

1  
FTPG  
2004  
108

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK PROTEIN CACING TANAH  
(*Lumbricus rubellus*) SECARA *IN VITRO* DAN *IN VIVO* TERHADAP  
MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)**

Oleh :

**Eveline Rani Kusuma Subandrio**

**F02400102**



**2004**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**

## RINGKASAN

Cacing tanah *Lumbricus rubellus* atau yang dikenal sebagai *European earthworm* telah banyak dibudidayakan dan memiliki banyak manfaat. Berbagai jenis cacing tanah yang umum digunakan sebagai bahan obat, di antaranya adalah spesies *Lumbricus* sp., *Eisenia* sp., dan *Pheretima* sp. Protease cacing tanah dilaporkan memiliki kemampuan fibrinolitik yang dapat bekerja ganda, yaitu dapat mendegradasi fibrin/fibrinogen dalam thrombus secara langsung dan sekaligus mengaktivasi plasminogen dalam tubuh menjadi plasmin. Protease fibrinolitik (lumbrokinase) ini berpotensi untuk pengobatan kasus trombosis akut, seperti stroke, aterosklerosis, dan emboli paru.

Sebelum dilakukan produksi ekstrak protein, dilakukan penentuan konsentrasi ammonium sulfat yang akan digunakan (75% atau 65%). Ternyata presipitasi ammonium sulfat 65% menghasilkan ekstrak protein dengan aktivitas enzim dan konsentrasi protein yang lebih besar oleh karena itu selanjutnya produksi ekstrak protein dilakukan dengan presipitasi amonium sulfat kejenuhan 65%. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein cacing secara *in vitro* dan *in vivo* terhadap hewan laboratorium (monyet) dengan formulasi pakan. Selain itu uji *in vivo* juga merupakan uji pendahuluan terhadap keamanan ekstrak protein untuk dikonsumsi.

Dua pengujian aktivitas fibrinolitik secara *in vitro* yang dilakukan adalah cakram fibrin dan analisis zimogram. Sampel yang digunakan dalam cakram fibrin adalah ekstrak cacing, dengan aktivitas sebesar 0,0044 UA, ekstrak protein, dengan aktivitas sebesar 0,032 UA, dan larutan produk lumbrokinase komersial, dengan aktivitas sebesar 0,0013 UA. Uji cakram fibrin memberikan hasil nyata bahwa ekstrak protein dan lumbrokinase komersial memiliki aktivitas fibrinolitik yang tetap aktif selama inkubasi 24 jam. Dari besarnya diameter halo yang terbentuk, ekstrak protein dapat disimpulkan memiliki aktivitas fibrinolitik terbesar. Sampel yang diujikan dalam zimogram adalah ekstrak cacing (0,0088 UA), ekstrak protein (0,064 UA), dan lumbrokinase komersial (0,0026 UA) masing-masing sebanyak 10 $\mu$ l. Analisis zimogram menunjukkan bahwa ekstrak protein memiliki tujuh fraksi enzim, sedangkan lumbrokinase komersial memiliki enam fraksi enzim.

Ekstrak protein yang diujikan (amonium sulfat 65%) memiliki aktivitas spesifik (1,6045 UA/mg protein) 314,05% lumbrokinase komersial sedangkan aktivitas enzim per gram tepung cacingnya (310,51 UA/g) 630,03% lumbrokinase komersial. Karena adanya residu amonium sulfat sebesar 30%, jumlah ekstrak protein yang dikonsumsi oleh monyet perlakuan hanya sebesar 105 mg (168,47 UA) dan 315 mg (505,42 UA).

Pengujian *in vivo* melibatkan enam parameter uji darah, yaitu kadar D-Dimer, kadar trombosit, waktu protrombin, kadar glukosa, kadar trigilserida, dan waktu lisis bekuan darah utuh (Whole Blood Clot Lysis Time). Hasil pengujian D-Dimer terhadap darah monyet kontrol dan monyet perlakuan menunjukkan penurunan untuk kontrol (0,15  $\pm$  0,1 mg/L menjadi 0,1 mg/L) dan nilai yang konstan (0,1 mg/L) untuk monyet perlakuan.

Hasil pengukuran waktu protrombin menunjukkan bahwa terjadi penurunan waktu protrombin baik pada monyet perlakuan (14,8  $\pm$  0,91 detik menjadi 14,1  $\pm$  0,70

detik) maupun pada monyet kontrol ( $14,7 \pm 0,81$  detik menjadi  $14,1 \pm 0,638$  detik). Perbedaan penurunan waktu protrombin monyet perlakuan dan monyet kontrol hanya 0,1 detik. Dengan menggunakan satuan INR, hasil yang ditunjukkan sedikit berbeda, dimana penurunan waktu protrombin monyet perlakuan ( $1,00 \pm 0,1$  INR menjadi  $0,92 \pm 0,045$  INR) lebih besar daripada penurunan waktu protrombin monyet kontrol ( $0,96 \pm 0,055$  INR menjadi  $0,94 \pm 0,055$  INR). Sehingga selisih penurunan waktu protrombin antara monyet perlakuan dan kontrol dalam satuan INR adalah sebesar 0,06.

Hasil pengujian kadar trombosit menunjukkan sedikit kenaikan jumlah trombosit baik pada monyet kontrol maupun perlakuan. Namun kecilnya angka kenaikan tersebut ( $3,8 \times 1000/\mu\text{L}$  pada monyet kontrol dan  $16,2 \times 1000/\mu\text{L}$  pada monyet perlakuan) dapat diabaikan, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak protein cacing tanah tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah trombosit monyet sehat.

Hasil pengujian darah pada monyet perlakuan konsentrasi tinggi terjadi kenaikan sebesar 9,6 mg/dL, sedangkan pada monyet perlakuan konsentrasi rendah dan kontrol mengalami penurunan kadar gula darah masing-masing sebesar 31,8 mg/dL dan monyet kontrol 14,4 mg/dL. Pemberian ekstrak tepung cacing terhadap monyet perlakuan konsentrasi tinggi tidak memberikan dampak yang nyata terhadap penurunan kadar trigliserida monyet tersebut. Penurunan kadar trigliserida darah yang lebih nyata terjadi pada monyet kontrol, sedangkan pada monyet perlakuan penurunan kadar trigliserida yang terjadi sangat kecil.

Hasil pengujian WBCLT terhadap kelompok monyet kontrol dan perlakuan konsentrasi rendah menunjukkan hasil yang meningkat dari periode awal (baseline) sampai periode akhir (final). Pada monyet perlakuan konsentrasi rendah, nilai WBCLT tertinggi terjadi pada periode ke-3, dan selanjutnya pada periode terakhir terjadi penurunan kembali. Dilihat dari volume serum yang terbentuk di awal pembekuan darah, ketiga kelompok monyet menunjukkan kecenderungan yang sama yaitu terjadi peningkatan volume serum pada periode kedua, kemudian menurun pada periode ketiga, dan meningkat kembali pada periode keempat. Volume serum terbanyak terjadi pada periode kedua.

Selain keenam parameter uji tersebut, pengaruh pemberian ekstrak protein tepung cacing terhadap perubahan berat badan juga diperhatikan. Penimbangan dilakukan sebelum pengambilan darah monyet. Perbandingan berat badan monyet periode awal (baseline) dan akhir (final) menunjukkan sedikit penurunan pada monyet kelompok H sebesar 0,07 kg, sedangkan kelompok kontrol dan perlakuan L mengalami sedikit kenaikan masing-masing sebesar 0,04 kg dan 0,05 kg.

Hasil pengujian ekstrak protein secara *in vivo* tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap parameter-parameter pengujian. Berat badan ketiga kelompok monyet juga tidak menunjukkan perubahan yang nyata. Hal yang dapat disimpulkan dari pengujian secara *in vivo* adalah ekstrak protein tersebut aman, dan secara umum tidak memberi dampak negatif terhadap kondisi monyet perlakuan.

**UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK PROTEIN CACING TANAH  
(*Lumbricus rubellus*) SECARA *IN VITRO* DAN *IN VIVO* TERHADAP  
MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)**

**SKRIPSI**

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

**Oleh :**

**Eveline Rani Kusuma Subandrio**

**F02400102**

**2004**

**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR**

INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

---

UJI AKTIVITAS FIBRINOLITIK EKSTRAK PROTEIN CACING TANAH  
(*Lumbricus rubellus*) SECARA *IN VITRO* DAN *IN VIVO* TERHADAP  
MONYET EKOR PANJANG (*Macaca fascicularis*)

SKRIPSI

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

Oleh :

Eveline Rani Kusuma Subandrio

F02400102

Dilahirkan pada tanggal 30 Juni 1982

Di Semarang

Tanggal lulus: 8 DESEMBER 2004

Menyetujui,

Bogor, 20 DESEMBER 2004

  
Prof. Dr. Ir. Maggy. T. Suhartono

Dosen Pembimbing I

  
dr. Irma. H. Suparto

Dosen Pembimbing II

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah Bapa karena atas berkat dari-Nya skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik

Penulis mengucapkan terima kasih kepada

1. Prof. Dr. Ir. Maggy T. Suhartono selaku dosen pembimbing utama
  2. dr. Irma H. Suparto, MS atas segala bantuan dan saran yang diberikan selaku pembimbing pendamping
  3. Prof. Dr. Ir. Fransiska R. Zakaria, selaku dosen penguji dalam sidang.
  4. drh. I Nengah Budiarsa dan drh. Joko Pamungkas yang telah memberikan segala fasilitas untuk pelaksanaan penelitian
  5. drh. Diah Pawitri dari PSSP LPPM-IPB Darmaga atas segala saran dan bantuannya selama penelitian berlangsung.
  6. Staf PSSP LPPM-IPB Darmaga: drh. Susi, drh. Esther, bapak Yana, bapak Agus, bapak Umang, bapak Slamet, dan staf lainnya yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.
  7. Mamah dan papah, dua orang yang paling penulis sayang di dunia ini
  8. Yanti, MS atas dukungan moral dan bantuannya selama penelitian dan pembuatan skripsi
  9. Staf laboratorium Biokimia Universitas Katolik Atmajaya Jakarta atas segala fasilitas dan bantuannya selama penelitian berlangsung
  10. Erwin Ovianto, partner penelitian serta sahabat dalam suka dan duka.
  11. Miranti, Ito, Yadi, dan Atik, *my best friend*, tempat berbagi senang dan susah
  12. Keluargaku di RULITA: Mbak Fitri, Mbak Dhienna, Susan, Tika, Zikra, Tia, Emma, Dhika, Aisyah, dan Titin, yang selalu membuat penulis *feels like home*.
  13. Fajar Istiawan, yang walaupun jauh selalu terasa dekat.
  14. Warga laboratorium MB IPB atas segala saran dan bantuannya.
  15. Teman-teman angkatan 37 dan HEPI GIRLS untuk masa-masa indah yang sudah kita bagi bersama.
- Akhirnya kritik dan saran sangat penulis harapkan demi perbaikan tulisan selanjutnya.

Bogor, 24 Oktober 2004

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
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. Protease Cacing .....	4
C. Aplikasi Protease Cacing Sebagai Obat Trombolitik .....	6
D. Ekstraksi Enzim .....	10
E. Pemekatan Enzim .....	11
F. Mekanisme Pembentukan Trombus .....	11
G. Monyet Ekor Panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) .....	12
III. METODE PENELITIAN .....	15
A. BAHAN, ALAT, DAN HEWAN PERCOBAAN .....	15
B. BAGAN PROSEDUR PENELITIAN .....	16
C. METODE PENELITIAN .....	17
1. Produksi Ekstrak Protein Cacing dari ekstrak cacing <i>L. Rubellus</i> .....	17
2. Pengukuran Konsentrasi Protein dan Aktivitas Enzim Ekstrak Protein Cacing dan Produk Lumbrokinase Komersial .....	17
3. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein cacing dan enzim fibrinolitik komersial sejenis secara <i>in vitro</i> dengan metode cakram fibrin .....	19
4. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein cacing dan enzim fibrinolitik komersial sejenis secara <i>in vitro</i> dengan metode zimogram .....	19
5. Formulasi ekstrak protein cacing pada	

	berbagai dosis dan campurannya dalam pakan _____	20
6.	Seleksi monyet ekor panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) _____	20
7.	Uji potensi anti trombosis ekstrak protein cacing terhadap monyet _____	21
	a. Pengambilan darah dan plasma _____	21
	b. Uji Waktu Protrombin (PT) _____	21
	c. Uji Waktu Lisis Bekuan Darah Utuh _____	22
	d. Uji kadar trombosit _____	22
	e. Uji kadar trigliserida _____	23
	f. Uji kadar glukosa darah _____	23
	g. Uji D-Dimer _____	24
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN _____	25
	A. Pengujian In Vitro Ekstrak Protein Tepung Cacing _____	25
	1. Cakram Fibrin _____	27
	2. Analisis Zimogram _____	29
	B. Evaluasi Hasil Pengujian Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Protein Cacing Tanah <i>L. rubellus</i> Secara <i>In Vivo</i> terhadap Monyet Ekor Panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) _____	31
	1. Pengukuran Kadar D-Dimer _____	32
	2. Pengujian Waktu Protrombin ( <i>Prothrombine Time</i> ) _____	34
	3. Pengukuran Jumlah Trombosit _____	36
	4. Kadar Glukosa darah _____	38
	5. Pengukuran Kadar Trigliserida darah _____	40
	6. Uji Waktu Lisis Bekuan Darah Utuh (Whole Blood Clot Lysis Time) _____	41
	7. Perubahan Berat Badan Monyet Ekor Panjang _____	44
V.	KESIMPULAN DAN SARAN _____	46
	A. KESIMPULAN _____	46
	B. SARAN _____	47
	DAFTAR PUSTAKA _____	48
	LAMPIRAN _____	52



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Enzim-enzim Fibrinolitik dari berbagai Sumber dan Perbandingannya Satu Sama Lain _____	7
Tabel 2. Kebutuhan Nutrisi Rhesus dengan berat badan 3 kg _____	14
Tabel 3. Komposisi Pakan Olahan untuk Satwa Primata _____	14
Tabel 4. Nilai Aktivitas Enzim, Aktivitas Spesifik, Aktivitas Enzim per Gram Tepung Cacing, dan Konsentrasi Protein Ekstrak Protein Tepung Cacing dan Produk Lumbrokinase Komersial _____	26
Tabel 5. Data perubahan berat badan (kg) <i>Macaca fascicularis</i> _____	56
Tabel 6. Data perubahan kadar trombosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ darah) _____	56
Tabel 7. Data konsentrasi D-dimer (mg/L) _____	56
Tabel 8. Data perubahan waktu protrombin (detik) _____	57
Tabel 9. Data perubahan waktu protrombin (INR) _____	57
Tabel 10. Data perubahan kadar glukosa (mg/dL) _____	57
Tabel 11. Data perubahan kadar trigliserida (mg/dL) _____	58
Tabel 12. Data perubahan waktu lisis bekuan darah utuh (jam) _____	58
Tabel 13. Data perubahan volume serum pada retraksi bekuan (%) _____	58
Tabel 14. Hubungan antara konsentrasi larutan standar BSA dengan nilai absorbansi _____	59

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Mekanisme kerja lumbrokinase sebagai obat trombolitik _____	10
Gambar 2. (A) Kondisi <i>Cakram fibrin</i> Awal (0 jam), (B) Kondisi <i>Cakram fibrin</i> Setelah 1 jam inkubasi 37°C, (C) Kondisi <i>Cakram fibrin</i> Setelah 3 jam inkubasi 37°C, (D) Kondisi <i>Cakram fibrin</i> Setelah 6 jam inkubasi 37°C, (E) Kondisi <i>Cakram fibrin</i> Setelah 24 jam inkubasi 37°C _____	28
Gambar 3. Gel Hasil Running Zimogram dari sampel Ekstrak Protein (R), enzim kasar (E), dan produk lumbrokinase komersial(P) _____	30
Gambar 4. Grafik Perubahan Nilai D-Dimer Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi _____	34
Gambar 5. Grafik Perubahan Nilai Waktu Protrombin (dalam detik) Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi _____	35
Gambar 6. Grafik Perubahan Nilai Waktu Protrombin (dalam INR) Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi _____	36
Gambar 7. Grafik Perubahan Jumlah Trombosit (1000/ ml) Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi _____	37
Gambar 8. Grafik Perubahan Kadar Gula Darah Ketiga Kelompok Monyet pada Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing _____	40
Gambar 9. Grafik Perubahan Kadar Triglicerida Kelompok Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi pada Kondisi <i>Baseline</i> dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing _____	41
Gambar 10. Perubahan Nilai WBCLT (waktu lisis bekuan darah) Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing _____	43
Gambar 11. Perubahan Volume Serum Darah Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing Selama Empat Perode (30 hari) _____	43
Gambar 12. Perubahan Berat Badan Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing Selama Empat Periode (30 hari) _____	45
Gambar 13. Kurva standar Bradford _____	59

Gambar 14. Cacing <i>Lumbricus rubellus</i> dalam Akuades	60
Gambar 15. Cacing <i>Lumbricus rubellus</i> Setelah Perendaman dalam Akuades	60
Gambar 16. Penimbangan monyet <i>Macaca fascicularis</i>	61
Gambar 17. Pemberian sirup pada monyet <i>Macaca fascicularis</i>	61
Gambar 18. Pengambilan darah monyet <i>Macaca fascicularis</i>	62
Gambar 19. Kandang individu <i>Macaca fascicularis</i>	62

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Daftar Pereaksi yang Digunakan dan Cara Pembuatannya _____	53
Lampiran 2. Tabel Data Hasil Pengujian <i>In Vivo</i> _____	56
Lampiran 3. Tabel Absorbansi Standar BSA dan Kurva Standar Konsentrasi Protein _____	59
Lampiran 4. Cacing Tanah <i>Lumbricus rubellus</i> _____	60
Lampiran 5. Monyet Ekor Panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) dan Penanganannya _____	61
Lampiran 6. Perhitungan Dosis Pemberian Ekstrak Protein Cacing Kepada Monyet Ekor Panjang ( <i>Macaca fascicularis</i> ) _____	63

## I. PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Ekstrak cacing tanah sudah lama digunakan sejak ribuan tahun silam dalam pengobatan tradisional di negara-negara Asia Timur, seperti Cina, Jepang, dan Korea. Cacing tanah diyakini memiliki khasiat untuk menyembuhkan berbagai penyakit, di antaranya tifus, hipertensi, hipotensi, dan diabetes mellitus. Cacing tanah juga dilaporkan memiliki efek antipiretik, antidiuretik dan terapeutik yang potensial. Berbagai jenis cacing tanah yang umum digunakan sebagai bahan obat, di antaranya adalah spesies *Lumbricus* sp., *Eisenia* sp., dan *Pheretima* sp (Palungkun 1999; Rukmana 1999).

