, hanya mengalami sedikit peningkatan pada nilai standar deviasinya, yaitu sebesar 100.8 ± 26.3 jam. Peningkatan waktu lisis rata-rata terdapat pada kelompok L dan H. Kelompok L mengalami peningkatan waktu lisis rata-rata sekitar 5 jam dibandingkan pengamatan sebelumnya menjadi 105.6 ± 13.1 jam. Kelompok H memiliki nilai waktu lisis rata-rata yang sama dengan kelompok L, namun peningkatan nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan kelompok L yaitu sekitar 24 jam.

Pada uji waktu lisis bekuan darah utuh ini, nilai-nilai yang diperoleh sangat sulit untuk diinterpretasikan. Walaupun terdapat penurunan nilai

waktu lisis rata-rata pada pengambilan darah II dibandingkan dengan baseline, standar deviasi pada masing-masing kelompok sangat besar dibandingkan dengan standar deviasi pada saat pengambilan darah yang lain. Hal ini menunjukkan perbedaan waktu lisis antarindividu pada masing-masing kelompok yang sangat jauh. Oleh karena itu, penurunan waktu lisis tersebut tidak dapat dikatakan signifikan. Secara umum dapat dinyatakan bahwa tidak ada perubahan nilai waktu lisis rata-rata yang signifikan. Dengan demikian, administrasi oral tepung cacing *L. rubellus* pada monyet *Macaca fascicularis* normal/sehat tidak menyebabkan perubahan nilai parameter waktu lisis bekuan darah utuh secara signifikan.

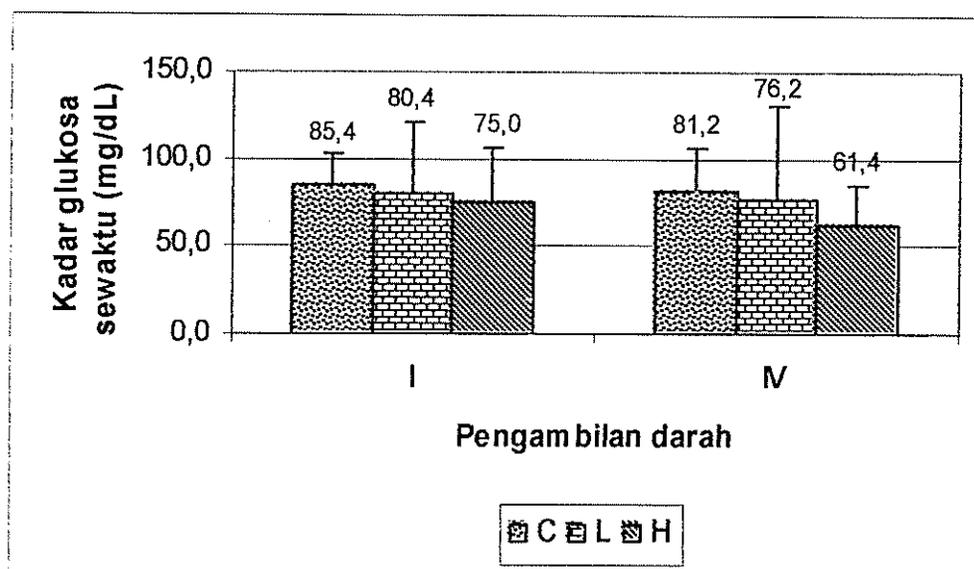
Pada saat dilakukan uji ini, pengamatan secara kualitatif juga dilakukan pada ukuran dan konsistensi bekuan darah yang terbentuk. Pengamatan tersebut menunjukkan bahwa pada kelompok H yang diberi tepung cacing *L. rubellus* dengan dosis yang paling tinggi, ukuran bekuan darah lebih kecil dan konsistensinya lebih lembek/rapuh dibandingkan dengan bekuan darah pada kelompok C dan L. Hal ini dapat disebabkan oleh penurunan kadar fibrin yang lebih besar pada sampel darah dari monyet-monyet kelompok H dibandingkan dengan sampel darah dari kelompok C dan L.

7. Kadar Glukosa

Penyebab kematian dan kesakitan yang utama pada penderita diabetes mellitus (baik DM tipe 1 maupun DM tipe 2) adalah penyakit pembuluh darah. Salah satu penyakit tersebut adalah aterosklerosis. Hipotesis terbaru mengatakan bahwa awal terjadinya lesi aterosklerosis yaitu berupa disfungsi sel-sel endotelium. Disfungsi endotelium telah didokumentasikan pada pasien-pasien yang menderita diabetes dan individu-individu dengan resistensi insulin atau beresiko tinggi untuk terkena diabetes tipe 2 (Calles-Escandon dan Cipolla, 2001). Enzim trombolitik secara normal dihasilkan oleh sel-sel endotelium pada pembuluh darah. Dengan bertambahnya usia, produksi enzim ini mulai menurun sehingga darah menjadi lebih rentan terhadap koagulasi (Holsworth, 2002). Enzim trombolitik yang sangat

penting adalah plasmin. Plasmin terbentuk dari plasminogen dengan adanya *tissue plasminogen activator* (t-PA). Regulator utama dari t-PA adalah *plasminogen activator inhibitor* (PAI) dimana PAI-1 berperan paling menonjol. Pada pasien dengan disfungsi endotel, kadar PAI-1 mengalami peningkatan yang akan menghambat pemecahan/penguraian endapan fibrin yang terdapat pada bagian dalam dinding pembuluh darah. Beberapa peneliti mendapatkan bahwa PAI-1 berperan penting dalam proses terjadinya dan progresivitas aterosklerosis (Calles-Escandon dan Cipolla, 2001). Dengan demikian, kadar glukosa merupakan salah satu parameter penyakit aterosklerosis yang penting.

Pada penelitian ini dilakukan uji kadar glukosa untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian tepung cacing *L. rubellus* secara oral pada kadar glukosa sewaktu monyet *Macaca fascicularis* sehat. Perubahan kadar glukosa diamati pada masing-masing kelompok perlakuan pada pengambilan darah I dan IV (Gambar 12).