Protease *L. rubellus* atau Lumbrokinase (EC. 3.4.21.99) pertama kali diekstrak dan dimurnikan dari cacing tanah *Lumbricus rubellus*. Ekstrak cacing tanah *Lumbricus rubellus* dilaporkan memiliki sejumlah enzim protease fibrinolitik (lumbrokinase) yang berpotensi untuk pengobatan kasus trombosis akut, seperti stroke, aterosklerosis, dan emboli paru (Mihara *et al.* 1991; Nakajima *et al.* 1993). Pasien trombosis yang pembuluh darahnya mengalami sumbatan akibat tumpukan fibrin dalam darah (trombus) dapat diobati dengan terapi enzim ini. Enzim ini memiliki aktivitas fibrinolitik yang bekerja ganda, yaitu aktivitas untuk mendegradasi fibrin dalam thrombus dan sekaligus mengaktivasi plasminogen menjadi plasmin. Seiring dengan pertambahan usia, jumlah plasmin dalam tubuh cenderung menurun secara alami sehubungan dengan menurunnya kerja trombin (aktivator alami) yang menstimulasi plasminogen menjadi plasmin. Oleh karena itu, pasien trombosis memerlukan asupan enzim fibrinolitik tersebut dari luar tubuh.

Berbagai enzim fibrinolitik komersial seperti streptokinase, staphylokinase, urokinase, dan t-PA rekombinan (reteplase, alteplase) telah diaplikasikan untuk terapi trombolitik pada pasien trombosis akut (Mycek *et al.* 2001; Katzung 2002). Sayangnya, enzim tersebut hanya dapat dikonsumsi dalam bentuk injeksi intravena sehingga pengobatan terhadap pasien harus dilakukan di rumah sakit dan harganya relatif mahal. Hal ini disebabkan sumber enzim dari bakteri (streptokinase dari spesies *Streptococcus*  $\beta$ -

*hemoliticus* dan staphylokinase dari spesies *Staphylococcus* sp.) dapat menyebabkan sifat alergik yang rentan pada manusia bila dikonsumsi secara oral. Sementara urokinase yang diekstrak langsung dari sel ginjal manusia umumnya sediaanannya sangat terbatas sehingga harganya menjadi sangat mahal. Enzim rekombinan juga diproduksi dengan biaya tinggi sehingga harganya relatif tidak ekonomis.

Kelebihan utama lumbrokinase dari cacing *L.rubellus* ini yaitu dapat dikonsumsi secara oral dalam bentuk kapsul gel sehingga pasien dapat melakukan pengobatan sendiri dengan biaya lebih ekonomis. Uji *in vivo* terhadap lumbrokinase menunjukkan bahwa enzim ini memiliki aktivitas fibrinolitik yang tinggi, aman dikonsumsi, non toksik, non alergenik, dan tidak berefek samping terhadap fungsi organ tubuh, seperti jantung, ginjal, hati, sistem pernafasan, dan sistem saraf (Mihara et al., 1991). Berdasarkan hal tersebut, maka enzim ini sangat potensial untuk dikembangkan sebagai obat anti trombosis baru.

## **B. TUJUAN DAN SASARAN**

Penelitian ini bertujuan untuk (1) menguji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein dan membandingkan aktivitas fibrinolitik ekstrak protein dan lumbrokinase komersial (Plasmin) secara *in vitro*, (2) melakukan uji *in vivo* aktivitas fibrinolitik ekstrak protein, yang diperoleh dengan pengendapan amonium sulfat 65%, terhadap hewan laboratorium (monyet ekor panjang) dengan mencampur (formulasi) ekstrak protein cacing dalam pakan hewan tersebut yang juga merupakan uji pendahuluan terhadap keamanan ekstrak protein cacing.

Sasaran dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan produk pangan dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* yang memiliki beragam manfaat bagi kesehatan, terutama aktivitas fibrinolitiknya.

## **C. MANFAAT**

Manfaat dari penelitian ini adalah mengembangkan aplikasi cacing tanah *Lumbricus rubellus* sebagai bahan pangan yang memiliki aktivitas medis.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*

Cacing tanah *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 ini mampu menghasilkan kompos dari bahan organik dalam jumlah besar, berkembang biak pada media yang rendah nutrisi, dan daya reproduksinya tinggi (106 kokon/tahun).

Cacing *L.rubellus* termasuk salah satu jenis cacing tanah yang telah dibudidayakan di berbagai negara, di samping cacing tanah *Eisenia foetida*, *Pheretima asiatica*, dan *Peryonix exavatus*. Hegner and Engemann (1968) mengklasifikasikan cacing tanah *L.rubellus* sebagai berikut:

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

Ciri-ciri fisik cacing *L.rubellus* digambarkan sebagai berikut: tubuh gilig dengan bagian ventral pipih, panjang tubuh 7,5-10 cm, warna tubuh bagian punggung (dorsal) coklat cerah sampai ungu kemerah-merahan, warna tubuh bagian ventral krem, dan bagian ekor kekuning-kuningan, jumlah segmen 95-100, klitelum berbentuk sadel dan menonjol, jumlah segmen pada klitelum antara 6-7 segmen yang berada pada segmen ke- 27-32, lubang kelamin jantan terletak pada segmen ke-14 dan lubang kelamin betina pada segmen ke-13, penyebaran seta Lumbricine, bergerak kurang aktif, dan kadar air berkisar 70-78% (Edward & Lofty 1977; Minnich 1977; Rukmana 1999). Secara umum, cacing tanah memiliki sifat hermaprodit biparental, nocturnal, peka terhadap cahaya, sentuhan, dan getaran, memiliki klitelum, tidak memiliki gigi, dan rentan pada berbagai minyak dan deterjen (Palungkun 1999).

Cacing *L.rubellus* telah dimanfaatkan secara luas untuk berbagai keperluan, seperti: penghasil pupuk organik, bahan pakan ternak dan ikan, umpan pancing, bahan baku obat dan kosmetik, dan bahan baku makanan dan minuman (Palungkun 1999). Cacing mampu mengurai bahan organik menjadi pupuk (kascing) yang kaya unsur N, P, K, S, dan sebagainya. Cacing dapat dijadikan alternatif bahan baku untuk pakan ternak dan ikan sehubungan dengan kandungan proteinnya yang tinggi (64-76%). Sebagai obat tradisional, cacing diyakini ampuh menyembuhkan berbagai penyakit, seperti tifus dan demam panas. Ekstrak cacing juga mengandung berbagai enzim dan asam amino esensial yang potensial untuk menghaluskan dan melembutkan kulit sehingga dapat diaplikasikan sebagai bahan baku kosmetik. Sekarang ini, berbagai produk pangan berbahan baku cacing juga mulai digemari oleh masyarakat Asia dan Eropa, seperti: *vermijuice*, *wormburger*, *worm spaghetti*, *crispy worm*, dan *verne de terre*.

Secara umum, kandungan gizi pada cacing sebagai berikut: protein (64-76%), lemak (7-10%), Ca (0,55%), P (1%), dan serat kasar (1,08%) (Palungkun 1999). Komposisi asam amino cacing tanah terdiri atas 9 asam amino esensial (arginin, histidin, leusin, isoleusin, lisin, metionin, fenilalanin, treonin, dan valin) dan 4 asam amino non esensial (sistein, glisin, serin, dan tirosin).

Penelitian awal menunjukkan bahwa ekstrak cacing *L.rubellus* menunjukkan aktivitas berbagai enzim pada substrat tertentu, antara lain: protease,  $\alpha$ -amilase, lipase, amiloglukosidase, kitinase, dan selulase (tidak dipublikasikan). Khusus protease cacing *L.rubellus*, enzim ini sering dikaitkan dengan fungsi barunya sebagai obat trombolitik sehubungan dengan kemampuan fibrinolitiknya yang potensial.

## **B. Protease Cacing**

Protease merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan peptida pada protein dengan bantuan molekul air. Sumber protease berasal dari hewan, tumbuhan, dan mikroba. Enzim ini bisa diproduksi secara ekstraseluler dan intraseluler. Cacing tanah mensekresikan protease secara intraseluler.



Mihara *et al.* (1986, 1991) pertama kali berhasil mengekstrak dan memurnikan enam fraksi protease dari cacing *L.rubellus* yang diberi nama generik lumbrokinase. Enzim tersebut memiliki aktivitas proteolitik dan fibrinolitik yang potensial dan tahan terhadap solven organik, termasuk toluena dan n-heksana (Nakajima *et al.* 2000). Enzim ini mampu mendigesti berbagai substrat protein, seperti kasein, elastin, hemoglobin, kolagen, albumin, dan keratin, dan mengkatalisis hidrolisis ester, terutama etil asetat dan bioplastik poli (R)3-hidroksibutirat (Nakajima *et al.* 2000).

Lumbrokinase 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).

Bila ditinjau dari sifat kimia sisi aktifnya, lumbrokinase 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. Protease serin umumnya bekerja aktif pada kondisi pH netral dan alkali (pH 7-11) dan dihambat spesifik oleh senyawa fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF), diisopropil fluorofosfat (DFP), N $\alpha$ -p-tosil-L-lisin klorometilketon (TLCK), *soybean trypsin inhibitor* (SBTI), dan *lima bean trypsin inhibitor* atau aprotinin (LBTI). Khusus mikroba, protease serin terbagi dalam beberapa jenis, antara lain: protease serin serupa tripsin, alkali,  $\alpha$ -litik *Myxobacter*, dan stafilokokal (Suhartono 1992).

Mihara *et al.* (1991) melaporkan bahwa ekstrak lumbrokinase dari *L.rubellus* dihambat spesifik oleh senyawa DFP, LBTI, dan SBTI. Adanya reaksi antara DFP dengan gugus hidroksil dari residu serin pada sisi aktif enzim menyebabkan enzim mengalami inaktivasi. Lumbrokinase juga dihambat oleh TLCK, tapi tidak dipengaruhi oleh EDTA dan  $\epsilon$ -asam amino kaproat. Hal ini membuktikan bahwa enzim tersebut tergolong protease serin serupa tripsin (Park *et al.* 1998). Umumnya, ciri-ciri protease serin serupa tripsin, antara lain: aktif pada pH 8, bobot molekul sekitar 20 kD, nilai pI sekitar 4, dan sensitif terhadap inhibitor DFP dan TLCK (Suhartono 1989). 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).

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). Hasil analisis SDS-PAGE menunjukkan bahwa protease murni *L.rubellus* terdiri atas enam fraksi enzim dengan ukuran molekul 23,5; 27,4; 27; 28,5; 34; dan 34,2 kD (Mihara *et al.* 1991) dan 24, 27, 36, 38, 40, dan 43 kD (Nakajima *et al.* 1993). Sementara, Park *et al.* (1998) hanya mendapatkan dua fraksi protease *L.rubellus* dengan bobot molekul 34 dan 34,2 kD. Komposisi asam aminonya memperlihatkan bahwa lumbrokinase kaya akan asam amino asparagin dan asam aspartat, tetapi miskin akan lisin dan prolin (Mihara *et al.* 1991; Nakajima *et al.* 1993). Selain itu, lumbrokinase tidak mengandung gula (Nakajima *et al.* 1993).

Berdasarkan penelitian, protease cacing dapat diserap dengan baik oleh dinding usus halus dengan metode lemari inkubasi [Vilhard dan Lundin, *Acta Physiol. Scand.* 126(1986)601-607]. Enzim dapat dideteksi di dalam sel epitelium usus halus dengan *immunohistochemistry*. Protease cacing ditemukan berada di dalam serum atau plasma setelah injeksi intraperitoneal ke hewan tikus. Kurang lebih 10% dari enzim utuh dapat dipindahkan melalui epitelium usus halus. Aktivitas yang tersisa maksimum dapat dikaji sekitar 60 menit setelah injeksi intraperitoneal (Fan *et al.*, 2001).

### **C. Aplikasi Protease Cacing Sebagai Obat Trombolitik**

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 gumpalan darah (trombin). Aplikasi obat trombolitik ditujukan untuk pencegahan penyakit trombosis, seperti infark jantung, serebrovaskuler, dan emboli paru.

Secara umum, obat trombolitik dibedakan atas dua kelompok, yaitu fibrinolisin (elase) dan zat activator plasminogen/ZAP (Tjay & Rahardja 2002). Elase merupakan enzim fibrinolitik yang langsung merombak jaringan-fibrin dari trombus dan protein plasma lainnya, seperti fibrinogen, faktor beku

V dan VIII. Sementara ZAP bekerja secara tak langsung dengan jalan menstimulasi perubahan plasminogen menjadi plasmin aktif yang selanjutnya melarutkan fibrin dalam trombus melalui sistem fibrinolisis. Umumnya ZAP berupa enzim yang berdaya fibrinolitik, seperti streptokinase, urokinase, staphylokinase, anistreplase, activator plasminogen-jaringan (*tissue-plasminogen activator*; t-PA), alteplase, dan reteplase. Berikut ini tabel yang menyajikan berbagai enzim fibrinolitik dan perbandingannya satu sama lain.

Tabel 1. Enzim-enzim Fibrinolitik dari berbagai Sumber dan Perbandingannya Satu Sama Lain

Nama enzim	Asal	Karakteristik	Mekanisme kerja	Kelebihan	Kekurangan
Streptokinase	protein ekstraseluler diisolasi dari filtrat kultur <i>Streptococcus β-hemolyticus</i>	--	membentuk kompleks aktif dengan plasminogen (1:1) yang selanjutnya mengkatalisis plasminogen bebas menjadi plasmin aktif <sup>a</sup>	Murah Banyak tersedia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• antigenik</li> <li>• Tidak spesifik terhadap thrombus</li> <li>• pendarahan</li> </ul>
Urokinase	Kultur sel jaringan ginjal manusia	--	Mengaktifkan plasminogen, mendegradasi fibrinogen dan fibrin <sup>b,c</sup>	toksisitasnya rendah, tidak menyebabkan alergi, tanpa efek samping, afinitas lebih selektif saat pembentukan thrombus <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mahal</li> <li>• sulit diperoleh</li> <li>• Berperan dalam pembentukan tumor dan metastasis<sup>d</sup></li> </ul>
Fibrolase	Venom dari ular kepala-tembaga selatan <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	metaloprotein	mendegradasi fibrin yang berikatan dengan <i>clot</i> darah kaya trombosit <sup>f</sup>	<i>nonhaemorrhagic</i>	Injeksi intravena (kurang praktis)
Anistreplase ( <i>anisoylated plasminogen streptokinase activator complex</i> ; APSAC)	kompleks plasminogen manusia murni dan streptokinase bakteri yang telah diasilasi untuk melindungi situs aktif enzim <sup>g</sup>	--	kelompok asil secara spontan dihidrolisis dan membebaskan kompleks-streptokinase-plasminogen yang diaktifkan. Plasmin yang terbentuk akan menguraikan jaringan fibrin	selektivitas bekuan lebih tinggi aktivitas trombolitik lebih kuat dan lama.	Injeksi intravena (kurang praktis)

Lanjutan tabel 1. Enzim-enzim Fibrinolitik dari Berbagai Sumber dan Perbandingannya Satu Sama Lain

Nama enzim	Asal	Karakteristik	Mekanisme kerja	Kelebihan	Kekurangan
t-PA ( <i>tissue Plasminogen Activator</i> )	teknologi DNA rekombinan, hasilnya seperti alteplase dan reteplase	Alteplase merupakan t-PA manusia yang belum dimodifikasi, Reteplase adalah t-PA manusia yang beberapa sekuen asam aminonya telah dihilangkan <sup>i</sup>	mengaktifkan plasminogen yang terikat pada fibrin dan membatasi fibrinolisis pada thrombus yang terbentuk saja <sup>h</sup>	--	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pendarahan</li> <li>•Degenerasi neural (oleh N-metil-D-aspartat (NMDA) dan kainat)<sup>j</sup></li> <li>•Injeksi intravena</li> <li>•Waktu paruh singkat</li> </ul>
Desmoteplase	saliva kelelawar penghisap darah ( <i>Desmodus rotundus</i> )	--	Mengaktifkan plasminogen	tidak mengakibatkan degenerasi neural karena sifatnya yang lebih dependen dan spesifik fibrin <sup>k</sup> mengakibatkan lebih sedikit fibrinogenolisis dan konsumsi antiplasmin daripada t-PA <sup>l</sup>	Injeksi intravena (kurang praktis)
Nattokinase	Natto (makanan tradisional Jepang, dibuat dari kedelai rebus yang difermentasi dengan ( <i>Bacillus subtilis natto</i> ))	B.M. 20000 ± 5000 Stabil terhadap suhu sampai 60°C, dan pH kelarutan 6 - 12	Meningkatkan t-PA, mendegradasi fibrin secara langsung, mengubah prourokinase menjadi urokinase	Penggunaan secara oral Mencegah koagulasi darah Mendorong thrombi untuk terlarut Nontoksik <sup>m</sup>	--

**Keterangan:** <sup>a,b,g</sup> Mycek *et al.* (2001), <sup>c,g,l</sup> Katzung (2002), <sup>d,m</sup> Milner dan Makise (2002), <sup>e</sup> Suhartono (1992), <sup>f</sup> Swenson *et al.* (2000), <sup>j,k,l</sup> Liberatore *et al.* (2003)

Selain produk-produk di atas, beberapa produk-produk alamiah juga memiliki aktivitas fibrinolitik, seperti bromelain, bawang putih, dan ginseng Cina. Bromelain memiliki kemampuan untuk mengaktivasi fibrinolisis melalui stimulasi produksi plasmin, sedangkan bawang putih, goreng maupun mentah, meningkatkan aktivitas serum fibrinolitik secara signifikan dan mengurangi

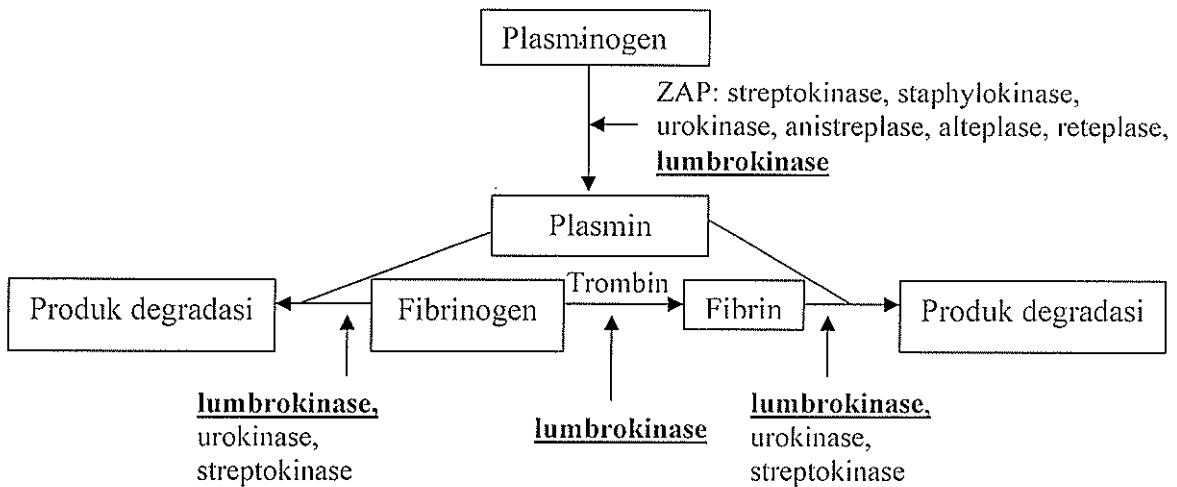
fibrinogen serta fibrinopeptida sebanyak 10%. Ginseng Cina atau ginseng Panax menghambat konversi fibrinogen menjadi fibrin. Mekanisme ginseng adalah melalui promosi aktivitas fibrinolitik urokinase (Milner dan Makise, 2002).

Baru-baru ini, lumbrokinase dari cacing *L.rubellus* menunjukkan potensinya sebagai alternatif obat trombolitik baru yang bersifat aman, tidak toksik, dan tidak menimbulkan efek samping terhadap fungsi jantung, hati, ginjal, sistem respirasi, dan sistem saraf (Mihara *et al.* 1991). Lumbrokinase merupakan enam fraksi protease serin yang diekstraksi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* (Mihara *et al.* 1986, 1991). Kelebihan lumbrokinase adalah dosisnya diberikan secara administrasi oral, sedangkan enzim trombolitik komersial lainnya (streptokinase, urokinase, anistreplase, alteplase, dan lainnya) harus diberikan secara injeksi intravena.

Secara umum, mekanisme kerja lumbrokinase sebagai obat trombolitik meliputi tiga tahapan, yaitu menstimulasi plasminogen menjadi plasmin, menghidrolisis fibrin hingga larut, dan mendegradasi fibrinogen. Di samping itu lumbrokinase juga dapat berperan sebagai trombin yang mengkatalisis polimerisasi fibrinogen menjadi fibrin (Gambar 1).

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 mampu mendigesti fibrin dengan atau tanpa plasminogen sehingga dapat berpotensi sebagai ZAP dan pendigesti langsung. Penelitian selanjutnya, uji *in vivo* lumbrokinase pada hewan laboratorium (tikus, kelinci) menunjukkan bahwa enzim 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).

Jin *et al.* (2000) 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 darah. Terapi lumbrokinase sebagai obat trombolitik mampu menurunkan kadar trombosit para pasien tersebut. Selain aterosklerosis, terapi enzim ini juga telah diterapkan pada penderita penyakit infark jantung, cerebrovascular, dan emboli paru.



Gambar 1. Mekanisme kerja lumbrokinase sebagai obat trombolitik (Yanti, 2003)

#### D. Ekstraksi enzim

Ekstraksi protease cacing dilakukan dengan cara pengeringan (oven vakum), 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 minim, dan tidak mengalami degradasi selama proses. Nakajima *et al.* (2000) menyatakan bahwa protease cacing dari tepung *L.rubellus* cukup stabil (aktivitas relatif >80%) pada penyimpanan suhu ruang hingga lima tahun. Ekstrak enzim cair diperoleh dengan cara melarutkan tepung cacing dalam medium ekstraksi, lalu disentrifugasi untuk memisahkan ekstrak enzim dari campuran sel debris.

Berbagai paten internasional telah merumuskan metode praktis untuk membuat tepung *Lumbricus* (US patent 5,576,026, US patent 5,128,148, JP patent 1,047,720A2) meliputi: proses pembersihan cacing dengan cara perendaman dalam larutan garam, mastikasi dengan cara penggerusan cacing, hidrolisis dengan penambahan aditif, asam, dan lisozim, pembekuan cacing pada suhu -60 hingga -10°C, dan pengeringan dengan liofilisasi, oven vakum, dan pengeringan semprot.

## **E. Pemekatan enzim**

Pemekatan enzim dilakukan untuk memisahkan konsentrat protein dari komponen biomolekul lainnya (karbohidrat, lipid, dan asam nukleat). Berbagai metode pemekatan yang lazim digunakan dalam pemurnian enzim, antara lain: presipitasi dengan garam, pelarut organik, dan polimer, dialysis, ultrafiltrasi, dan liofilisasi.

Presipitasi dengan garam (ammonium sulfat, sodium sulfat) lebih disukai daripada presipitasi dengan pelarut organik (etanol, aseton), dengan alasan pelarut organik cenderung mendenaturasi protein pada suhu agak tinggi, harga mahal, dan mudah terbakar. Selain itu, presipitasi dengan pelarut organik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi pelarut organik, konsentrasi protein, kekuatan ionik, pH dan suhu (Suhartono 1989).

Garam amonium sulfat dipilih karena solubilitasnya tinggi, harganya murah, non toksik, dan tidak mempengaruhi struktur protein. Sementara, presipitasi dengan polimer (polietilen glikol) sama halnya dengan presipitasi pelarut organik. Hanya saja, polietilen glikol lebih mudah ditangani daripada pelarut organik karena tidak mudah terbakar, tidak toksik, tidak bermuatan, dan murah.

Sisa garam dari proses presipitasi enzim dapat dihilangkan dengan cara dialisis menggunakan kantong selofan dan ultrafiltrasi. Dengan demikian, konsentrat enzim bebas garam dapat dimurnikan lebih lanjut melalui fraksinasi enzim.

## **F. Mekanisme Pembentukan Trombus**

Gumpalan dapat terbentuk di arteri, vena, maupun pada jantung. Thrombi di arteri terbentuk di bawah tekanan dan kondisi aliran tinggi serta terbentuk dari agregat platelet (trombosit) yang diikat bersama oleh benang-benang fibrin. Gumpalan di vena terbentuk di bawah kondisi aliran lambat dan terbentuk terutama dari sel darah merah, sedikit platelet, dan mengandung benang-benang fibrin dalam jumlah besar. Thrombi ini dapat statis di dalam pembuluh, namun dapat juga bergerak atau menjadi emboli (Milner dan Makise, 2002).

Platelet melepaskan faktor-pertumbuhan turunan platelet (PDGF) yang menyebabkan sel otot polos pada dinding arteri berproliferasi. Sel otot polos

selanjutnya memiliki permeabilitas yang meningkat terhadap platelet dan lipid, terutama LDL. Seiring peningkatan LDL, semakin jauh LDL berpenetrasi ke dalam dinding arteri. Plak terbentuk di dalam dinding arteri sebagai mutasi monoklonal. Ekses fibrin, radikal bebas, peradangan kronis, kolesterol teroksidasi, LDL teroksidasi, hidrokarbon lingkungan, dan factor lainnya memicu terjadinya mutasi (Milner dan Makise, 2002).

Menurut hipotesis radikal bebas, peroksida lipid merusak dinding arteri, meningkatkan permeabilitasnya lebih jauh, serta menambah peningkatan oksidasi lipid, terutama LDL. Radikal bebas menyerang dinding arteri dan mengaktifkan proliferasi sel dan duplikasi sel abnormal. Proliferasi sel ini meningkatkan pertumbuhan gumpalan sekeliling atau pembentukan thrombus. Antibodi sel-T mengatur proses ini. Lesi yang terjadi adalah plak atheromatis. Thrombi sekeliling terbentuk awalnya dari sel otot polos termodifikasi, LDL, dan fibrin (Milner dan Makise, 2002).

Enzim trombolitik alami yang menguraikan gumpalan terbentuk di dalam sel endotel pembuluh darah. Semakin bertambahnya usia manusia, produksi enzim-enzim ini berkurang dan darah menjadi lebih rentan untuk berkoagulasi. Hal ini menyebabkan penggumpalan. Meski demikian, gumpalan dapat terbentuk di usia berapapun (Milner dan Makise, 2002).

#### **G. Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)**

*Macaca fascicularis* atau yang sering disebut monyet ekor panjang adalah jenis primata yang banyak ditemukan di Asia tenggara, mulai dari Burma, Filipina, Indocina, Malaysia, dan Indonesia, sampai ke Timor. Monyet ini memiliki kebiasaan meminum air dalam jumlah banyak dan menyukai kepiting, sehingga sering pula disebut *Macaca* pemakan kepiting (Bonadio, 2000).

Berdasarkan taksonominya, *Macaca fascicularis* menurut Medway (1978) dalam Djara (1994) adalah sebagai berikut:

Kelas: *Mammalia*

Ordo: *Primates*

Sub Ordo: *Anthropoidea*

Super Famili: *Cercopitheoidea*

Famili: *Cercopitheoidea*



Genus: *Macaca*

Spesies: *Macaca fascicularis*

Menurut Napier dan Napier (1967), ukuran badan *Macaca fascicularis* yang sudah dewasa kelamin adalah sebagai berikut:

Jantan	: Berat badan antara 3,0 – 8,3 kg Panjang badan dan kepala antara 41 – 64 cm Panjang ekor 43,5 – 65 cm
Betina	: Berat badan antara 2,1 – 5,6 kg Panjang badan dan kepala 38,5 – 50,3 cm Panjang ekor 40 – 54,4 cm

Anak monyet yang baru lahir memiliki bobot 0,5 kg dengan bulu tipis dan masih harus tinggal dengan induk betina selama 3 sampai 4 bulan. Anak monyet jantan mencapai dewasa kelamin pada usia 4,5 sampai 5,5 tahun sedangkan betina pada usia 4 tahun. *Macaca fascicularis* memiliki daya tahan hidup antara 25 – 30 tahun, sedangkan kebuntingan membutuhkan waktu rata-rata 160 – 167 hari (Medway, 1978).

*Macaca fascicularis* memiliki bulu berwarna kecoklat-coklatan sampai keabu-abuan dengan bulu di bagian punggung berwarna gelap dan di bagian dada serta perut memiliki warna agak putih. Pada pipi dan sekeliling wajahnya berbulu lebat dan lebih panjang dibanding bagian lain (Napier dan Napier, 1967). Bagian ekor tertutup bulu yang lebih pendek, halus, dan bentuk ekornya seperti silinder dan berotot (Roberts, 1977). *Macaca* jantan memiliki penis yang kecil dengan kepala penis berbentuk bulat (Napier dan Napier, 1967). Monyet dapat dilihat tingkat kedewasaannya melalui pertumbuhan giginya. Sebagian besar monyet yang digunakan dalam penelitian ini telah memiliki gigi  $M^2/M^3$ , dalam hal ini berarti monyet tersebut telah dewasa karena telah memiliki gigi yang lengkap.

Pakan dasar disiapkan dalam bentuk pelet yang mengandung 24% protein kasar, 7,5% lemak kasar, dan kurang dari 2,5% serat (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pakan tambahan berupa pisang, pepaya, jambu biji, dan sayuran segar berfungsi untuk melengkapi gizi dan tidak harus ada. Kebutuhan nutrisi Rhesus dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk *Macaca fascicularis*, dapat dilihat dalam tabel 2. Pada saat ini banyak jenis

pakan olahan yang terdapat di pasaran, salah satu contohnya adalah *monkey chow* Bangkok. Komposisi pakan olah ini dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 2. Kebutuhan Nutrisi Rhesus dengan berat badan 3 kg per hari

Unsur nutrisi	Kebutuhan
Energi (kal)	70
Protein	3
Asam linoleat (g)	0,25
Kalsium (g)	0,15
Magnesium (g)	0,04
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)	0,04
Niacin (mg)	2
Riboflavin (mg)	0,03
Thiamin (mg)	0,33
Vitamin B2 (mg)	0,05 – 0,5
Vitamin B12 (mg)	0,07

Sumber : Murwatyo (1994)

Tabel 3. Komposisi Pakan Olahan untuk Satwa Primata

Komponen Komposisi	Kandungan per kg berat badan
Protein	15%
Vitamin	
A	15000 IU
D3	2000 IU
E	50 IU
Riboflavin	5 mg
Niacin	50 mg
Asam pantotenat	15 mg
Asam folat	0,2 mg
Asam askorbat	100 mg
Mineral	
Kalsium	0,5%
Fosfor	0,4%
Rasio kalsium : fosfor	1,25%
Magnesium	0,15%
Potassium	0,8%
Sodium	0,4%
Klorin	0,5%
Iodin	2 ppm
Besi	180 ppm
Mangan	40 ppm
Seng	10 ppm
Asam lemak	
Asam linoleat	1% dari total kalori

Sumber : Wemelsfelder dan Gierde (1989)

### III. METODOLOGI PENELITIAN

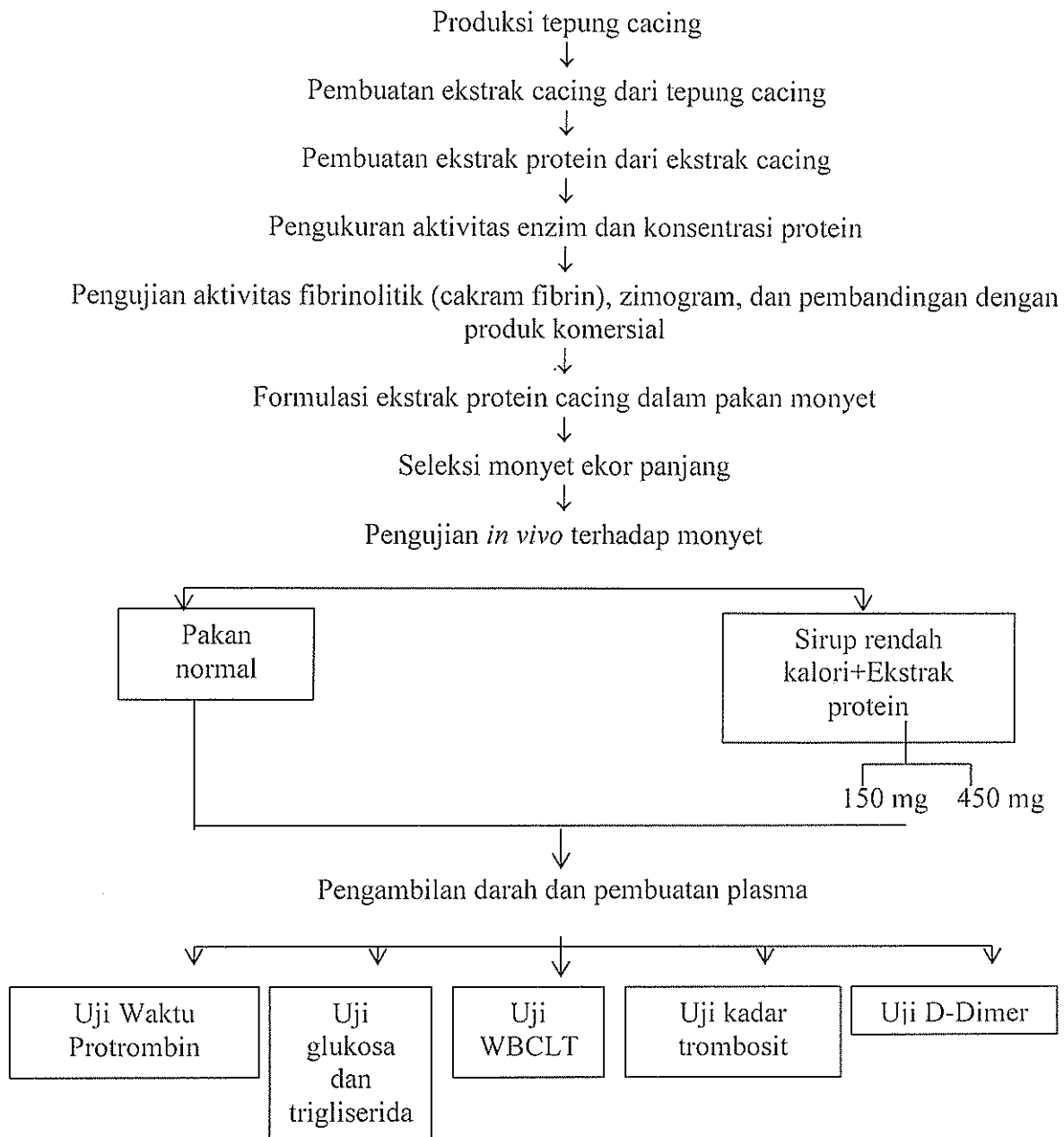
#### A. BAHAN , ALAT, DAN HEWAN PERCOBAAN

Bahan-bahan yang digunakan adalah Cacing *Lumbricus rubellus*, produk lumbrokinase komersial PLASMIN™, *Bovine Fibrinogen*, *Bovine thrombin*, *Bovine Serum Albumin*, kasein Hammarsten, buffer fosfat 0.05M pH 8.0, Tris-Cl, Tween 20, amonium sulfat, amonium persulfat, TEMED, akrilamid, bis-akrilamid, *Coomassie Blue R-250*, metanol, asam asetat glasial, reagen Bradford, TCA, pereaksi Folin, tirosin standar, natrium karbonat, sirup rendah kalori *Tropicana Slim*®, dan ketamin.