Gambar 12. Perubahan kadar glukosa darah rata-rata

Pada pengambilan darah I (baseline), kadar glukosa rata-rata pada kelompok L dan H berturut-turut sebesar 80.4 ± 39.6 mg/dL dan 75.0 ± 31.5 mg/dL. Kedua kelompok tersebut memiliki standar deviasi yang tinggi dibandingkan kelompok C. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kadar glukosa

antarindividu yang berbeda jauh satu sama lain dalam kelompok yang sama. Kelompok C memiliki kadar glukosa rata-rata yaitu 85.4 ± 18.0 mg/dL.

Pada pengambilan darah IV terdapat sedikit penurunan kadar glukosa rata-rata pada setiap kelompok perlakuan. Kadar glukosa rata-rata pada kelompok C dan L menurun sebesar 4.2 mg/dL berturut-turut menjadi 81.2 ± 25.5 mg/dL dan 76.2 ± 54.2 mg/dL. Pada kelompok H kadar glukosa rata-rata menjadi 61.4 ± 23.8 mg/dL atau turun sebesar 13.2 mg/dL dari pengambilan darah I. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kadar glukosa rata-rata pada masing-masing kelompok perlakuan mengalami penurunan, namun penurunan tersebut tidak signifikan. Menurut Verlangieri *et al.* (1985) kadar glukosa normal pada monyet *Macaca fascicularis* jantan dewasa berkisar antara 44–84 mg/dL. Dengan demikian, kadar glukosa rata-rata yang diperoleh pada penelitian ini semuanya masih berada dalam kisaran normal, kecuali untuk kelompok C pada pengambilan darah I yang berada sedikit di atas kisaran normal. Sebagai perbandingan, kadar glukosa normal pada manusia berkisar antara 70–110 mg/dL. Mekanisme lumbrokinase dalam menurunkan kadar glukosa belum diketahui dengan pasti. Akan tetapi, beberapa produsen lumbrokinase komersial mengklaim bahwa produk mereka dapat menurunkan kadar glukosa secara signifikan pada penderita diabetes mellitus tipe 2 tahap awal hingga intermediet.

8. Kadar Trigliserida

Pengukuran kadar trigliserida dapat digunakan untuk diagnosis dan perawatan pasien yang menderita diabetes mellitus, nefrosis, kerusakan hati, kelainan metabolisme lipid, dan penyakit-penyakit endokrin lainnya. Martins *et al.* (2003) menyatakan bahwa kadar kolesterol, trigliserida, dan lipid-lipid lain merupakan penanda penyakit aterosklerosis terbaik. Penyakit aterosklerosis yang bertalian erat dengan penyimpangan metabolisme trigliserida dan kolesterol dalam tubuh merupakan penyebab timbulnya penyakit kardiovaskuler (American Heart Association, 2001).

Pada penelitian ini uji kadar trigliserida dilakukan pada masing-masing kelompok perlakuan pada pengambilan darah I dan IV. Ada beberapa

kadar trigliserida yang tidak terukur oleh alat. Hal ini disebabkan karena kadar trigliserida tersebut berada di luar kisaran kadar trigliserida yang dapat terukur alat. Pada pengambilan darah I, hanya dua individu pada kelompok C yang terukur kadar trigliseridanya, dengan rata-rata 92.0 ± 24.0 mg/dL. Pada masing-masing kelompok L dan H ada satu individu yang tidak terukur kadar trigliseridanya. Kadar trigliserida rata-rata pada kelompok L dan H berturut-turut adalah 91.0 ± 15.0 mg/dL dan 103.0 ± 24.5 mg/dL.

Pada pengambilan darah IV, ada satu individu pada kelompok L yang tidak terukur kadar trigliseridanya, sedangkan individu-individu pada kelompok C dan H terukur semua kadar trigliseridanya. Kelompok L memiliki kadar trigliserida rata-rata sebesar 79.3 ± 7.7 mg/dL. Nilai rata-rata tersebut berbeda jauh dengan nilai rata-rata pada kedua kelompok lainnya. Kelompok C dan H memiliki kadar trigliserida rata-rata yang hampir sama, berturut-turut sebesar 28.2 ± 5.4 mg/dL dan 29.2 ± 7.8 mg/dL. Berdasarkan data yang diperoleh, pengaruh pemberian tepung cacing tanah *L. rubellus* terhadap kadar trigliserida masih belum dapat disimpulkan pada penelitian ini karena kadar trigliserida pada pengambilan darah I dan IV tidak dapat dibandingkan. Menurut Verlangieri *et al.* (1985) kadar trigliserida normal pada monyet *Macaca fascicularis* jantan dewasa berkisar antara 35–100 mg/dL. Sebagai perbandingan, kadar trigliserida normal pada manusia <200 mg/dL.

Berdasarkan data yang diperoleh, secara umum dapat dinyatakan bahwa pemberian tepung cacing *L. rubellus* secara oral kepada monyet ekor panjang sehat/normal tidak menimbulkan perubahan secara signifikan pada parameter-parameter uji yang diukur. Sebagai perbandingan, Subandrio (data tidak dipublikasikan) memberikan presipitat protein cacing *L. rubellus* (presipitasi menggunakan amonium sulfat 65%) secara oral dengan dosis yang sama kepada monyet ekor panjang sehat/normal. Presipitat tersebut memiliki aktivitas spesifik dan aktivitas per gram sampel berturut-turut 3.5 kali dan 7 kali lebih besar daripada tepung cacing *L. rubellus*. Pemberian presipitat tersebut juga tidak menimbulkan perubahan signifikan pada parameter-parameter uji yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut aman dan tidak toksik.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Cacing tanah *Lumbricus rubellus* memiliki potensi yang sangat besar sebagai antitrombosis karena mengandung lumbrokinase, suatu protease yang bersifat fibrinolitik. Hal ini terbukti dari uji aktivitas fibrinolitik yang dilakukan secara *in vitro* menggunakan dua metode, yaitu cakram fibrin dan zimogram. Pada metode cakram fibrin, aktivitas fibrinolitik ditandai dengan terbentuknya area berwarna bening (halo). Ekstrak protease kasar dan presipitat protease cacing *L. rubellus* menunjukkan aktivitas fibrinolitik yang terus meningkat hingga 24 jam pada inkubasi dengan suhu 37°C. Kedua enzim tersebut memiliki aktivitas fibrinolitik yang hampir sama dengan lumbrokinase komersial pada cakram fibrin yang sama. Pada analisis zimogram, digesti substrat fibrinogen ditunjukkan dengan pita-pita berwarna bening berlatar belakang biru. Ekstrak protease kasar *L. rubellus* dan lumbrokinase komersial masing-masing memiliki 6 pita hasil digesti fibrinogen pada posisi yang sama. Oleh karena itu, lumbrokinase komersial tersebut diperkirakan juga berasal dari cacing *L. rubellus*. Presipitat protease *L. rubellus* menunjukkan hasil yang berbeda. Sampel enzim ini memiliki 7 pita hasil digesti fibrinogen, dimana 4 pita teratas memiliki posisi yang sama seperti kedua sampel enzim lainnya, sedangkan 3 pita lainnya berbeda posisinya.