Alat-alat yang digunakan adalah sentrifusi (Sorvall), *syringe*, cawan petri, inkubator Memmert®, tabung *Vacurette*® *red top*, *blue top*, *lavender top*, *deep-freezer* (-20°C), alat pengukur glukosa darah *Accutrend*®, pipet mikro dengan skala P20, P200, dan P1000 (Gilson), oven vakum, spektrofotometer UV-Vis OPTIMA®, perangkat elektroforesis BioRad®, pHmeter ISTEK® dan blender.

Hewan percobaan yang digunakan adalah monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) jenis kelamin jantan, berusia 6-8 tahun, berat badan berkisar 3 – 4 kg dan dalam kondisi tubuh yang sehat/normal sebanyak 15 ekor.

## B. BAGAN PROSEDUR PENELITIAN



### Keterangan :

Uji Waktu Protrombin, trigliserida, kadar trombosit, dan D-Dimer dilakukan di laboratorium klinik Prodia Bogor.

## C. METODE PENELITIAN

### 1. Produksi Ekstrak Protein Cacing dari ekstrak cacing *L. rubellus* (Yanti et al. 2003; modifikasi Mihara et al. 1991)

Sebelum dilakukan produksi ekstrak protein untuk pakan, penentuan kadar amonium sulfat yang digunakan untuk pengendapan dilakukan terlebih dahulu. Tepung cacing (2% b/v) dilarutkan dalam 50 mM bufer fosfat pH 8,0, lalu disentrifugasi pada kecepatan 7500 rpm ( $R = 19,2$  cm) dan suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh berupa ekstrak cacing. Presipitasi ekstrak cacing dilakukan dengan garam amonium sulfat kejenuhan 75% dan 65%. Ekstrak cacing ditambahkan dengan garam amonium sulfat teknis sedikit demi sedikit, sambil diaduk stirer pada suhu ruang hingga larut homogen. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 7500 rpm ( $R = 19,2$  cm) dan suhu 4°C selama 30 menit. Ekstrak protein berupa pelet diambil dan diukur aktivitas enzim (dengan metode Bergmeyer dan Grassl, 1983) serta konsentrasi proteinnya. (dengan metode Bradford).

Pengukuran aktivitas enzim dan konsentrasi protein menunjukkan bahwa hasil pengendapan dengan amonium sulfat 65% menunjukkan nilai keduanya yang lebih besar daripada hasil pengendapan amonium sulfat 75%. Oleh karena itu pembuatan ekstrak protein untuk pakan monyet dilakukan dengan amonium sulfat 75%. Metode pembuatannya sama seperti di atas hanya saja amonium sulfat yang digunakan hanya 65% dan ekstrak protein yang dihasilkan (pelet) disimpan di *freezer* (suhu -20 s.d -30°C).

### 2. Pengukuran Konsentrasi Protein (metode Bradford) dan Aktivitas Enzim Ekstrak Protein Cacing dan Produk Lumbrokinase Komersial (metode Bergmeyer dan Grassl, 1983)

Pengukuran konsentrasi protein ekstrak protein dilakukan dengan metode Bradford. Kurva standar dibuat terlebih dahulu dengan menggunakan larutan BSA (Bovine Serum Albumin) dalam berbagai konsentrasi (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1 mg/ml) sebanyak masing-masing 0,1 ml ditambah dengan 2 ml larutan Bradford. Ekstrak protein dan produk lumbrokinase komersial masing-masing dalam volume 0,1 ml ditambah dengan 2 ml larutan Bradford. Blanko yang digunakan adalah 0,1 ml akuades ditambah dengan 2 ml larutan

Bradford. Absorbansi sampel, standar BSA, dan blanko diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Besarnya konsentrasi protein ekstrak protein tepung cacing diperoleh setelah mendapatkan persamaan kurva standar BSA.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan metode Bergmeyer dan Grassl (1983). Prosedur pelaksanaannya adalah sebagai berikut:

Pereaksi	Sampel (µl)	Blanko (µl)	Standar (µl)
Buffer fosfat pH8,0 50mM	250	250	250
Kasein	250	250	250
Tirosin standar	-	-	50
Akuades	-	50	-
Enzim	50	-	-
Inkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C			
Asam trikloroasetat	500	500	500
Akuades	50	-	-
Enzim	-	50	50
Didiamkan selama 10 menit pada 37°C Dilanjutkan dengan sentrifusi 12000 rpm (R = 8,5 cm), 10 menit			
Supernatan	375	375	375
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	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			

Satu unit aktivitas tiap sampel dihitung dengan persamaan:

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

Dimana: UA = jumlah tirosin yang dihasilkan per ml enzim per menit

A<sub>sp</sub> = nilai absorbansi sampel

A<sub>bl</sub> = nilai absorbansi blanko

A<sub>st</sub> = nilai absorbansi standar

P = faktor pengenceran

T = waktu inkubasi (10 menit)

Selain itu dihitung pula Aktivitas spesifik (AS) dan Aktivitas enzim per gram tepung cacing (UA/g).

Aktivitas Spesifik dihitung dengan rumus:

$$AS \text{ (UA/ mg protein)} = UA / [ ] \text{ protein (mg/ml)}$$

Sedangkan AE per gram tepung cacing dihitung dengan rumus:

$$UA/g = UA / 2\%$$

**3. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein cacing dan enzim fibrinolitik komersial sejenis secara *in vitro* dengan metode cakram fibrin (modifikasi metode Astrup dan Mullertz, 1952)**

Plasmin digunakan sebagai standar protease fibrinolitik. Sebanyak 15 ml larutan fibrinogen bebas plasminogen (*bovine fibrinogen* 0,5% dalam buffer Tris-Cl 50 mM pH 8,0) dituangkan ke dalam cawan petri kemudian ditetaskan 0,1 ml larutan trombin (1000NIH) dalam buffer Tris-Cl 50 mM pH 8,0, kemudian digoyangkan perlahan beberapa kali dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang sampai terbentuk lapisan gumpalan fibrin.

Sebanyak 5 $\mu$ L ekstrak protein dan lumbrokinase komersial dipipet ke dalam *petri dish* yang berisi agar lapisan gumpalan fibrin (dengan/tanpa plasminogen) Setelah itu, petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan pengamatan setiap 1, 3, 6, dan 24 jam. Aktivitas fibrinolitik ditunjukkan dengan terbentuknya area zona bening oleh standar plasmin dan tiap enzim fibrinolitik.

**4. Uji aktivitas fibrinolitik ekstrak protein cacing dan enzim fibrinolitik komersial sejenis secara *in vitro* dengan metode zimogram**

Analisis ini dilakukan untuk mendeteksi aktivitas fibrinolitik dari ekstrak protein secara langsung. Mekanismenya sama seperti analisis SDS-PAGE hanya saja pada gel pemisah ditambahkan suatu substrat, yaitu fibrinogen, yang akan berpolimerisasi dengan akrilamida. Komposisi gel elektroforesis 12% adalah sebagai berikut:

Pereaksi	Gel pemisah ( $\mu$ l)	Gel penahan ( $\mu$ l)
Larutan A	2000	670
Larutan B	1250	--
Fibrinogen	1000	--
Thrombin	100	--
Larutan C	--	1250
Akuades	150	3000
Amonium persulfat 10%	100	50
TEMED	10	5

Sebanyak 10 µl sampel ekstrak protein, ekstrak cacing, dan lumbrokinase komersial dan 5 µl *marker* LMW diloaded kedalam sumur elektroforesis. *Running* elektroforesis dilakukan pada tegangan 100V, selama 150 menit. Setelah pemisahan elektroforesis, enzim direnaturasi kembali dalam larutan Tween 20 2,5% v/v sambil digoyangkan selama satu jam. Digesti dilakukan dalam buffer fosfat 50mM pH 8.0 pada suhu 60°C, 30 menit. Selanjutnya gel diwarnai dengan larutan pewarna selama 10 menit dan dilunturkan dengan larutan peluntur berulang kali hingga didapatkan pita enzim proteolitik berwarna putih dengan latar gel biru.

#### **5. Formulasi ekstrak protein cacing pada berbagai dosis dan campurannya dalam pakan**

Ekstrak protein dari cacing *L.rubellus* dalam bentuk pelet diperoleh melalui sentrifugasi. Ada tiga formulasi pakan yang akan diuji untuk uji potensi anti trombosis hewan laboratorium (monyet), yaitu pakan kontrol (sirup tanpa penambahan ekstrak protein), pakan yang diformulasi dengan ekstrak protein (pelet = 150 mg), dan pakan yang diformulasi dengan ekstrak protein (pelet = 450 mg). Dosis yang diberikan kepada monyet merupakan hasil konversi dosis standar dan tiga kali dosis standar untuk orang dewasa. Namun penentuan dosis tersebut tanpa mengkalkulasikan banyaknya amonium sulfat yang tertinggal di dalam pelet. Perhitungan konversi dosis ekstrak protein dapat dilihat pada lampiran 6. Ekstrak protein berupa pelet (150 mg dan 450 mg) dilarutkan dalam sirup *Tropicana Slim*® rasa jeruk (air : sirup = 3 : 1) masing-masing 4 ml dan disimpan sebagai stok dalam *freezer* selama seminggu (stok dosis tinggi dan rendah).

#### **6. Seleksi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*)**

Kriteria seleksi monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) yaitu monyet dengan jenis kelamin jantan, usia dewasa (6-8 tahun), berat badan 3-4 kg dan normal/sehat. Monyet diperoleh dari koleksi Pusat Studi Satwa Primata IPB, Bogor. Setelah melalui masa adaptasi (tujuh hari), hewan laboratorium diberikan lumbrokinase pada berbagai dosis (seperti prosedur 3)



yang dicampurkan dalam sirup *Tropicana Slim*® rasa jeruk dengan masa perlakuan selama 30 hari.

## 7. Uji potensi anti trombosis ekstrak protein cacing terhadap monyet

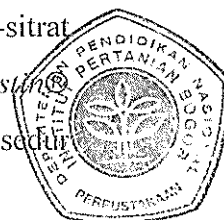
Uji *in vivo* penggunaan ekstrak protein cacing dilakukan pada tiga kelompok hewan laboratorium yang diberi formulasi pakan yang berbeda (**prosedur 3**). Parameter analisis yang dilakukan dengan sampel plasma meliputi: penentuan waktu protrombin atau *Prothrombine Time* (tabung Na-sitrat), penentuan kadar trombosit (tabung EDTA), dan penentuan kadar D-Dimer (tabung Na-sitrat). Sedangkan sampel serum digunakan untuk analisis kadar trigliserida. Uji Waktu Lisis Bekuan Darah Utuh (WBCLT) dan kadar glukosa dilakukan dengan sampel darah utuh. Uji waktu protrombin, D-Dimer, trigliserida, dan kadar trombosit dilakukan di laboratorium klinik Prodia Bogor.

### a. Pengambilan darah dan plasma

Pengambilan darah dilakukan empat kali dengan selang waktu sepuluh hari. Monyet yang diambil darahnya dipuaskan minimal 18 jam sebelumnya dan disedasi ketamin untuk pengambilan darah (dosis 5-25 mg/kg BB Intra Muskular). Darah monyet diambil dari vena femoralis sebanyak 5-18 ml dan disimpan dalam tabung *Vacurette*®, yang umumnya bervolume 3 – 5 ml, dan tabung sentrifus. Tabung *Vacurette*® bertutup biru, untuk sampel plasma, berisi antikoagulan Na-sitrat, tabung bertutup lembayung, untuk sampel plasma, berisi antikoagulan EDTA, dan tabung bertutup merah/kuning digunakan untuk sampel serum. Tabung sentrifus digunakan untuk menampung 5 ml darah untuk uji WBCLT. Setetes darah diambil untuk digunakan pada alat pengukur glukosa *Accutrend*®. Pemisahan plasma dari darah dilakukan oleh laboratorium klinik Prodia.

### b. Uji Waktu Protrombin (PT)

Uji ini dilakukan oleh laboratorium klinik Prodia Bogor. Sampel yang digunakan adalah plasma darah dengan antikoagulan Na-sitrat (darah : Na-sitrat = 9 : 1). Reagen yang digunakan adalah *Simplastin*® *Excel S*, suatu reagen tromboplastin jaringan dari otak kelinci. Prosedur



pengujiannya adalah: (1) Simplastin Excel S dalam jumlah yang cukup dihangatkan sampai 37°C (diperlukan 0.2 ml per uji). Proses ini dilakukan dengan hati-hati untuk mencegah penguapan dan tidak boleh dibiarkan dalam suhu 37°C tanpa tutup lebih dari 60 menit. (2) Tabung uji untuk tiap sampel (pasien dan kontrol) diberi label. (3) Dipipet 0.1 ml sampel atau kontrol ke dalam tabung yang sesuai. (4) Tiap sampel dan kontrol diinkubasi 37°C selama 3 – 10 menit. (5) Sebanyak 0.2 ml Simplastin® Excel S ditambahkan dan secara simultan penghitungan waktu untuk pembentukan *clot* dimulai. (6) Dicatat waktu, dalam detik, yang diperlukan untuk deteksi *clot*.

**c. Uji Waktu Lisis Bekuan Darah Utuh (Whole Blood Clot Lysis Time)**

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 ketinggalan dalam tabung dicatat volumenya (sekian % dari volume darah semula [=100%]). Perhitungan persen perubahan (% change) volume serum dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ change} = \frac{V_s \text{ akhir} - V_s \text{ awal}}{V_s \text{ akhir}} \times 100\%$$

Bekuan darah yang diperoleh dari tes retraksi bekuan dapat digunakan untuk menguji adanya lisis bekuan yang mencepat. Bekuan itu disimpan dalam inkubator bersuhu 37°C dan lewat 24, 48 dan 72 jam diperiksa apakah terjadi lisis, yakni mencairnya bekuan. Dalam keadaan normal lisis baru terjadi lewat 72 jam.

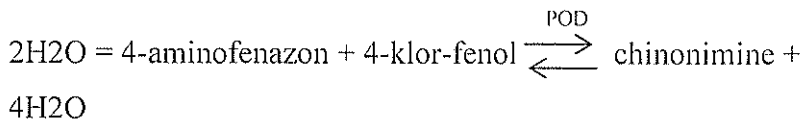
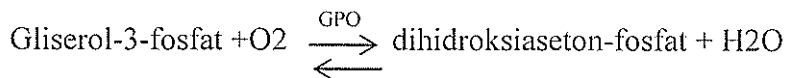
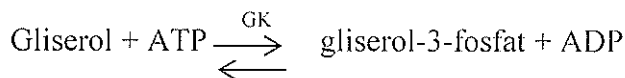
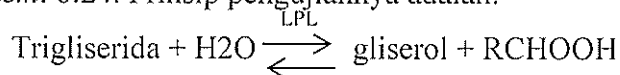
**d. Uji kadar trombosit**

Uji ini dilakukan di laboratorium klinik Prodia Bogor. Sampel yang digunakan adalah plasma darah dengan antikoagulan EDTA. Alat yang digunakan adalah *Automated Hematology Analyzer* model SF-3000. Alat ini dapat mengukur total 23 parameter dalam darah manusia. Untuk pengukuran kadar trombosit digunakan metode deteksi hitung langsung.

Pengenceran sampel untuk pengukuran kadar trombosit terdiri dari dua tahap pengenceran, pengenceran yang pertama: 4,0 µl darah utuh dengan 1,996 ml diluen, yang kedua: 40,0 µl hasil pengenceran pertama dengan 1,960 ml diluen. Diluen yang digunakan adalah diluen CELLPACK. Pengukuran kadar trombosit dilakukan dengan mengaspirasikan 0,25 ml sampel yang telah diencerkan melalui apertur berdiameter 75 µm. Penghitungan jumlah trombosit dianalisis menggunakan deteksi hitung langsung dan metode diskriminasi otomatis.

**e. Uji kadar trigliserida**

Uji ini dilakukan oleh laboratorium klinik Prodia Bogor. Sampel yang digunakan adalah serum darah. Metode yang digunakan adalah uji kolorimetri enzimatis “GPO-PAP” menurut Trinder, P. (1969). *Ann. Clin. Biochem.* 6:24. Prinsip pengujiannya adalah:



Prosedur kajian dilakukan dengan panjang gelombang Hg 546 nm, 500 nm, kuvet berukuran 1 cm lintas cahaya, suhu 20-25°C/37°C, pengukuran dilakukan dengan satu blanko reagen dan satu standar.

**f. Uji kadar glukosa darah**

Uji ini dilakukan dengan menggunakan sampel serum darah dan alat pengukur kadar glukosa darah *Accutrend*®. Setetes darah diteteskan di atas area kuning strip pengukur glukosa kemudian strip tersebut

dimasukkan ke dalam alat *Accutrend*® dan kadar glukosa akan terukur secara otomatis.

**g. Uji D-Dimer**

Pengujian D-Dimer dilakukan di laboratorium Prodia dengan menggunakan sampel plasma darah dengan antikoagulan Na-sitrat (9:1) dan alat *NycoCard*® D-Dimer *Single Test*. Alat ini adalah untuk pengujian *in vitro* penentuan cepat produk degradasi fibrin D-Dimer dalam plasma.

Sampel plasma diteteskan ke dalam sumur uji dari alat. Ketika sampel sudah meresap ke dalam alat, molekul D-Dimer terperangkap di atas membran yang mengandung antibodi monoklonal spesifik D-Dimer. Kemudian larutan konjugat ditambahkan. Larutan ini adalah antibodi monoklonal spesifik D-Dimer yang dikonjugasi dengan partikel emas ultra-kecil. D-Dimer di atas membran akan berikatan dengan konjugat antibodi-emas dalam reaksi tipe *sandwich*. Konjugat berlebih dihilangkan dari membran dengan larutan pembilas. Adanya D-Dimer dengan konsentrasi di atas 0.1 mg/L dalam sampel membuat membran akan berwarna kemerahan dengan intensitas warna sebanding dengan konsentrasi D-Dimer. Intensitas warna tersebut diukur dengan *NycoCard*® READER II. Alat ini terdiri atas sebuah pen pengukur dan *display* dan dioperasikan oleh tiga tombol tekan dengan instruksi-instruksi disampaikan dalam *display*-nya. Pengukuran dilakukan dengan mencelupkan ujung pen ke dalam lubang uji dan menekan leher pen ke bawah. Respon berwarna dari *NycoCard*® diukur oleh pantulan spektral pada tiga bagian spektrum-tampak. Dioda pengemisi sinar (Light Emitting Dioda) mengiluminasi sampel untuk diukur dengan satu warna setiap waktu. Cahaya yang dipantulkan dari contoh diukur oleh suatu detektor dan dikonversi ke suatu nilai konsentrasi oleh mikroprosesor.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Pengujian In Vitro Ekstrak Protein Tepung Cacing

Dua pengujian secara *in vitro* dilakukan dalam penelitian ini, yaitu *cakram fibrin* dan analisis zimogram. Kedua uji ini bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan secara kualitatif aktivitas fibrinolitik ekstrak tersebut dengan aktivitas fibrinolitik produk lumbrokinase komersial.

Selain cacing tanah *Lumbricus rubellus*, banyak terdapat produk dari bahan alami lain yang memiliki aktivitas fibrinolitik yang berguna sebagai antitrombosis, antara lain adalah Nattokinase, Venom, Streptokinase, Urokinase, dan Desmoteplase. Namun dalam penelitian ini produk yang digunakan sebagai pembanding adalah produk lumbrokinase komersial karena adanya keterbatasan dana, mengingat mahalnya harga produk-produk fibrinolitik lain seperti yang telah disebutkan di atas.

Sebagai permulaan uji, pengukuran konsentrasi protein dan aktivitas enzim dilakukan terhadap ekstrak cacing, ekstrak protein, dan lumbrokinase komersial. Pengukuran konsentrasi protein dilakukan dengan metode Bradford, sedangkan pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan metode Bergmeyer dan Grassl (1983). Pengukuran absorbansi standar BSA dalam berbagai konsentrasi menghasilkan suatu persamaan kurva standar  $y = 1,346x + 0,0761$  dengan  $R^2 = 0,9638$ . Dari persamaan kurva standar tersebut, konsentrasi protein sampel ekstrak protein tepung cacing, ekstrak cacing, dan produk lumbrokinase komersial dapat diperoleh. Hasil pengukuran absorbansi standar BSA dalam berbagai konsentrasi ditunjukkan dalam lampiran sedangkan hasil pengukuran aktivitas enzim (AE), aktivitas spesifik (AS), aktivitas enzim per gram tepung cacing, dan konsentrasi protein ekstrak protein tepung cacing dapat dilihat dalam tabel 6.

Perbandingan antara penggunaan amonium sulfat 75% dan 65% untuk mengekstrak protein dari ekstrak cacing menunjukkan bahwa dalam konsentrasi amonium sulfat 65%, aktivitas enzim dan konsentrasi protein yang terekstrak lebih besar daripada konsentrasi 75%. Oleh karena itu, pelaksanaan ekstraksi protein selanjutnya, yang digunakan untuk uji *in vivo*, dilakukan dengan konsentrasi amonium sulfat 65%. Ekstraksi protease murni

menggunakan amonium sulfat dilakukan dengan pertimbangan harganya yang murah, kemudahan diperoleh, dan tidak berbahaya bagi kesehatan (tidak toksik).

Dari data di dalam tabel 6, dapat dilihat bahwa aktivitas spesifik ekstrak protein, yang diekstrak dengan amonium sulfat 65%, bernilai 349,41% lebih besar daripada aktivitas enzim ekstrak cacing dan 314,05% lebih besar daripada produk lumbrokinase komersial. Sedangkan aktivitas enzim per gram tepung cacing dari ekstrak protein bernilai 702,35% lebih besar daripada konsentrasi protein ekstrak cacing dan 630,03% lebih besar daripada lumbrokinase komersial. Hal ini terjadi karena sebagian besar komponen yang tertinggal dalam ekstrak protein hanyalah protein, yang sebagian besar merupakan enzim lumbrokinase, sedangkan dalam ekstrak cacing dan lumbrokinase komersial kemungkinan masih terdapat komponen non-protein lainnya, seperti lemak dan karbohidrat. Ekstrak protein yang diperoleh dengan pengendapan menggunakan garam diduga masih mengandung residu garam amonium sulfat. Hal ini akan menurunkan kadar ekstrak protein yang akan dikonsumsi monyet perlakuan (uji in vivo).

Tabel 4. Nilai Aktivitas Enzim, Aktivitas Spesifik, Aktivitas Enzim per Gram Tepung Cacing, dan Konsentrasi Protein Ekstrak Protein (presipitasi dengan amonium sulfat 65%), dan Produk Lumbrokinase Komersial

Sampel	Aktivitas Enzim (UA/ml)	Aktivitas Spesifik (UA/mg protein)	Aktivitas Enzim per gram tepung cacing (UA/g)	Konsentrasi Protein (mg/ml)
Ekstrak protein(amoni um sulfat 75%)	2,7672	1,2398	138,36	2,232
Ekstrak protein (amonium sulfat 65%)	6,2102	1,6045	310,51	3,9927
Lumbrokinase komersial	0,9857	0,5109	49,285	0,5036
Ekstrak cacing (*)	0,8842	0,4592	44,21	1,9254

(\*) Sumber : (Erwin, *unpublished data*)

## 1. Cakram fibrin

Cakram fibrin dilakukan dengan menggunakan media fibrinogen yang dicampurkan dengan beberapa tetes trombin, sehingga setelah beberapa waktu, media akan berwarna putih keruh. Warna putih keruh dan menggumpal tersebut merupakan gumpalan-gumpalan fibrin yang terbentuk akibat reaksi fibrinogen dan trombin. Sampel yang ditetaskan dalam volume 5  $\mu$ l adalah ekstrak cacing, dengan aktivitas sebesar 0,0044 UA (**kode E**), ekstrak protein, dengan aktivitas sebesar 0,032 UA (**kode R**), dan larutan produk lumbrokinase komersial, dengan aktivitas sebesar 0,0013 UA (**kode P**). Analisis cakram fibrin bersifat kualitatif, yaitu dengan melihat terbentuknya zona bening di sekeliling sampel yang ditetaskan dan sampai seberapa besar zona bening tersebut dapat terbentuk. Pengamatan dilakukan dengan interval waktu 0, 1, 3, 6, dan 24 jam. Hasil pengamatan tiap interval tersebut dapat dilihat pada gambar 2.

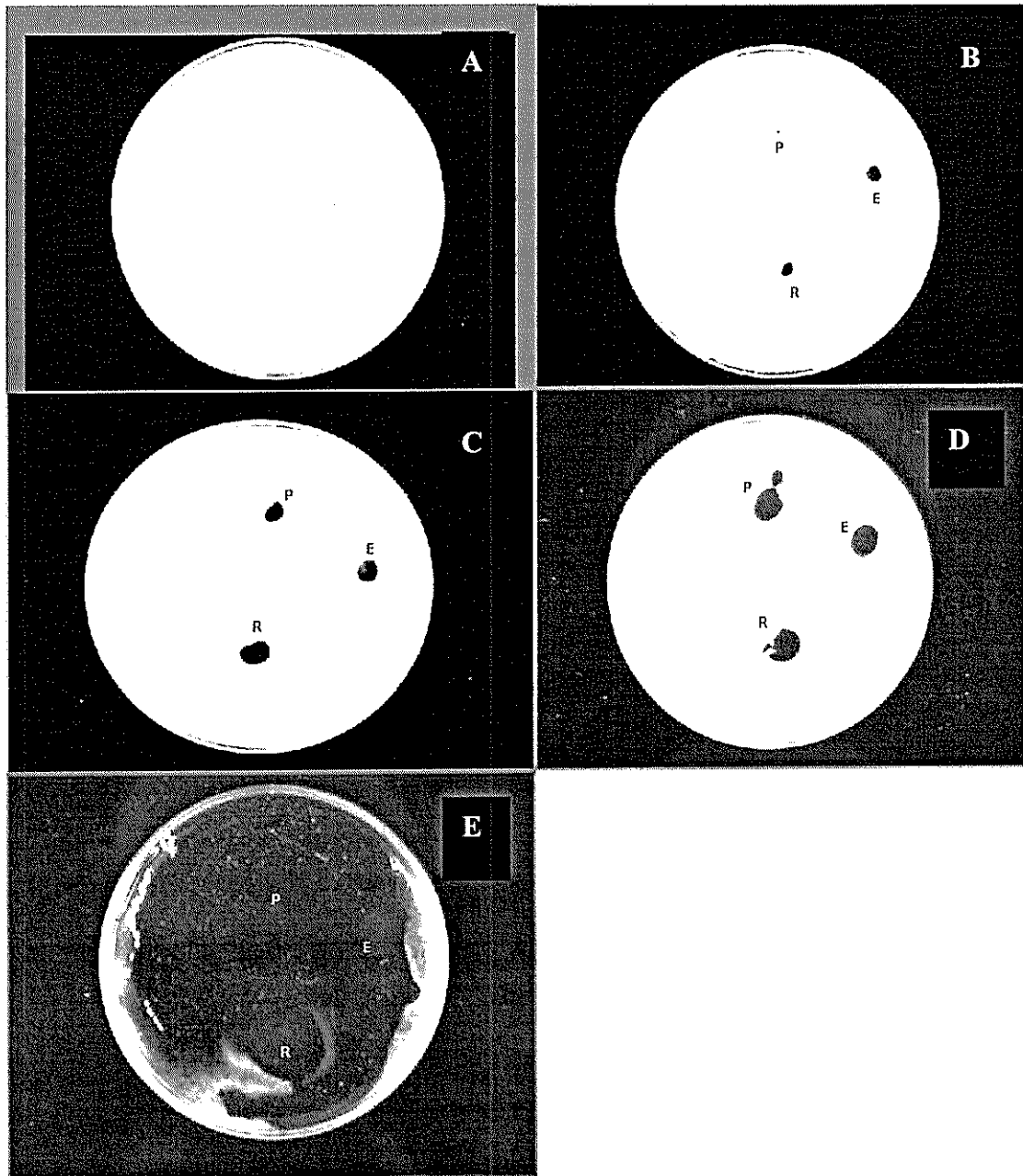
Hasil pengujian cakram fibrin menunjukkan bahwa dalam waktu satu jam inkubasi, aktivitas fibrinolitik ekstrak cacing dan ekstrak protein telah bekerja, sedangkan produk lumbrokinase komersial belum mulai tampak. Aktivitas fibrinolitik ekstrak cacing lebih besar daripada ekstrak protein, terlihat dari lebih besarnya radius zona bening yang terbentuk di sekeliling ekstrak cacing.

Setelah tiga jam barulah aktivitas fibrinolitik lumbrokinase komersial tampak, setara besarnya dengan aktivitas ekstrak cacing. Hal ini terlihat dari sama besarnya radius zona bening yang terbentuk. Radius zona bening yang terbesar adalah milik ekstrak protein, yang menunjukkan bahwa pada saat itu aktivitas fibrinolitik ekstrak protein merupakan yang terbesar.

Enam jam kemudian radius zona bening yang terbentuk oleh ketiganya semakin melebar, dimana besarnya radius zona bening produk lumbrokinase komersial setara besarnya dengan ekstrak cacing. Sedangkan zona bening yang terluas dimiliki oleh ekstrak protein. Hal ini menunjukkan bahwa setelah enam jam, ketiga sampel masih memiliki aktivitas fibrinolitik dan yang terbesar dimiliki oleh ekstrak protein.

Setelah 24 jam, seluruh medium fibrin telah tercerna oleh enzim, sehingga seluruh bagian cawan telah menjadi zona bening. Dalam kondisi

tersebut, tidak dapat lagi dibedakan hasil aktivitas produk lumbrokinase komersial, ekstrak cacing, maupun ekstrak protein. Hal yang dapat disimpulkan adalah selama 24 jam ketiga sampel enzim masih memiliki aktivitas fibrinolitik untuk mencerna fibrin sampai habis. Seharusnya dilakukan pengamatan untuk interval 12 dan 18 jam untuk dapat mengikuti lebih jelas perkembangan aktivitas fibrinolitik ketiga sampel, namun karena keterbatasan waktu, pengamatan tersebut tidak dapat dilakukan.



Gambar 2. (A) Kondisi *Cakram fibrin* Awal (0 jam), (B) Kondisi *Cakram fibrin* Setelah 1 jam inkubasi 37°C, (C) Kondisi *Cakram fibrin* Setelah 3 jam inkubasi 37°C, (D) Kondisi *Cakram fibrin* Setelah 6 jam inkubasi 37°C, (E) Kondisi *Cakram fibrin* Setelah 24 jam inkubasi 37°C

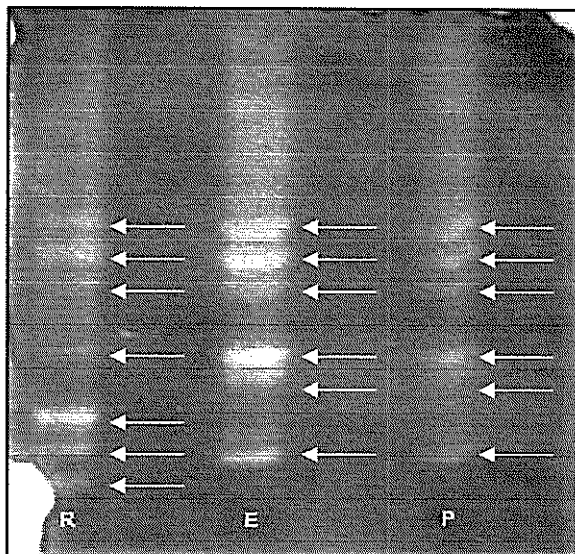


Pengujian cakram fibrin ini pernah dilakukan untuk pengujian aktivitas fibrinolitik nattokinase. Menurut Milner dan Makise (2002), natto diletakkan di atas cakram fibrin dan secara signifikan melisis fibrin ditunjukkan oleh halo yang terbentuk. Semakin besar dan jelas halo yang terbentuk, semakin terdegradasi fibrin tersebut. Suhu yang digunakan dalam uji cakram fibrin nattokinase adalah 90°C, 80°C, dan 70°C. Selain nattokinase, uji cakram fibrin juga dilakukan terhadap lumbrokinase yang diperbandingkan dengan urokinase (1000, 100, dan 10 IU/ml). Medium yang digunakan adalah fibrin kaya-plasminogen dan fibrin miskin-plasminogen. Sampel urokinase diteteskan pada medium fibrin kaya-plasminogen, sedangkan lumbrokinase diteteskan pada medium fibrin kaya-plasminogen dan miskin-plasminogen. Inkubasi dilakukan dalam suhu 37°C selama 18 jam. Berdasarkan area lisis, yang ditunjukkan oleh halo, aktivitas dari larutan lumbrokinase yang telah diinkubasi 50 hari setara dengan 8700 IU/ml dibandingkan dengan aktivitas urokinase (Mihara et al., 1991).