Evaluasi pengaruh tepung cacing *L. rubellus* pada beberapa parameter aterosklerosis menggunakan monyet ekor panjang *Macaca fascicularis* normal/sehat menunjukkan bahwa tidak ada perubahan yang signifikan untuk masing-masing parameter uji selama penelitian berlangsung. Hasil uji ini menunjukkan bahwa tepung cacing *L. rubellus* tidak berpengaruh negatif terhadap parameter-parameter aterosklerosis yang diuji dan aman untuk dikonsumsi. Selain itu, tidak adanya perubahan berat badan secara signifikan menunjukkan bahwa tepung cacing tidak mempengaruhi nafsu makan atau asupan pakan pada monyet-monyet yang digunakan.

Konsentrasi protein pada ekstrak protease kasar *L. rubellus* ternyata lebih besar daripada lumbrokinase komersial, berturut-turut sebesar 1.93 mg/mL dan

0.50 mg/mL. Aktivitas enzim lumbrokinase komersial lebih besar daripada aktivitas enzim ekstrak protease kasar *L. rubellus*, berturut-turut sebesar 0.99 UA/mL dan 0.88 UA/mL. Nilai aktivitas spesifik dan aktivitas enzim per gram sampel lumbrokinase komersial sedikit lebih besar dibandingkan ekstrak protease kasar *L. rubellus*. Nilai aktivitas spesifik lumbrokinase komersial dan ekstrak protease kasar *L. rubellus* berturut-turut sebesar 0.46 UA/mg dan 0.51 UA/mg, dengan nilai aktivitas enzim per gram sampel berturut-turut sebesar 44.21 UA/g dan 49.29 UA/g.

B. SARAN

Berkaitan dengan penelitian ini ada beberapa saran yang diharapkan dapat berguna untuk penelitian selanjutnya:

1. Untuk memperoleh hasil evaluasi aktivitas fibrinolitik yang signifikan disarankan untuk menggunakan monyet *Macaca fascicularis* yang menderita aterosklerosis, dengan cara pemberian pakan tinggi lemak.
2. Jumlah monyet yang digunakan dapat diperbanyak untuk memberikan hasil yang lebih tepat dan akurat, misalnya 20 ekor dalam satu kelompok.
3. Monyet-monyet yang digunakan sedapat mungkin memiliki kesamaan dalam hal umur dan pemberian diet. Umur dapat ditentukan berdasarkan susunan gigi. Pemberian diet berupa pakan normal yang sama, tetapi harus dipastikan tidak mengandung bahan makanan yang memiliki aktivitas fibrinolitik.
4. Fase seleksi dan adaptasi monyet sebaiknya diperpanjang untuk memperoleh monyet-monyet yang memiliki tingkat kesukaan yang tinggi terhadap tepung cacing.
5. Dosis tepung cacing sebaiknya dibagi tiga dan diberikan tiga kali sehari untuk memperoleh efek fibrinolitik yang lebih optimal.
6. Untuk aplikasi lumbrokinase secara komersial, disarankan untuk melakukan uji toksisitas menggunakan tikus, misalnya dengan mengukur kadar monooksigenase pada hati tikus.
7. Pemasaran tepung cacing sebagai *neutraceutical* dapat dilakukan dalam bentuk kapsul yang berisi tepung cacing dengan dosis tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- American Heart Association. 2001. Atherosclerosis. <http://www.americanheart.org/>
- Anonim, 2003. Fibrenase III – Lumbrokinase. www.allergyresearchgroup.com/proddesc/discuss/LumbrokinasePDFProductSheet042803.pdf
- Astuti EY. 2000. Mempelajari pemeliharaan monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) di Pusat Studi Satwa Primata. Laporan Praktek Lapang. Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor.
- Bick, RL. 2004. *Introduction to Thrombosis*. <http://www.alternativesforlife.azbestvalue.com/page/page/917371.htm>
- Blann AD, Landray MJ, Lip GYH. 2002. An overview of antithrombotic therapy. *BMJ* 325 : 762-765.
- Bonadio, C. 2000. "Macaca fascicularis" (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Macaca_fascicularis.html.
- Calles-Escandon J, Cipolla M. 2001. Diabetes and endothelial dysfunction: A clinical perspective. *Endocrine Reviews* 22(1) : 36–52.
- Cho JH, Park CB, Yoon YG, Kim SC. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1408(1) : 67-76.
- Choi E, Kwon S, Choi Y, Rhee S. 1996. Lumbrokinase-3(1) precursor *Lumbricus rubellus*. [TREMBL] (Accession No. Q25395). http://bioinfo.hku.hk/srs71binp/cgibin/wgetz?id+4xSsB1NjD8l+%5Blibs_EQ_%7BswissprotSP_trembl%7DID:Q25395%5D+-e#General
- Cushman M, Folsom AR, Wang L, Aleksic N, Rosamond WD, Tracy Rp, Heckbert SR. 2003. Fibrin fragment D-dimer and the risk of future venous thrombosis. *Blood* 101(4) : 1243-1248.
- De-Giuli M, Pirota F. 1978. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Exp. Clin. Res.* 4 : 21-23.
- Edward CA, Lofty JR. 1977. *Biology of Earthworms*. Ed ke-2. London: Chapman & Hall. hlm 57-70.
- Fan Q, Wu C, Li L, Fan R, Wu C, Hou Q, He R. 2001. Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1526 : 286-292.