## **2. Analisis Zimogram**

Analisis zimogram dilakukan dengan tujuan untuk mendeteksi aktivitas enzim proteolitik secara langsung. Gel yang digunakan adalah gel poliakrilamida yang dikombinasikan dengan suatu detergen Sodium Dodesil Sulfat (SDS). Metode ini digunakan untuk memisahkan dan meneliti jumlah dan ukuran (berat molekul) rantai protein dan rantai subunit protein. Bobot molekul suatu protein dan subunitnya dapat diketahui dengan menghitung Rf (rasio perpindahan molekul protein terhadap jarak total elektroforesis) dan memperbandingkan nilainya dengan Rf komponen marker LMW (Low Molecular Weight) yang telah diketahui bobot molekulnya. Pada elektroforesis SDS-PAGE, semua ikatan disulfida yang ada pada protein direduksi oleh senyawa beta-merkaptotanol. Senyawa SDS yang ditambahkan berfungsi untuk memutuskan ikatan di antara subunit penyusun protein dan membuat keseluruhan protein diselubungi muatan negatif, sehingga pergerakan protein hanya dipengaruhi oleh ukurannya.

Sampel yang diujikan adalah ekstrak cacing (0,0088 UA), ekstrak protein (0,064 UA), dan lumbrokinase komersial (0,0026 UA) masing-masing sebanyak 10 $\mu$ l. Hasil pengujian zimogram menunjukkan beberapa pita bening terbentuk pada sampel produk lumbrokinase komersial, ekstrak cacing, dan ekstrak protein. Jumlah dan posisi pita pada produk lumbrokinase komersial dan ekstrak cacing hampir serupa (6 pita), namun ada sedikit perbedaan pada pita-pita ekstrak protein (7 pita) dan hanya lima pita yang posisinya sama. Melihat kesamaan hasil antara produk lumbrokinase komersial dan ekstrak cacing, kesimpulan yang dapat diambil adalah produk lumbrokinase tersebut diduga juga terbuat dari tepung cacing *L. rubellus*. Hasil *running* elektroforesis marker LMW tidak dapat dilihat sehingga dalam zimogram kali ini tidak dapat ditentukan bobot molekul dan jenis komponen dari pita-pita penyusun masing-masing sampel. Pengujian zimogram kali ini hanya dapat disimpulkan secara kualitatif dari terbentuknya pita dan jumlah pita yang terbentuk. Hasil pengujian zimogram dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Gel Hasil Running Zimogram dari sampel Ekstrak Protein (R), ekstrak cacing (E), dan produk lumbrokinase komersial(P)

Menurut Yanti (2003), analisis zimogram terhadap ekstrak cacing protease *L. rubellus* menghasilkan enam pita dengan bobot molekul 20, 23, 26, 31, 36, dan 41 kD, sedangkan protease murni *L. rubellus* menghasilkan tiga pita pada fraksi P1(31, 36, dan 41 kD), lima pita pada fraksi P2 (23, 26, 31, 36, dan 41kD), dan enam pita pada fraksi P3 (20, 23, 26, 31, 36, dan 41 kD). Menurut Mihara et al. (1991), enam fraksi protease cacing

murni, melalui elektroforesis gel SDS-PAGE, diketahui memiliki bobot molekul 23,5 kD (I-0), 27,4 kD (I-1), 27 kD (I-2), 28,5 kD (II), 34 kD (III-1), dan 34,2 kD (III-2).

Perbedaan antara elektroforesis SDS-PAGE dan zimogram terletak pada komponen gel pemisah. Pada zimogram, gel pemisahan ditambah dengan substrat protein, yang dalam hal ini adalah fibrinogen. Substrat tersebut akan berkopolimerisasi dengan akrilamida. Menurut Yanti (2003), fibrinogen merupakan protein larut dalam plasma dengan bobot molekul sekitar 340 kD. Protein ini terdiri atas 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. Setelah elektroforesis berakhir, gel akan direnaturasi dalam larutan *Tween 20*, dengan tujuan untuk mengaktifkan kembali protease yang komponennya telah terpisah-pisahkan, dan kemudian diteruskan dengan digesti substrat oleh enzim yang telah direnaturasi. Digesti dilakukan dengan merendam gel dalam buffer fosfat 0,05 M pH 8.0 dan menginkubasinya dalam suhu optimum (60°C) selama 30 menit. Setelah dilakukan proses pewarnaan dan pelunturan akan diperoleh gel berwarna biru dengan pita-pita bening. Gel yang merupakan hasil *running* marker LMW tidak mengalami renaturasi dan digesti, melainkan langsung mengalami proses pewarnaan dan pelunturan.

#### **B. Evaluasi Hasil Pengujian Aktivitas Fibrinolitik Ekstrak Protein Cacing Tanah *L. rubellus* Secara In Vivo terhadap Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)**

Jumlah ekstrak protein yang diberikan kepada monyet perlakuan adalah sebesar 150 mg (sampel dosis rendah) dan 450 mg (sampel dosis tinggi). Penentuan dosis tersebut berdasarkan pada dosis konsumsi lumbrokinase komersial oleh manusia dewasa. Dosis manusia tersebut kemudian dikonversi menjadi dosis untuk monyet. Penentuan dosis tersebut tidak mempertimbangkan adanya residu amonium sulfat dalam ekstrak protein

akibat adanya proses presipitasi menggunakan amonium sulfat 65%. Apabila memperhitungkan hal tersebut, maka kandungan ekstrak protein murni dalam pelet hasil sentrifugasi hanyalah sebesar 70% dari bobot total, sedangkan 30% nya merupakan residu garam amonium sulfat, berarti jumlah ekstrak protein yang dikonsumsi oleh monyet perlakuan hanyalah 105 mg untuk dosis rendah (168,47 UA) dan 315 mg untuk dosis tinggi (505,42 UA). Perhitungan kadar residu amonium sulfat dalam pelet dapat dilihat pada lampiran 6.

## 1. Pengukuran Kadar D-Dimer

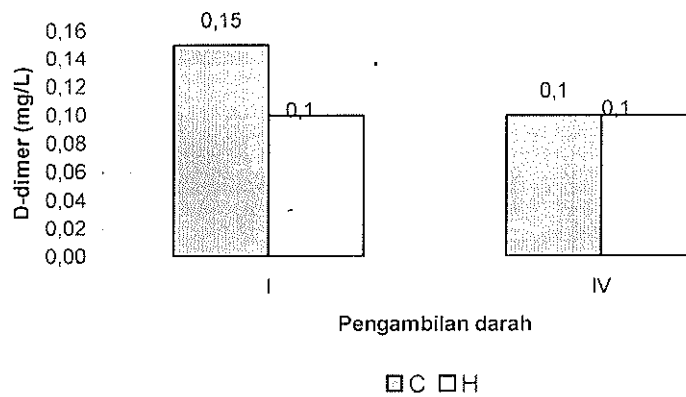
D-Dimer adalah FDP (*Fibrin Degradation Product*) spesifik yang hanya terbentuk oleh degradasi fibrin oleh plasmin, dan bukan karena degradasi fibrinogen utuh oleh plasmin. Maka, keberadaan D-Dimer menandakan bahwa fibrin telah dibentuk dan didegradasi. Sebaliknya, kajian FDP yang positif menandakan bahwa fibrin dan/atau fibrinogen sedang didegradasi oleh plasmin, karena kajian FDP mendeteksi produk degradasi fibrin, termasuk D-Dimer, dan produk degradasi fibrinogen. D-Dimer dan FDP dapat positif karena adanya trombosis, termasuk *Deep Vein Thrombosis*, *Pulmonary Embolism*, dan *myocardial infarction*. D-Dimer dan FDP juga dapat positif dalam penyakit *liver* berkaitan dengan adanya pembersihan oleh hati yang berkurang. Pemeriksaan D-Dimer memanfaatkan prinsip apabila fibrin (bukan fibrinogen) diuraikan oleh plasmin, terjadi pembebasan neoantigen, dalam hal ini adalah dua fragmen D dari tempat ikatan silang gama di fibrin. Uji ini tidak memiliki spesifitas terhadap fibrinogen sehingga mengidentifikasikan kerja plasmin pada ikatan silang fibrin secara lokal atau diseminata. Produk-produk penguraian fibrin dijumpai pada lebih dari 90% kasus gangguan trombotik atau tromboembolik (Sacher dan McPherson, 2000).

Hasil pengujian D-Dimer terhadap darah monyet kontrol dan monyet perlakuan menunjukkan penurunan untuk kontrol ( $0,15 \pm 0,1$  mg/L menjadi 0,1 mg/L) dan nilai yang konstan (0,1 mg/L) untuk monyet perlakuan. Terdapat standar deviasi yang tinggi pada hasil uji D-Dimer *baseline* monyet kontrol, karena sampel darah yang diuji telah mengalami lisis. Kemungkinan, bila darah yang dipergunakan tidak mengalami lisis, hasil uji D-Dimer *baseline* monyet kontrol akan bernilai lebih rendah

hasil uji D-Dimer *baseline* monyet kontrol akan bernilai lebih rendah (sekitar 0,1 mg/L). Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat dampak yang signifikan terhadap nilai D-Dimer sebelum maupun sesudah pemberian ekstrak tepung cacing. Hal ini dapat dilihat pada nilai D-Dimer monyet perlakuan yang konstan. Rangkuman hasil D-Dimer dapat dilihat pada gambar 4.

Data kisaran kadar D-Dimer normal untuk monyet ekor panjang tidak ditemukan sehingga acuan kadar D-Dimer normal yang digunakan adalah dari manusia yaitu di bawah 0,3 mg/L. Level plasma dari fragmen fibrin D-Dimer meningkat lebih dari 100 kali lipat selama trombosis vena akut karena D-Dimer merupakan penanda (marker) pembentukan fibrin dan reaksi fibrinolisis. Individu sehat memiliki keragaman konsentrasi D-Dimer yang jelas dalam kisaran normal dan konsentrasi D-Dimer plasma dalam distribusi populasi normal ketiga atau keempat berkaitan dengan peningkatan resiko infarksi miokardial masa depan dalam beberapa studi yang berkaitan. D-Dimer dapat mewakili penyajian terakhir dari keseimbangan prokoagulan atau faktor genetik, atherosklerosis subklinis secara luas, atau keberadaan kelainan koagulasi yang mengarah pada trombosis koroner. Dua studi kontrol kasus melaporkan bahwa orang dengan sejarah trombosis vena dalam akan mengalami peningkatan konsentrasi D-Dimer daripada kontrol (Cushman et al., 2003).

Fibrin adalah protein tak larut yang terdapat di dalam serum. Protein ini merupakan produk degradasi fibrinogen oleh aksi proteolitik trombin selama proses penggumpalan darah. Jadi trombin merupakan komponen utama dalam gumpalan darah (thrombus) yang bisa mengganggu aliran darah. Degradasi fibrin dalam thrombus dikatalisis oleh enzim plasmin atau fibrinolisisn melalui proses fibrinolisis sehingga diperoleh produk berupa peptida-peptida berukuran lebih kecil dan larut (Yanti, 2003). Produk degradasi fibrin dapat menghambat agregasi platelet (trombosit) dengan menutup reseptor fibrinogen.



Gambar 4. Grafik Perubahan Nilai D-Dimer Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi

## 2. Pengujian Waktu Protrombin (*Prothrombine Time*)

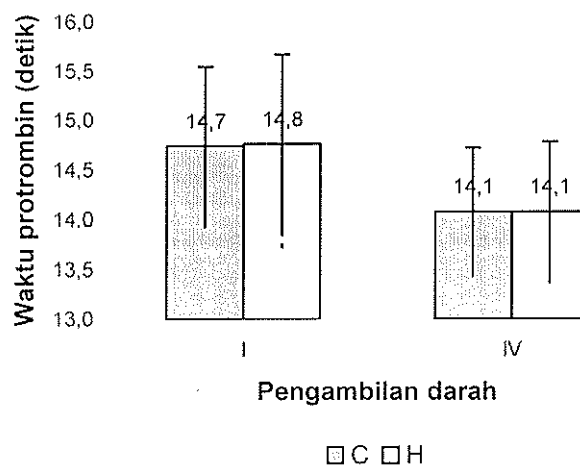
Penghitungan waktu protrombin atau masa protrombin dilakukan umumnya untuk menguji adanya gangguan faktor pembekuan darah pada jalur ekstrinsik, yaitu kekurangan faktor pembekuan V, VII, dan X, protrombin, dan fibrinogen. Jika dianggap bahwa faktor lain-lain dalam proses-proses tersebut normal, maka masa protrombin ini menjadi ukuran untuk aktivitas protrombin (Gandasoebrata, 1968).

Dasar pengujian waktu protrombin adalah memberikan sejumlah tromboplastin dan ion kalsium yang optimal ke dalam plasma darah, dan lamanya waktu untuk menyusun fibrin diukur (Gandasoebrata, 1968). Berkaitan dengan kemampuan ekstrak tepung cacing sebagai aktivator plasminogen, maka diduga waktu protrombin monyet perlakuan akan lebih panjang daripada monyet kontrol (tidak diberi ekstrak tepung cacing). Polimerisasi fibrinogen menjadi fibrin berlangsung hanya dalam 10 – 15 detik, sehingga faktor yang membatasi kecepatan yang menyebabkan pembekuan darah biasanya adalah pembentukan aktivator protrombin dan bukan reaksi-reaksi selanjutnya (Guyton, 1982). Aktivator protrombin terbentuk melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Masing-masing jalur melibatkan beberapa faktor pembekuan yang berbeda, namun pada akhir jalur terdapat suatu jalur bersama yang melibatkan pengaktifan faktor X yang akan mengaktifkan protrombin dengan bantuan ion kalsium, fosfolipid, dan faktor V (Sacher dan McPherson, 2000). Plasmin dalam tubuh manusia memiliki kemampuan untuk mendegradasi fibrin.

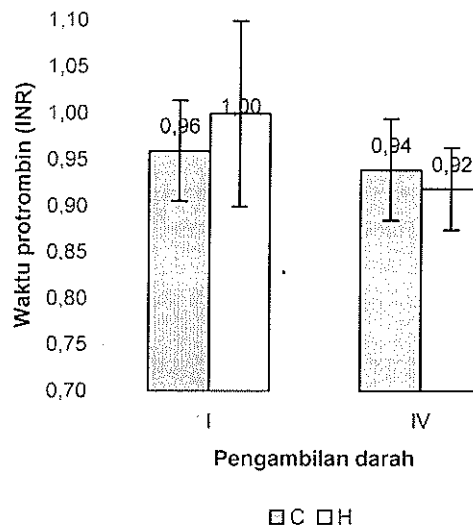
fibrinogen, faktor V, VIII, protrombin, dan faktor XII. Pendegradasian faktor-faktor tersebut dan protrombin akan menghambat terjadinya pembekuan darah. Diduga, aktivitas ekstrak protein cacing dalam tubuh serupa dengan plasmin, di samping sebagai aktivator plasminogen, sehingga pemberian ekstrak protein cacing akan memperlambat terjadinya pembekuan, yang berarti waktu protrombin akan diperpanjang.

Namun hasil pengukuran menunjukkan terjadinya penurunan waktu protrombin baik pada monyet perlakuan ( $14,8 \pm 0,91$  detik menjadi  $14,1 \pm 0,70$  detik) maupun pada monyet kontrol ( $14,7 \pm 0,81$  detik menjadi  $14,1 \pm 0,638$  detik). Perbedaan penurunan waktu protrombin monyet perlakuan dan monyet kontrol hanya 0,1 detik. Hasil pengujian waktu protrombin (dalam detik) dapat dilihat dalam grafik gambar 5.

Dengan menggunakan satuan INR, hasil yang ditunjukkan sedikit berbeda, dimana penurunan waktu protrombin monyet perlakuan ( $1,00 \pm 0,1$  INR menjadi  $0,92 \pm 0,045$  INR) lebih besar daripada penurunan waktu protrombin monyet kontrol ( $0,96 \pm 0,055$  INR menjadi  $0,94 \pm 0,055$  INR). Sehingga selisih penurunan waktu protrombin antara monyet perlakuan dan kontrol dalam satuan INR adalah sebesar 0,06. Hasil pengujian waktu protrombin (dalam INR) dapat dilihat dalam grafik gambar 6.



Gambar 5. Grafik Perubahan Nilai Waktu Protrombin (dalam detik) Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi



Gambar 6. Grafik Perubahan Nilai Waktu Protrombin (dalam INR) Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi

Berdasarkan data tersebut dapat dikatakan bahwa terdapat sedikit perbedaan penurunan waktu protrombin antara monyet kontrol dan monyet perlakuan, dimana penurunan waktu protrombin monyet perlakuan sedikit lebih besar daripada monyet kontrol. Namun hasil tersebut tidak dapat dikatakan sebagai efek dari aktivitas ekstrak tepung cacing, karena efek pemberian ekstrak tepung cacing adalah memperpanjang waktu protrombin. Efek ini juga baru akan terlihat signifikan bila terapi lumbrokinase diberikan pada hewan atau pasien yang mengalami trombosis. Pada monyet sehat, tidak dapat dilihat efek yang nyata dari lumbrokinase terhadap waktu protrombin.