- Feied C, Handler JA. 2002. Thrombolytic Therapy. <http://www.emedicine.com/emerg/topic831.htm#>
- Fortman JD, Hewett TA, Bennett BT. 2002. *The Laboratory Nonhuman Primate*. London: CRC Press.
- Freyburger G, Trillaud H, Labrousse S. 1998. D-dimer strategy in thrombosis exclusion: A gold standard study in 100 patients suspected of deep venous thrombosis or pulmonary embolism: 8 DD methods compared. *Thromb. Haemost.* 79(1) : 32-37
- Gandasoebrata R. 2001. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schomig A. 1996. Platelet activation and coronary stent implantation effect of antithrombotic therapy. *Circulation* 94 : 279-285.
- Grüber C, Stürzenbaum S, Gehrig P, Sack R, Hunziker P, Berger B, Dallinger R. 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-Metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. J. Biochem.* 267 : 573-582
- Hegner RW, Engemann JG. 1968. *Invertebrate Zoology*. New York: Macmillan.
- Hirsh J, Hull RD. 1987. *Venous Thromboembolism: Natural History, Diagnosis, and Management*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Holsworth, RE. 2002. Natto, the food of warriors. Special report online. www.nutrimart.com/pdf/nattokinase.pdf
- Hwang CM, Kim DI, Kim JE, Huh SH, Min BG, Park JH, Han JS, Lee BB, Kim YI, Ryu ES, Kim JW. 2002. In vivo evaluation of lumbrokinase, a fibrinolytic enzyme extracted from *Lumbricus rubellus*, in a prosthetic vascular graft. *J. Cardiovasc. Surg.* 43 : 891-894.
- Ismanto A. 1999. Tiga macam ransum monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dan pengaruhnya terhadap performa. Skripsi. Jurusan Ilmu Nutrisi dan Makanan Ternak, Fakultas Peternakan IPB, Bogor.
- Jin L, Jin H, Zhang G, Xu G. 2000. Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 23 : 213-218.
- Jones G, Ronk M, Mori F, Zhang Z. 2001. Disulfide structure of alfineprase: A recombinant analog of fibrolase. *Protein Science* 10 : 1264-1267.
- Kim JS, Kang JK, Chang HC, Lee M, Kim GS, Lee DK, Kim ST, Kim M, Park S. 1993. The thrombolytic effect of lumbrokinase is not as potent as urokinase in a rabbit cerebral embolism model. *J. Korean Med. Sci.* 8 : 117-120.

- Kim JS *et al.* 1998. Dose dependency of earthworm powder on antithrombotic and fibrinolytic effects. *Arch. Pharm. Res.* 21 : 374-377.
- Kim WK, Choi KY, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, Oh HN, Kwon IB, Lee SY. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from chungkook-jang. *App. Environ. Microbiol.* 62(7) : 2482-2488.
- Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. 2000. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 : 2702.
- Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. 2003. Vampire Bat Salivary Plasminogen Activator (Desmoteplase): A unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 34 : 537.
- Martins PJF, D'Almeida V, Vergani N, Perez ABA, Tufik S. 2003. Increased plasma homocysteine levels in shift working bus drivers. *Occup. Environ. Med.* 60 : 662- 666
- Merck & Co., Inc. 1995. Hemostasis. <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section11/chapter131/131b.jsp>
- Mihara H *et al.* penemu; Amano Seiyaku Kabushiki Kaisha. Februari 1986. Thrombolytic agent. US patent 4,568,545.
- Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M, Maruyama M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japan J. Physiol.* 41 : 461-472.
- Milner, M and K Makise. 2002. Natto and its active ingredient nattokinase: A potent and safe thrombolytic agent. *Alternative and Complementary Therapies*. New York: Mary Ann Liebert Inc. hlm 157-164.
- Minnich J. 1977. *The Earthworm Book: How to Raise and Use Earthworms for Your Farm and Garden*. London: Rodale Pr Emmaus. hlm 23.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. 2001. Farmakologi: Ulasan Bergambar. Ed. ke-2. Agoes A, penerjemah; Hartanto H, editor. Jakarta: Widya Medika. Terjemahan dari: Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. hlm 203-205.
- Nakajima N, Mihara H, Sumi H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 1726-1730.

- Nakajima N, Ishihara K, Sugimoto M, Sumi H, Mikuni K, Hamada H. 1996. Chemical modification of earthworm fibrinolytic enzyme with human serum albumin fragment and characterization of the protease as a therapeutic enzyme. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 : 293-300.
- Nakajima N, Sugimoto M, Ishihara K. 2000. Stable earthworm serine proteases: application of the protease function and usefulness of the earthworm autolysate. *J. Biosci. Bioeng.* 90 : 174-179.
- Nurachman Z. 2001. Obat stroke dan jantung akibat trombosis dari cacing tanah. Seminar on-air Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21. Jakarta: Sinergy Forum – PPI Tokyo Institute of Technology (1-14 Februari 2001).
- Palungkun R. 1999. Sukses Beternak Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*. Jakarta: Penebar Swadaya. hlm 5-20.
- Park YD, Kim JW, Min BG, Seo JW, Jeong JM. 1998. Rapid purification and biochemical characteristics of lumbrokinase III from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol. Lett.* 20 : 169-172.
- Park Y, Ryu E, Kim H, Jeong J, Kim J, Shim J, Jeon S, Joy, Kim W, Min B. 1999. Characterization of antithrombotic activity of lumbrokinase-immobilized polyurethane valves in the total artificial heart. *Artif. Organs.* 23 : 210-214.
- Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ. 2002. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physio. Part B* 134 : 45-52
- Rukmana R. 1999. Budidaya Cacing Tanah. Yogyakarta: Kanisius. hlm 14-20.
- Ryu GH, Park S, Kim M, Han DK, Kim YH, Min B. 1994. Antithrombogenicity of lumbrokinase-immobilized polyurethane. *J. Biomed. Mater. Res.* 28 : 1069-1077.
- Ryu GH, Han DK, Park S, Kim M, Kim YH, Min B. 1995. Surface characteristics and properties of lumbrokinase-immobilized polyurethane. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 : 403-409.
- Sacher RA, McPherson RA. 2000. Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests, 11/E. Philadelphia: F.A. Davis Company.
- Sajuthi D. 1991. Klasifikasi dan Daerah Penyebaran Satwa Primata. Makalah Kursus Singkat Penanganan Satwa Primata sebagai Hewan Laboratorium PSSP LP-IPB. hlm 9-14.
- Stürzenbaum SR, Winters C, Galay M, Morgan AJ, Kille P. 2001. Metal ion trafficking in earthworms. *J. Biol. Chem.* 276(36) : 34013-34018.

- Tjay TH, Rahardja K. 2002. Obat-obat Penting. Ed ke-5. Jakarta: Elex Media Komputindo. hlm 572-582.
- Tu AT, Baker B, Wongvibulsin S, Willis T. 1996. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. *Toxicon*. 34(11-12) : 1295-300.
- Verlangieri AJ, DePriest JC, Kapeghian JC. 1985. Normal serum biochemical, hematological, and EKG parameters in anesthetized adult male *Macaca fascicularis* and *Macaca arctoides*. *Lab. Anim. Sci.* 35(1) : 63-66.
- Williams JK, Suparto I. 2004. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: lessons from a monkey model of postmenopausal women. *ILAR Journal* 45(2) : 139-146.
- Yanti. 2003. Pemurnian dan karakterisasi protease cacing tanah *Lumbricus rubellus* yang bersifat fibrinolitik. Tesis. Program Pascasarjana Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB, Bogor.
- Yanti, Suhartono MT, Idiyanti T, Sajuthi D. 2003. Karakterisasi protease dari ekstrak cacing tanah *Lumbricus rubellus*. International Symposium on Biomedicines: Biodiversity on Traditional Biomedicines for Human Health and Welfare. Bogor: Pusat Studi Biofarmaka IPB (18-19 September 2003).

LAMPIRAN

Lampiran 1. Larutan pereaksi

Pereaksi A

Komposisi larutan terdiri dari 29.2 g akrilamida dan 0.8 g bis-akrilamida yang dilarutkan dalam 50 mL akuades dan diaduk dengan *stirrer* hingga homogen.

Pereaksi B

Komposisi larutan terdiri dari 75 mL bufer Tris-HCl 2 M pH 8.8, 4 mL SDS 10% b/v, dan ditera dengan akuades hingga volume total 100 mL.

Bufer Tris-HCl 2 M pH 8.8

Sebanyak 24.228 g Tris dilarutkan dalam 100 mL akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer* hingga larut, lalu ditera pH-nya hingga 8.8 dengan penambahan HCl 2 M.

SDS 10% b/v

Sebanyak 10 g SDS dilarutkan dalam akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer*, lalu ditera hingga volume total 100 mL. Pengadukan dilakukan pelan-pelan agar larutan tidak berbusa.

Pereaksi C

Komposisi larutan terdiri dari 50 mL bufer Tris-HCl 1 M pH 6.8, 4 mL SDS 10% b/v, dan ditera dengan akuades hingga volume total 100 mL.

Bufer Tris-HCl 1 M pH 6.8

Sebanyak 12.114 g Tris dilarutkan dalam 100 mL akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer* hingga larut, lalu ditera pH-nya hingga 6.8 dengan penambahan HCl 1 M.

Amonium persulfat (APS) 10% b/v

Sebanyak 1 g APS dilarutkan dalam akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer*, lalu ditera hingga volume total 10 mL.

Bufér elektroforesis

Komposisi larutan terdiri dari 1.8026 g Tris, 8.6481 g glisin, dan 0.6 g SDS yang dilarutkan dalam 600 mL akuades sambil diaduk dengan *stirrer*, lalu ditera pH-nya hingga 8.3 dengan penambahan HCl 1 N.

Bufér sampel zimogram

Komposisi larutan terdiri dari 1.0 g SDS, 1.25 mL Tris-HCl 1 M pH 6.8, 2.0 mL gliserol 50 % v/v, dan 2 mL bromfenol biru 1% b/v sambil diaduk dengan *stirrer* dan ditera dengan akuades hingga volume total 10 mL.

Gliserol 50% v/v

Sebanyak 50 mL gliserol 100% dicampurkan dengan 50 mL akuades, lalu diaduk dengan *stirrer*.

Bromfenol biru 1% (b/v)

Sebanyak 0.1 g bromfenol biru dilarutkan dengan 10 mL akuades sambil diaduk dengan *stirrer*.

Larutan pewarna (staining solution)

Komposisi larutan terdiri dari 1.0 g *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 450 mL metanol, dan 100 mL asetat glasial yang diaduk dengan *stirrer* dan diencerkan dengan akuades hingga volume total 1000 mL.

Larutan peluntur (destaining solution)

Komposisi larutan terdiri dari 100 mL metanol, dan 100 mL asetat glasial yang diaduk dengan *stirrer* dan diencerkan dengan akuades hingga volume total 1000 mL.

Bufér fosfat 0.2 M pH 8.0

Komposisinya terdiri dari larutan A (0.2 M KH_2PO_4 : 2.7217 g KH_2PO_4 dalam 100 mL akuades) dan larutan B (0.2 M K_2HPO_4 : 3.4836 g K_2HPO_4 dalam 100 mL akuades). Bufér fosfat pH 8.0 dibuat dengan cara menambahkan 5.3 mL larutan A ke dalam 94.7 mL larutan B, sambil diaduk dan ditera pH-nya hingga mencapai pH 8.0.

Bufér fosfat 50 mM pH 8.0

Dilakukan pengenceran dari stok bufer fosfat 0.2 M pH 8.0 di atas.

Tween 20 2.5% v/v

Sebanyak 2.5 mL Tween 20 dilarutkan dalam 97.5 mL akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer* hingga larutan homogen.

Sampel enzim (ekstrak protease kasar *L. rubellus*, presipitat protease *L. rubellus*, dan lumbrokinase komersial)

Sebanyak 40 μ L sampel enzim dalam 10 μ L bufer sampel zimogram, lalu divorteks.

Fibrinogen 0.1% b/v

Sebanyak 0.01 g *bovine fibrinogen* dilarutkan dalam 10 mL bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (ditambahkan sedikit-sedikit), sambil diaduk dengan *stirrer*.

Fibrinogen 0.5% b/v

Sebanyak 0.25 g *bovine fibrinogen* dilarutkan dalam 50 mL bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (ditambahkan sedikit-sedikit), sambil diaduk dengan *stirrer*.

Trombin 50 NIH

Sebanyak 25 μ L *bovine thrombin* 2000 NIH dicampurkan dengan 975 μ L bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0 di dalam tabung eppendorf, lalu divorteks.

Trombin 10 NIH

Dilakukan pengenceran dari trombin 50 NIH di atas.

Bufer Tris-HCl 50 mM pH 8.0

Dilakukan pengenceran dari stok bufer Tris-HCl 2 M pH 8.0.

Bufer Tris-HCl 2 M pH 8.0.