Menurut Clemons (2000), kisaran nilai normal waktu protrombin untuk *Macaca fascicularis* adalah 9,9 – 11,1 detik. Waktu protrombin hasil pengujian terhadap kedua kelompok monyet (kontrol dan perlakuan konsentrasi tinggi) menunjukkan nilai yang lebih besar dari kisaran normalnya.

### 3. Pengukuran Jumlah Trombosit

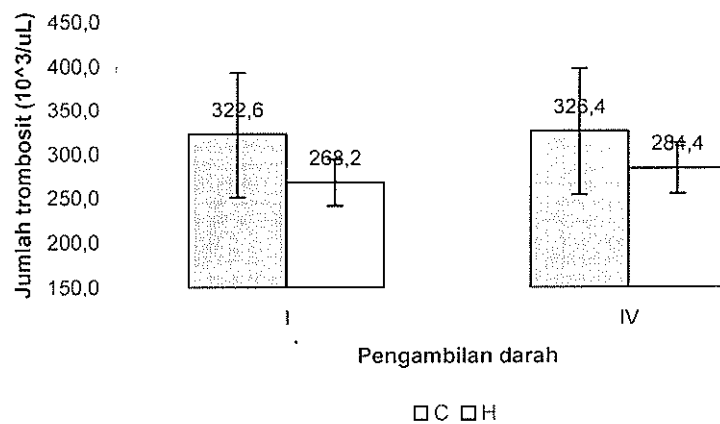
Pengukuran jumlah trombosit dalam tubuh bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak protein tepung cacing terhadap perubahan jumlah trombosit dalam darah monyet uji. Menurut Gawaz et al. (1996)



aktivasi trombosit memicu reaksi peradangan akut, selain itu reseptor fibrinogen pada trombosit memainkan peranan sentral dalam agregasi trombosit dan pembentukan thrombus. Trombosit pada monyet sehat diduga tidak terpengaruh jumlahnya oleh pemberian ekstrak protein tepung cacing namun akan mengalami perubahan apabila ekstrak protein tepung cacing diberikan pada pasien trombotosis, dimana jumlah trombosit dalam darahnya akan mengalami penurunan. Hasil pengukuran kadar trombosit darah monyet perlakuan konsentrasi tinggi dan kontrol dapat dilihat pada gambar 7.

Pada gambar tersebut dapat dilihat bahwa ada sedikit kenaikan jumlah trombosit baik pada monyet kontrol maupun perlakuan. Namun kecilnya angka kenaikan tersebut ( $3,8 \times 1000/\mu\text{L}$  pada monyet kontrol dan  $16,2 \times 1000/\mu\text{L}$  pada monyet perlakuan) dapat diabaikan, sehingga dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak protein cacing tanah tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah trombosit monyet sehat.

Menurut Clemons (2000), kisaran jumlah trombosit normal untuk *Macaca fascicularis* adalah  $300 - 512 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Monyet kontrol memiliki kadar trombosit dalam kisaran normal ( $322,6 - 326,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) sedangkan monyet perlakuan konsentrasi tinggi memiliki kadar trombosit di bawah kisaran normal ( $268,2 - 284,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ ).



Gambar 7. Grafik Perubahan Jumlah Trombosit ( $1000/\mu\text{L}$ ) Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing, pada Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi

Jin *et al.* (2000) 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 darah. Terapi lumbrokinase sebagai obat trombolitik mampu menurunkan kadar trombosit para pasien tersebut. Selain aterosklerosis, terapi enzim ini juga telah diterapkan pada penderita penyakit infark jantung, serebrovaskuler, dan emboli paru.

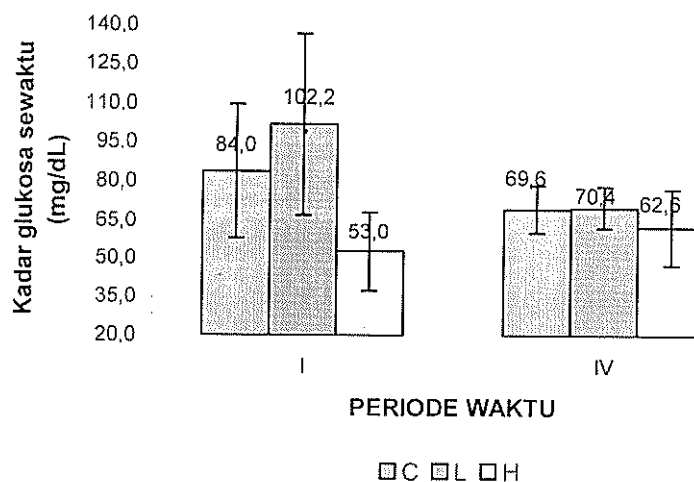
#### **4. Kadar Glukosa darah**

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak protein tepung cacing terhadap penyakit diabetes, yang dapat dilihat dari perubahan kadar glukosa darah setelah perlakuan pemberian ekstrak selama 30 hari. Selain itu kadar glukosa juga diamati sebagai parameter fisiologis tubuh, untuk mengetahui dampak pemberian ekstrak protein terhadap nilai normal kadar glukosa darah. Penyakit diabetes dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel endotel yang apabila berkelanjutan akan menimbulkan peningkatan kadar PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) dalam darah yang akan berdampak pada berkurangnya aktivitas fibrinolisis untuk mendegradasi fibrin yang menempel pada dinding pembuluh darah. Akibatnya, akan terjadi penumpukan fibrin dan trombosit pada dinding pembuluh darah yang selanjutnya akan menimbulkan trombus (Escandon dan Cipolla, 2001). Tiga efek kekurangan insulin menurut Guyton (1982) adalah: (1) pengurangan penggunaan glukosa oleh sel-sel tubuh yang mengakibatkan peningkatan konsentrasi gula darah, (2) peningkatan nyata mobilisasi lemak dari daerah-daerah penyimpanan lemak yang menyebabkan pengendapan lipid pada dinding vaskular yang mengakibatkan aterosklerosis, dan (3) pengurangan protein dalam jaringan tubuh.

Berdasarkan hasil pengujian darah monyet perlakuan konsentrasi rendah, tinggi, dan kontrol dapat dilihat bahwa terjadi kenaikan kadar gula darah pada monyet perlakuan konsentrasi tinggi, sedangkan pada monyet perlakuan konsentrasi rendah dan kontrol mengalami penurunan kadar gula darah. Kenaikan gula darah yang terjadi pada monyet perlakuan

konsentrasi tinggi tidak terlalu banyak (9,6 mg/dL), apabila dibandingkan dengan penurunan gula darah monyet perlakuan konsentrasi rendah (31,8 mg/dL) dan monyet kontrol (14,4 mg/dL). Dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak protein tepung cacing dalam konsentrasi tinggi tidak memberikan perubahan kadar gula darah pada monyet sehat. Pemberian ekstrak protein dalam konsentrasi rendah dapat menurunkan kadar gula darah monyet sehat namun tidak terlalu signifikan mengingat monyet kontrol juga mengalami penurunan kadar gula darah (selisih penurunan kadar gula darah monyet perlakuan konsentrasi rendah dan monyet normal adalah sebesar 17,4 mg/dL). Rangkuman hasil pengukuran kadar gula darah ketiga kelompok monyet dapat dilihat pada gambar 8.

Kisaran kadar glukosa normal *Macaca fascicularis* jantan dewasa menurut Verlangieri et al., (1985) adalah 44 – 84 mg/dL. Monyet kontrol pada kondisi baseline memiliki kadar glukosa darah sedikit di atas kisaran normal, namun pada akhir periode perlakuan kadar glukosa telah berada dalam kisaran normal. Peningkatan kadar glukosa darah dapat terjadi karena kerusakan sel-sel beta pankreas yang mengakibatkan produksi insulin berkurang atau karena adanya resistensi insulin di tingkat jaringan (Sacher dan McPherson, 2000). Resistensi insulin di tingkat jaringan dapat disebabkan oleh tertutupnya reseptor insulin oleh komponen kolagen. Menurut Nakajima et al (2000), protease *L. rubellus* mampu mendigesti berbagai substrat protein termasuk diantaranya adalah kolagen sehingga ekstrak protein cacing diduga dapat mendegradasi komponen kolagen sehingga reseptor insulin jaringan dapat berfungsi normal kembali.



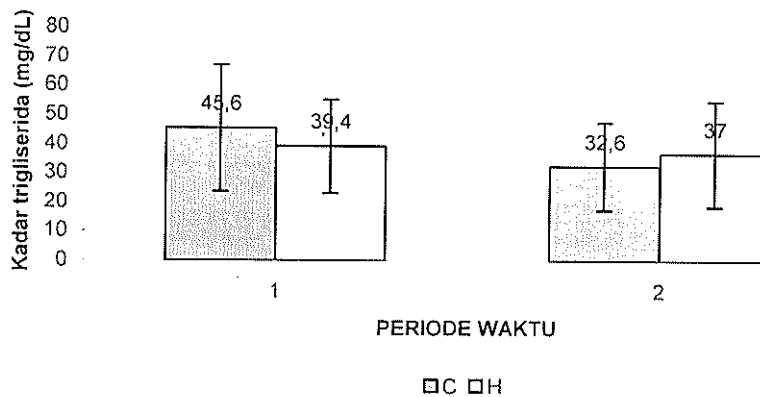
Gambar 8. Grafik Perubahan Kadar Gula Darah Ketiga Kelompok Monyet pada Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing

## 5. Pengukuran Kadar Trigliserida darah

Peningkatan kolesterol, peningkatan trigliserida, kadar HDL yang rendah, dan *small dense* LDL merupakan prediktor independen untuk penyakit jantung koroner (Talmud et al., 2002). Epidemik obesitas di negara maju dan berkembang telah menyebabkan peningkatan jumlah pasien dengan konsentrasi trigliserida plasma yang tinggi. Para ahli memperdebatkan peranan *triglyceride-rich lipoprotein* (TRL) dalam aterosklerosis (Haynes, 2003). Pengujian kadar trigliserida darah bertujuan untuk melihat pengaruh terapi lumbrokinase terhadap penurunan kadar trigliserida sebagai parameter tidak langsung pendegradasian trombus pada penderita atrosklerosis dan sebagai parameter fisiologis tubuh, untuk mengetahui dampak pemberian ekstrak protein terhadap nilai normal kadar trigliserida.

Pemberian ekstrak tepung cacing terhadap monyet perlakuan konsentrasi tinggi tidak memberikan dampak yang nyata terhadap penurunan kadar trigliserida monyet tersebut. Hal ini dapat dilihat dalam gambar 9. Penurunan kadar trigliserida darah yang lebih nyata terjadi pada monyet kontrol (13 mg/dL), sedangkan pada monyet perlakuan penurunan kadar trigliserida yang terjadi sangat kecil (2,4 mg/dL). Kisaran kadar trigliserida normal untuk *Macaca fascicularis* jantan dewasa adalah 35 – 100 mg/dL (Verlangieri et al., 1985). Kadar trigliserida darah monyet

kontrol dan perlakuan berada dalam kisaran normal tersebut, baik sebelum maupun sesudah pemberian sampel.



Gambar 9. Grafik Perubahan Kadar Trigliserida Kelompok Monyet Kontrol dan Perlakuan Konsentrasi Tinggi pada Kondisi *Baseline* dan Setelah Pemberian Ekstrak Tepung Cacing

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

Uji WBCLT adalah pengujian untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk pelarutan kembali darah yang membeku. Nilai WBCLT berbanding terbalik dengan pelarutan thrombi, artinya jika pelarutan thrombi meningkat, sebagai efek pemberian lumbrokinase, maka nilai WBCLT akan semakin singkat.

Uji WBCLT serupa dengan uji retraksi bekuan. Uji retraksi bekuan digunakan untuk menguji fungsi trombosit. Setelah darah membeku, bekuan darah mengerut dan pada proses pengerutan sejumlah serum akan keluar dari bekuan sehingga bekuan menjadi kenyal. Proses ini ditentukan oleh jumlah trombosit per volume darah dan oleh fungsi trombosit. Retraksi sebenarnya ditentukan oleh banyak faktor seperti kadar fibrinogen, dan faktor lain dalam serum yang mendorong terjadinya retraksi dan jenis permukaan yang bersentuh dengan darah beku (Gandasoebrata, 1968).

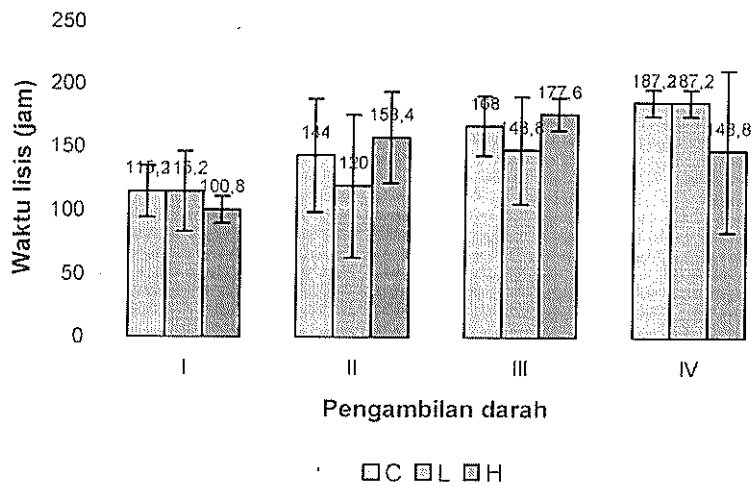
Konsistensi bekuan juga harus kenyal, apabila lembek dan lapuk bekuan akan lebih mudah dipecahkan. Retraksi mulai terjadi satu jam sesudah darah membeku dan sempurna setelah lewat 24 jam. Bekuan darah yang diperoleh dari uji retraksi bekuan dapat dipakai untuk menguji adanya lisis bekuan yang mencepat. Bekuan disimpan dalam inkubator

37°C dan lewat 24, 48, dan 72 jam diperiksa apakah terjadi lisis, yakni mencairnya bekuan. Dalam keadaan normal lisis terjadi setelah lewat 72 jam (Gandasoebrata, 1968).

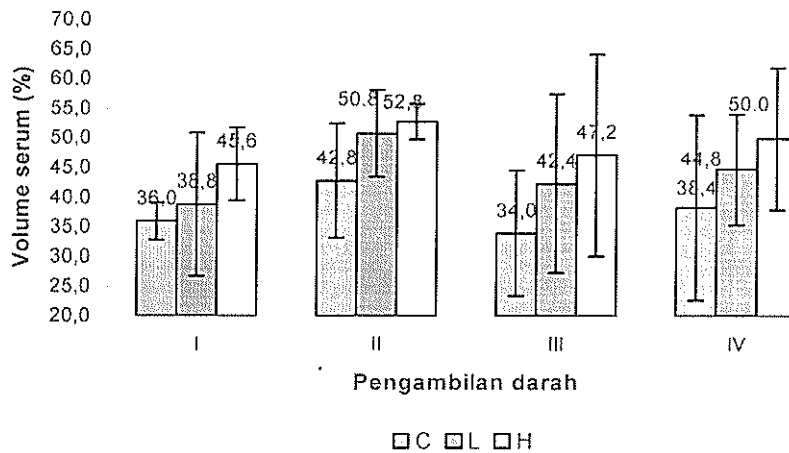
Hasil pengujian WBCLT terhadap kelompok monyet kontrol dan perlakuan konsentrasi rendah menunjukkan hasil yang meningkat dari periode awal (baseline) sampai periode akhir (final). Pada monyet perlakuan konsentrasi tinggi, nilai WBCLT tertinggi terjadi pada periode ke-3, dan selanjutnya pada periode terakhir terjadi penurunan kembali. Hasil WBCLT pada ketiga monyet tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak protein cacing tanah pada monyet normal tidak berpengaruh terhadap kecepatan penguraian bekuan darah, karena hasil yang terjadi bukan penurunan nilai WBCLT, seperti yang diharapkan, melainkan peningkatan. Hal yang dapat diperhatikan adalah ukuran bekuan darah yang terbentuk, kecenderungannya adalah monyet kontrol memiliki ukuran bekuan darah paling besar sedangkan monyet perlakuan konsentrasi tinggi memiliki ukuran bekuan darah yang paling kecil. Dari hal tersebut diduga pemberian ekstrak protein tepung cacing juga berpengaruh terhadap proses pembekuan pembekuan darah monyet.

Dilihat dari volume serum yang terbentuk di awal pembekuan darah, ketiga kelompok monyet menunjukkan kecenderungan yang sama yaitu terjadi peningkatan volume serum pada periode kedua, kemudian menurun pada periode ketiga, dan meningkat kembali pada periode keempat. Volume serum terbanyak terjadi pada periode kedua. Apabila membandingkan nilai persen perubahan (% change) volume serum masing-masing kelompok perlakuan, nilai perubahan terbesar terjadi pada kelompok perlakuan konsentrasi rendah (L) yaitu sebesar 13,39%, kedua terbesar adalah kelompok perlakuan konsentrasi tinggi (H) sebesar 8,80%, dan yang ketiga adalah kelompok kontrol (C) sebesar 6,25%.