Sebanyak 24.228 g Tris dilarutkan dalam 100 mL akuades (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil diaduk dengan *stirrer* hingga larut, lalu ditera pH-nya hingga 8.0 dengan penambahan HCl 2 M.

Larutan stok BSA 1 mg/mL

Sebanyak 100 mg BSA dilarutkan dalam 50 mL akuades (ditambahkan sedikit-sedikit), sambil diaduk pelan-pelan dengan *stirrer* agar tidak banyak membentuk busa. Setelah larut, larutan tersebut diencerkan dengan akuades hingga 100 mL.

Pereaksi Bradford

Sebanyak 100 mg *Coomassie Brilliant Blue* G-250 dilarutkan dalam 50 mL etanol 95%. Setelah itu ditambahkan 100 mL asam fosfat 85% (b/v), lalu diencerkan dengan akuades sampai 1 L, kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan ini dapat disimpan selama beberapa bulan pada suhu dingin (0–5°C).

Natrium hidroksida 1 M

Sebanyak 4 g NaOH dilarutkan di dalam 100 mL akuades.

Bufer universal

Larutan A: asam sitrat (6.008 g) + KH_2PO_4 (3.893 g) + H_3BO_3 (1.769 g) + asam dietilbarbiturat (5.266 g) dalam 1 L akuades

Larutan B: 0.2 N NaOH

Rumus: 100 mL larutan A + x mL larutan B

pH	A (mL)	B (mL)
8	100	63.7
9	100	72.7
10	100	80.8
11	100	86.0

Asam klorida 1 M

Sebanyak 9.8 mL HCl pekat diencerkan dengan akuades menjadi 72 mL.

Larutan bufer-kasein 2% b/v

Sebanyak 1 g kasein disuspensikan dengan 5 mL akuades di dalam gelas piala 100 mL, kemudian NaOH 1 M dan 30 mL akuades ditambahkan. Pengadukan dilakukan dengan *stirrer* hingga semua kasein larut. Setelah itu 5 mL bufer universal ditambahkan dan pH-nya ditepatkan menjadi 8.0 dengan menambahkan HCl 1 M. Larutan harus tetap diaduk agar tidak terjadi pengendapan kasein akibat penambahan HCl. Volume larutan ditepatkan hingga 50 mL dengan akuades.

Larutan tirosin standar 5 mM

Sebanyak 45.3 mg tirosin dilarutkan dalam 50 mL akuades. Larutan dapat disimpan hingga 2 minggu pada suhu 4°C.

Asam trikloroasetat (TCA) 0.1 M

Sebanyak 16.3 g TCA dilarutkan dalam 1 L akuades.

Natrium karbonat 0.4 M

Sebanyak 42.397 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 1 L akuades.

Pereaksi Folin Ciocalteu

Sebanyak 30 mL larutan Folin-Ciocalteu komersial dilarutkan dalam 60 mL akuades.

Lampiran 2. Penentuan dosis tepung cacing

Dosis standar

a. Manusia (asumsi berat badan = 70 kg):

$$3 \text{ kapsul} \times 250 \text{ mg/kapsul} = 750 \text{ mg}$$

b. Monyet (berat badan rata-rata 4 kg):

$$0.16 \times 750 \text{ mg} = 120 \text{ mg}$$

$$120 \text{ mg} + (20\% \times 120 \text{ mg}) = 144 \text{ mg} \approx 150 \text{ mg (pembulatan)}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis standar per kg berat badan (BB) monyet} &= 144 \text{ mg}/4 \text{ kg BB} \\ &= 36 \text{ mg/kg BB} \end{aligned}$$

Dosis tiga kali standar untuk monyet (berat badan rata-rata 4 kg):

$$3 \times 120 \text{ mg} = 360 \text{ mg}$$

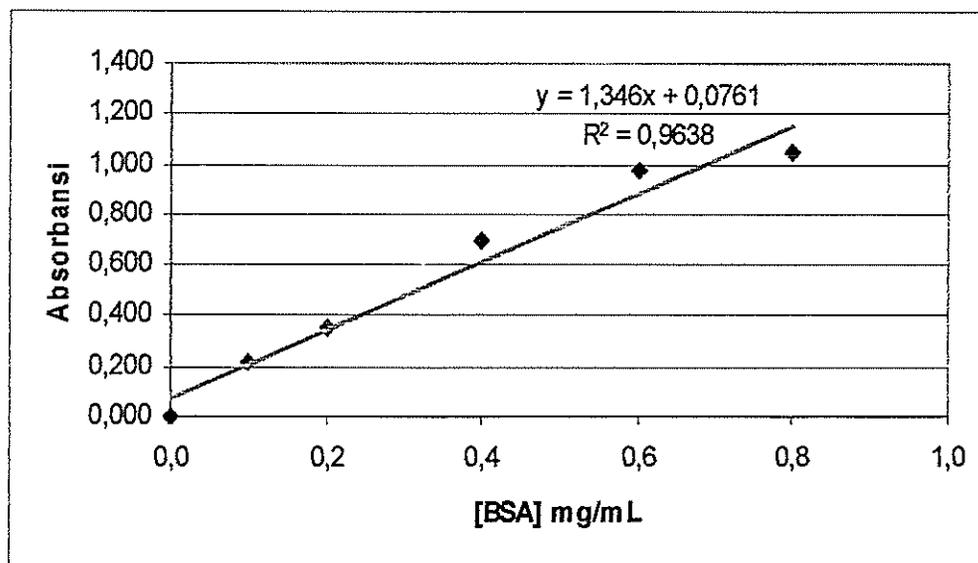
$$360 \text{ mg} + (20\% \times 360 \text{ mg}) = 432 \text{ mg} \approx 450 \text{ mg (pembulatan)}$$

Catatan: 0.16 adalah faktor konversi dari manusia (berat badan = 70 kg) ke monyet (berat badan = 4 kg)

Lampiran 3. Kurva standar Bradford

Tabel 11. Hubungan antara konsentrasi larutan standar BSA dengan nilai absorbansi

Konsentrasi BSA (mg/mL)	Nilai absorbansi
0,0	0,000
0,1	0,216
0,2	0,357
0,4	0,696
0,6	0,971
0,8	1,043



Gambar 13. Kurva standar Bradford

Lampiran 4. Data hasil uji parameter fibrinolitik, kadar glukosa, dan kadar trigliserida

Tabel 12. Data perubahan berat badan (kg) *Macaca fascicularis*

KP	Penggambilan Darah																												
	I					II					III					IV													
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5									
C	3,45	3,95	3,50	3,45	3,90	3,65	0,25	3,40	3,90	3,40	3,55	3,80	3,61	0,23	3,40	3,95	3,60	3,75	3,95	3,73	3,73	3,95	3,60	4,05	3,60	3,85	4,00	3,76	0,31
L	3,40	3,60	3,80	3,75	2,50	3,41	0,53	3,25	3,70	3,50	3,60	2,40	3,29	0,52	3,30	3,90	3,50	3,60	2,55	3,37	3,37	2,55	3,50	3,70	3,50	3,50	2,50	3,30	0,47
H	4,70	5,90	2,95	3,90	3,75	4,24	1,12	4,70	6,15	3,05	3,85	3,80	4,31	1,18	4,95	6,25	3,35	4,00	3,95	4,50	4,50	3,95	3,20	6,20	3,90	3,95	4,37	1,14	

Tabel 13. Data perubahan kadar trombosit ($\times 10^3/\mu\text{L}$ darah)

KP	Penggambilan Darah														
	I					IV									
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5					
C	351	381	261	411	239	328,6	75,2	374	359	306	239	357	327,0	55,5	
H	321	235	198	192	239	237,0	51,5	269	243	238	230	272	250,4	19,0	

Tabel 14. Data konsentrasi D-dimer (mg/L)

KP	Penggambilan Darah														
	I					IV									
	1	5	R	SD	1	5	R	SD	1	5					
C	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0					
H	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0					

Tabel 15. Data perubahan waktu protrombin (detik)

KP	Pengambilan Darah													
	I							IV						
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD
C	14,4	14,0	12,9	13,3	14,0	13,7	0,61	14,9	14,0	14,6	15,0	14,0	14,5	0,48
H	13,8	13,5	13,5	13,7	13,0	13,5	0,31	15,0	16,0	14,4	14,2	15,0	14,9	0,70

Tabel 16. Data perubahan waktu protrombin (INR)

KP	Pengambilan Darah													
	I							IV						
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD
C	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,78	0,04	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9	0,96	0,05
H	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,78	0,04	1,0	1,1	1,0	0,9	1,0	1,00	0,07

Tabel 17. Data perubahan volume serum pada retraksi bekuan (%)

KP	Pengambilan Darah																								%Chg				
	I							II							III							IV							
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3		4	5	R	SD
C	40	45	35	28	40	37,6	6,4	50	60	40	30	55	47,0	12,0	75	50	17	42	38	44,3	21,1	60	80	60	30	40	54,0	19,5	30,37
L	40	30	20	25	35	30,0	7,9	20	60	45	30	40	39,0	15,2	70	56	70	14	46	51,2	23,1	60	65	45	40	50	52,0	10,4	42,31
H	30	35	40	30	30	33,0	4,5	35	40	40	30	50	39,0	7,4	48	40	56	80	64	57,6	15,4	40	55	60	50	70	55,0	11,2	40,00

Tabel 18. Data perubahan waktu lisis bekuan darah utuh (jam)

KP	Pengambilan Darah																											
	I							II							III							IV						
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD
C	96	120	72	96	72	91,2	20,1	72	24	120	96	120	86,4	40,2	72	96	96	120	120	100,8	20,1	120	72	120	120	72	100,8	26,3
L	72	72	96	72	96	81,6	13,1	120	24	24	72	96	67,2	42,9	96	120	72	120	96	100,8	20,1	120	96	96	120	96	105,6	13,1
H	96	120	120	96	96	105,6	13,1	72	24	120	48	72	67,2	35,6	96	24	120	72	96	81,6	36,4	96	96	120	120	96	105,6	13,1

Tabel 19. Data perubahan kadar glukosa (mg/dL)

KP	Pengambilan Darah													
	I							IV						
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD
C	73	106	88	62	98	85,4	18,0	60	60	114	103	69	81,2	25,5
L	74	44	56	146	82	80,4	39,6	68	56	50	171	36	76,2	54,2
H	46	55	71	127	76	75,0	31,5	50	85	83	61	28	61,4	23,8

Tabel 20. Data perubahan kadar trigliserida (mg/dL)

KP	Pengambilan Darah													
	I							IV						
	1	2	3	4	5	R	SD	1	2	3	4	5	R	SD
C	Lo	Lo	109	Lo	75	92,0	24,0	37	27	25	23	29	28,2	5,4
L	102	72	104	86	Lo	91,0	15,0	75	71	88	Lo	83	79,3	7,7
H	137	79	Lo	101	95	103,0	24,5	27	37	19	37	26	29,2	7,8

Keterangan:

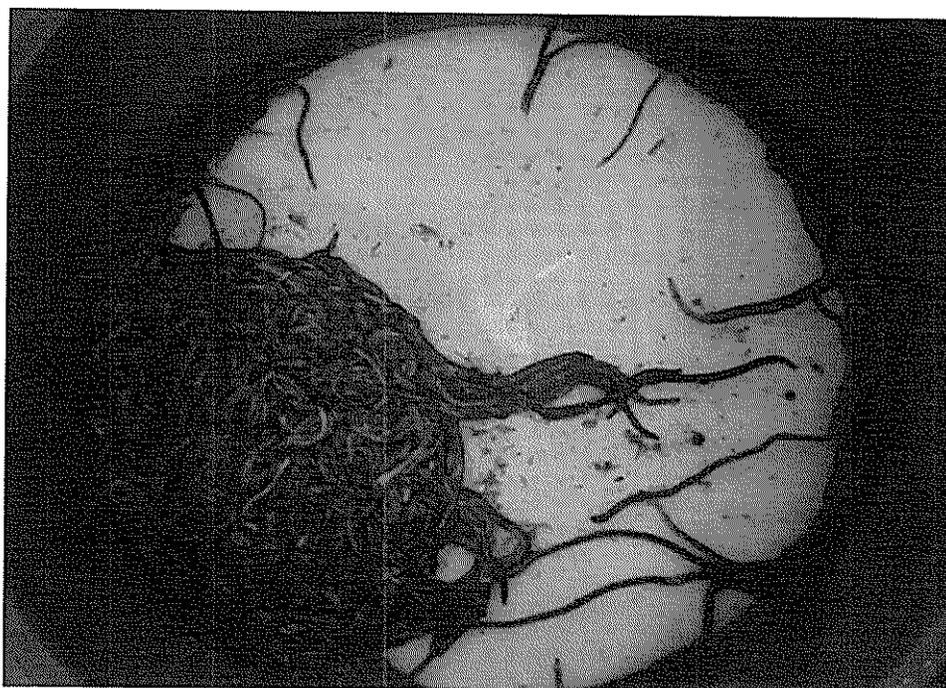
KP : kelompok

R : nilai rata-rata

SD : nilai standar deviasi

Lo : tidak terukur oleh alat

Lampiran 5. Cacing *Lumbricus rubellus*

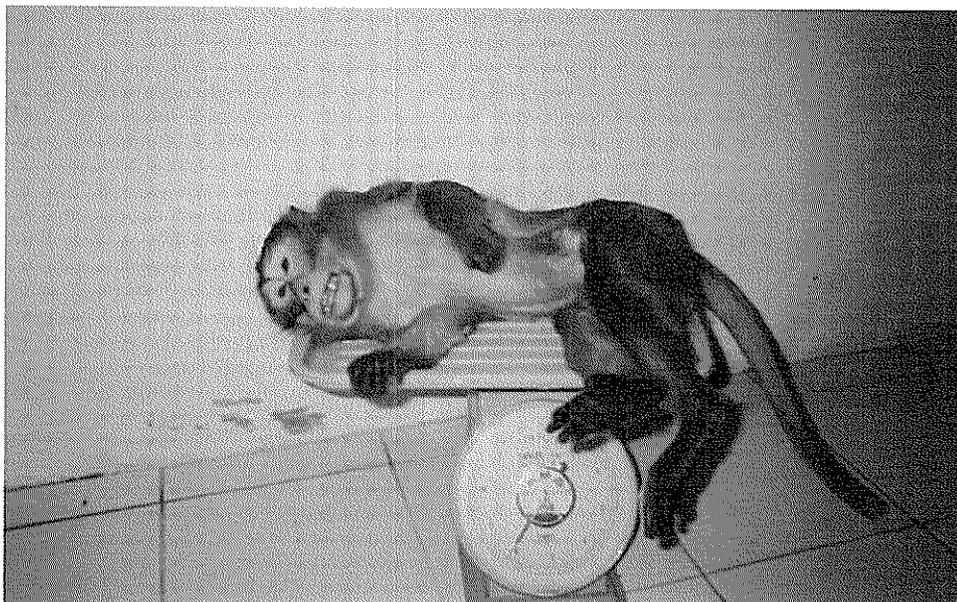


Gambar 14. Cacing *Lumbricus rubellus*

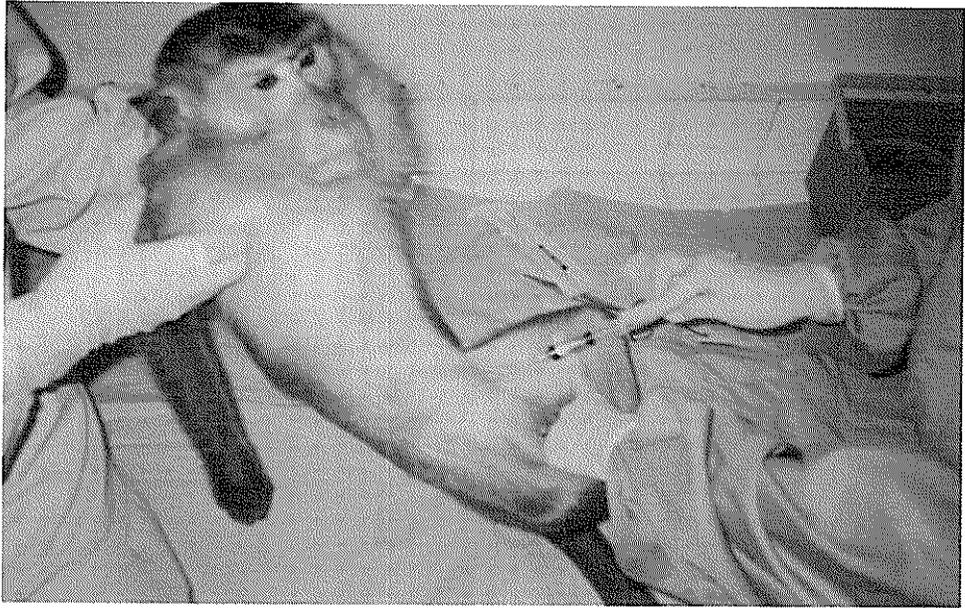
Lampiran 6. Monyet *Macaca fascicularis*



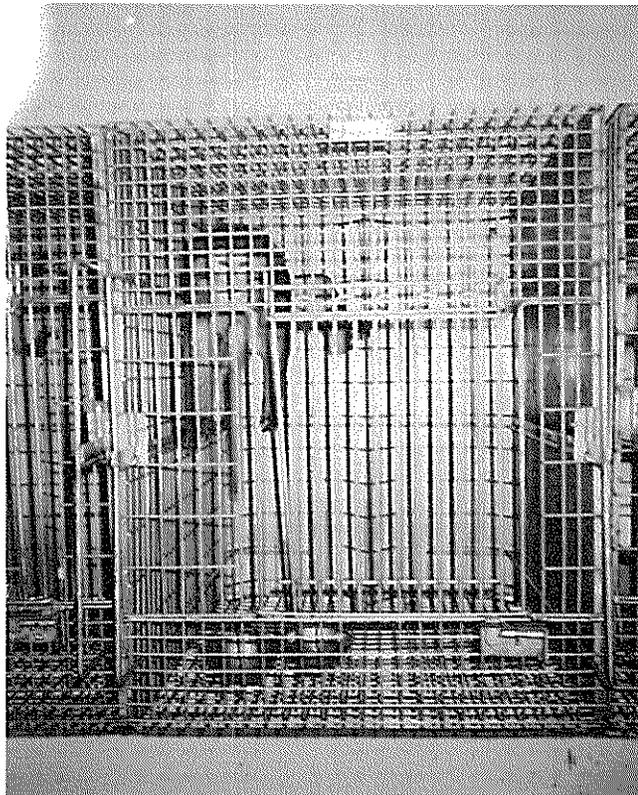
Gambar 15. Pemberian sirup pada monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 16. Penimbangan monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 17. Pengambilan darah monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 18. Kandang individu *Macaca fascicularis*