Hasil perubahan volume serum dari ketiga kelompok monyet tidak dapat digunakan sebagai acuan terjadinya pengaruh ekstrak protein tepung cacing karena nilai hasil yang diperoleh kurang baik (tidak dapat ditentukan kecenderungan meningkat/menurun). Data WBCLT dapat dilihat pada gambar 10 sedangkan perubahan volume serum dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 10. Perubahan Nilai WBCLT (waktu lisis bekuan darah) Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing



Gambar 11. Perubahan Volume Serum Darah Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing Selama Empat Perode (30 hari)

Volume serum yang dikeluarkan secara spontan dari bekuan menjadi ukuran bagi retraksi bekuan yang terjadi. Dalam keadaan normal jumlah serum adalah 40 – 60% dari jumlah darah, apabila kurang dari 40% mungkin terdapat keabnormalan. Jika darah yang diperiksa memiliki nilai hematokrit rendah, dengan sendirinya jumlah serum yang diperas keluar lebih banyak dari biasa. Pada keadaan tersebut (dan juga pada eritrositosis) sebagai pengganti retraksi bekuan dapat diukur jumlah serum yang tertinggal dalam bekuan, yaitu volume cairan bekuan (*fluid volume of the clot*) (Gandasoebrata, 1968).

## 7. Perubahan Berat Badan Monyet Ekor Panjang

Perubahan berat badan ketiga kelompok monyet menjadi salah satu faktor yang diperhatikan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak protein tepung cacing terhadap kesehatan dan nafsu makan monyet tersebut. Penurunan berat badan akan terjadi apabila ekstrak protein mengganggu kesehatan monyet perlakuan atau nafsu makannya dan sebaliknya peningkatan berat badan terjadi bila ekstrak protein tidak memberikan dampak apapun atau memperbaiki kesehatan tubuh monyet maupun nafsu makannya.

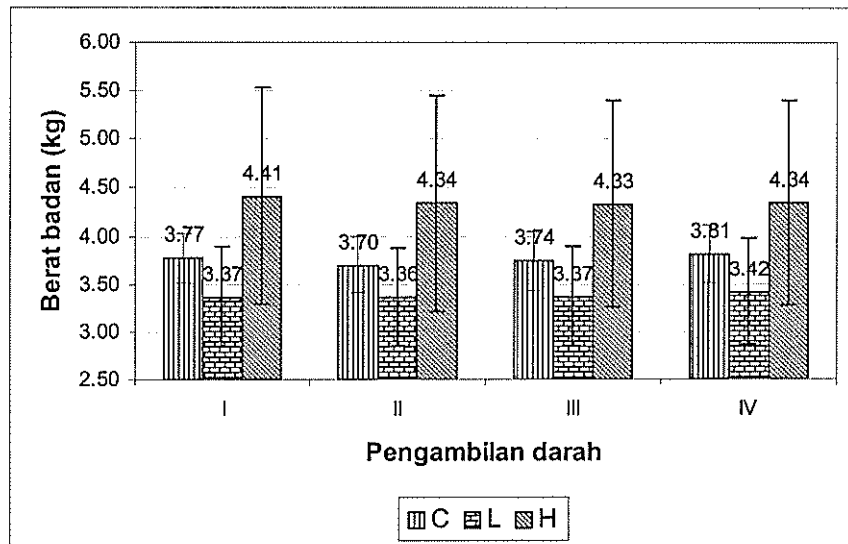
Menurut Fortman et al. (2002) berat badan satwa primata dapat memberikan informasi penting tentang kesehatan hewan dan kesejahteraannya. Berat badan harus diketahui, dicatat, dan dibandingkan dengan berat badan terdahulu secara reguler. Hewan yang mengalami penurunan berat badan sebesar 10% atau lebih harus dilaporkan kepada dokter hewan.

Penimbangan dilakukan sebelum pengambilan darah monyet. Perbandingan berat badan monyet periode awal (baseline) dan akhir (final) menunjukkan sedikit penurunan pada monyet kelompok H sebesar 0,07 kg, sedangkan kelompok kontrol dan perlakuan L mengalami sedikit kenaikan masing-masing sebesar 0,04 kg dan 0,05 kg. Dari hasil penimbangan berat badan monyet kontrol, monyet perlakuan H, dan monyet perlakuan L tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak protein tepung cacing tidak mengakibatkan perubahan berat badan yang berarti selama empat periode (cenderung konstan) karena perubahan berat badannya kurang dari 10% berat badan awal. Hal ini sangat diharapkan karena akan membuktikan bahwa pemberian ekstrak protein tidak menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan monyet perlakuan. Rangkuman perubahan berat badan dalam bentuk grafik dapat dilihat pada gambar 12.

Frekuensi penimbangan berat badan ditentukan oleh kebutuhan proyek penelitian, umur, dan status kesehatan hewan, sistem pengandangan dimana hewan dipelihara, dan penilaian profesional staf dokter hewan. Secara umum, berat badan harus dikaji selama pemeriksaan fisik dan pengujian kulit tuberkulin. Lebih jauh lagi, banyak fasilitas



memperoleh berat badan di dalam penggabungan dengan sanitasi kandang (Fortman et al., 2002).



Gambar 12. Perubahan Berat Badan Ketiga Kelompok Monyet Sebelum dan Sesudah Pemberian Ekstrak Protein Tepung Cacing Selama Empat Periode (30 hari)

Berdasarkan hasil-hasil uji *in vivo* dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak cacing dan ekstrak protein cacing tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap parameter-parameter uji (D-Dimer, waktu protrombin, jumlah trombosit, kadar glukosa, kadar trigliserida, dan WBCLT) karena perubahan yang terjadi sangat kecil nilainya dan masih terdapat dalam kisaran nilai normal masing-masing, demikian pula pengaruhnya terhadap perubahan berat badan monyet ekor panjang (Erwin, *unpublished data*). Adanya residu amonium sulfat dalam ekstrak protein, walaupun mengurangi jumlah ekstrak protein murni yang dikonsumsi oleh monyet perlakuan, tidak memberikan dampak negatif terhadap kondisi tubuh monyet perlakuan secara umum.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

Hasil pengujian cakram fibrin ekstrak protein tepung cacingdan produk lumbrokinase komersial membuktikan bahwa keduanya memiliki aktivitas fibrinolitik yang mampu bekerja selama 24 jam inkubasi, hal ini terlihat dari terbentuknya halo pada media fibrin. Ukuran halo menunjukkan bahwa ekstrak protein memiliki aktivitas fibrinolitik lebih besar daripada produk lumbrokinase komersial dan enzim kasar. Hasil zimogram menunjukkan bahwa ekstrak enzim kasar terdiri dari tujuh fraksi sedangkan lumbrokinase komersial terdiri dari enam fraksi. Posisi pita lumbrokinase komersial serupa dengan ekstrak cacing sehingga diduga lumbrokinase komersial terbuat dari tepung cacing *Lumbricus rubellus*.

Aktivitas spesifik ekstrak protein, yang diekstrak dengan amonium sulfat 65%, bernilai 349,41% lebih besar daripada aktivitas enzim ekstrak cacing dan 314,05% lebih besar daripada produk lumbrokinase komersial. Sedangkan aktivitas enzim per gram tepung cacing dari ekstrak protein bernilai 702,35% lebih besar daripada konsentrasi protein ekstrak cacing dan 630,03% lebih besar daripada lumbrokinase komersial. Hasil pengujian ekstrak protein secara *in vivo* tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap parameter-parameter pengujian, yaitu: kadar D-Dimer, trombosit, glukosa, trigliserida, waktu protrombin, dan WBCLT. Berat badan ketiga kelompok monyet juga tidak menunjukkan perubahan yang nyata. Hal yang dapat disimpulkan dari pengujian secara *in vivo* adalah ekstrak protein tepung cacing aman, tidak mempengaruhi nilai normal parameter-parameter yang diuji, dan secara umum tidak menimbulkan efek negatif terhadap kesehatan monyet perlakuan. Residu amonium sulfat dalam ekstrak protein, sebanyak 30% dari bobot total, juga tidak menimbulkan dampak negatif terhadap kondisi tubuh monyet secara umum. Kadar trigliserida dan glukosa darah, sebagai parameter fisiologis tubuh, tidak terpengaruh nilainya oleh pemberian ekstrak protein.

## B. SARAN

1. Hasil pengujian ekstrak protein secara *in vivo* akan lebih nyata perubahannya bila menggunakan monyet *Macaca fascicularis* yang menderita aterosklerosis. Hal ini dapat menjadi pertimbangan yang penting apabila akan dilakukan pengujian lanjutan.
2. Waktu pemberian pakan perlakuan sebaiknya lebih lama mengingat bahwa beberapa parameter uji membutuhkan waktu yang cukup lama untuk dapat melihat perubahannya sampai ke tahap konstan.
3. Untuk dapat mengolah data dengan statistik tingkat lanjut monyet yang digunakan dalam percobaan lebih baik ditambahkan jumlahnya (minimal 20 ekor).
4. Dapat dilakukan pengukuran aktivitas enzim dari darah monyet perlakuan untuk mengetahui besarnya ekstrak protein yang terabsorpsi oleh tubuh.
5. Uji toksisitas dapat dilakukan dengan menggunakan tikus untuk dapat mengetahui ada atau tidaknya sifat toksik dari ekstrak protein apabila dikonsumsi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bonadio, C. 2000. "Macaca fascicularis" (On-line), Animal Diversity Web. diakses 2 Maret 2004 di [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Macaca\\_fascicularis.html](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.
- Carolyn M, J. Yamashiro, S. De Mers, Carol E. 1996. Engineering a rational primate space requirement. *Lab. Animal.* 25 : 44-47
- Choi E, Kwon S, Choi Y, Rhee S. 1996. Lumbrokinase-3(1) precursor *Lumbricus rubellus*. (Accession No Q25395) [TREMBL] [1 Nov 1996].
- Clemons, D. 2000. Personal communication. Di dalam: Fortman, J. D., T. A. Hewett, B. T. Bennett. 2002. *The Laboratory Nonhuman Primate*. CRC Press. Boca Raton, Florida
- 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.
- 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, 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.
- Fortman, J. D., T. A. Hewett, B. T. Bennett. 2002. *The Laboratory Nonhuman Primate*. CRC Press. Boca Raton, Florida
- Gandasoebrata R. 1968. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat
- Guyton, A. C. 1982. *Human Physiology and Mechanisms of Disease* 3<sup>rd</sup> ed. W. B. Saunders Company
- Haynes, W. G. 2003. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Vascular Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 : 153-155
- Hegner RW, Engemann JG. 1968. *Invertebrate Zoology*. New York: Macmillan.
- Henrickson, R. V. 1984 *Biology and disease of Old World Primates*. Di dalam: Murwatyo. 1994. *Penangkaran Macaca fascicularis* sebagai Salah Satu Alternatif Penyediaan Hewan Laboratorium Biomedis. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. - : 21

- 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.
- Katzung BG. 2002. *Farmakologi: Dasar dan Klinik*. Ed. ke-8. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, penerjemah. Jakarta: Salemba Medika. Terjemahan dari: *Basic and Clinical Pharmacology*. hlm 389-405.
- Kelley, S. T., dan Arthur S. H. 1995. *Housing Biology and Management*. Academic Press, Inc. San Diego, California. - : 193-199
- 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.
- Kursus Singkat. 1991. *Penanganan Stwa Primata sebagai Hewan Laboratorium*. Pusat Studi Satwa Primata Lembaga Penelitian Institut Pertanian Bogor. Bogor. - : 1-18
- Liberatore, G. T., Andre S, Christopher B, Wolf-Dieter S, Robert L. M. 2003. Vampire Bat Salivary Plasminogen Activator (Desmoteplase). *American Heart Association, Stroke*. 34 : 537
- Medway, L. A. 1978. *The Wild Mammals of Malaya and Offshore Island Including Singapore*. Oxford University Press. London. Di dalam : Djara, F. F. 1994. Penggunaan Biskuit sebagai Pengganti Pakan Komersial *Macaca fascicularis* di Karantina PSSP LP-IPB, Darmaga. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Jurusan Biologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor. - : 1-2
- 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.
- Murwatyo. 1994. *Penangkaran Macaca fascicularis sebagai Salah Satu Alternatif Penyediaan Hewan Laboratorium Biomedis*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. - : 1-46

- 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.
- Napier, J. R. dan P. H. Napier. 1967. A Handbook of Living Primate. Academic Press. London, - : 69-71
- 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.
- 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
- Roberts, J. A. 1977. Environmental enrichment, providing psychological wellbeing for people and primates. American Journal of Primatology Supplement, 1 : 25-30

- Sacher R. A., McPherson R. A. 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, 9-14
- Smith, B dan Mangkoewidjojo. 1988. Primata Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. UI Press Jakarta. - : 219-228
- Smith, B. H., T. L. Crummett, K. L. Brandt. 1994. Ages of eruption of primate teeth: a compendium from aging individual and comparing life histories. Yearbook Phys. Antropol., 37, 177
- Suhartono MT. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Suhartono MT. 1992. Protease. Bogor: IPB PAU Bioteknologi.
- Swenson S, Bush LR, Markland FS. 2000. Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, possesses inhibitory activity on platelet aggregation. Arch Biochem Biophys. Dec 15;384(2):227-37.
- Talmud, P. J., Hawe E, Miller G. J., Humphries S. E. 2002. Nonfasting Apolipoprotein B and Triglyceride Levels as a Useful Predictor of Coronary Heart Disease Risk in Middle-Aged UK Men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22 : 1919-1923
- Tjay TH, Rahardja K. 2002. Obat-obat Penting. Ed ke-5. Jakarta: Elex Media Komputindo. hlm 572-582.
- 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.
- Wemelsfelder, F. dan T. Gierde. 1989. Guidelines for Adequate Housing and Care of Human Promates in Zoos. National Foundation for Research in Zoological Garden. Amsterdam. Netherlands. - : 415
- Yanti. 2003. Pemurnian dan Karakterisasi Protease Cacing Tanah *Lumbricus rubellus* yang Bersifat Fibrinolitik. Thesis. Program Pascasarjana Ilmu Pangan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

# LAMPIRAN



## Lampiran 1. Daftar Pereaksi yang Digunakan dan Cara Pembuatannya

### a. Spektrofotometri Untuk Pengukuran Konsentrasi Protein

#### **Bovine Serum Albumin (BSA) 1 mg/ml**

Sebanyak 0,1 g BSA dilarutkan dalam akuades dengan diaduk stirrer (perlahan, jangan sampai berbusa) dan ditera hingga volume total 100 ml

#### **Pereaksi Bradford (stock solution)**

Sebanyak 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan dalam 25 ml etanol 95%v/v, lalu ditambahkan 50 ml asam fosfat 85%v/v dan 25 ml akuades. Campuran larutan tersebut diaduk dengan stirrer sampai homogen

#### **Pereaksi Bradford (working solution)**

Sebanyak 10 ml pereaksi Bradford (stock solution) diencerkan dengan 90 ml akuades, lalu diaduk stirrer hingga larut homogen (pengenceran 10x)

### b. Pengukuran Aktivitas Enzim Proteolitik

#### **Buffer fosfat 0,2M pH 8,0**

Larutan A: 0,2M larutan Na fosfat monobasis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  2,7598g/100 ml)

Larutan B: 0,2M larutan Na fosfat dibasis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  14,196g/500 ml)

Dibuat X% larutan A + Y% larutan B, dengan volume larutan B 473,5 ml dan larutan A dicampurkan sedikit-sedikit sambil diukur pHnya dengan pH meter sampai nilai pH nya 8,0

#### **Kasein 2% b/v**

Sebanyak 0,5g kasein Hammarsten atau kasein teknis dilarutkan dalam 15 ml buffer fosfat 0,05M pH 8,0 (ditambahkan sedikit-sedikit) sambil distirrer dan dipanaskan ( $\pm 50 - 60^\circ\text{C}$ ) supaya mudah larut, lalu ditera dengan akuades hingga volume total 25 ml.

#### **Tirosin 5mM**

Sebanyak 22,65mg tirosin dilarutkan dalam 25 ml buffer fosfat 0,05M pH 8,0, ditambahkan sedikit-sedikit sambil distirrer.

#### **Asam Trikloroasetat 0,1M**

Sebanyak 3,268g TCA dilarutkan dalam 200ml akuades, ditambahkan sedikit-sedikit sambil distirrer

#### **$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,4M**

Sebanyak 10,601g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam akuades sedikit-sedikit sambil

distirrer, lalu ditera hingga volume total 250ml

### **Folin Ciocalteau**

Sebanyak 30 ml larutan Folin Ciocalteau komersial dilarutkan dengan 60ml akuades

## **c. Analisis Zimogram**

### **Pereaksi A**

Komposisi larutan A terdiri dari 29,2g akrilamida dan 0,8g bis-akrilamida yang dilarutkan dalam 50 ml akuades dan diaduk stirrer sampai homogen

### **Pereaksi B**

Komposisi larutan terdiri dari 75ml buffer Tris-HCl 2M pH 8,8, 4ml SDS 10%b/v, dan ditera dengan akuades hingga volume total 100ml

### **Buffer Tris-HCl 2M pH 8,8**

Sebanyak 24,228g Tris dilarutkan dalam 100ml akuades (tambahkan sedikit-sedikit) sambil distirrer hingga larut, lalu ditera pH-nya hingga 8,8 dengan penambahan HCl 2M.

### **SDS 10%b/v**

Sebanyak 10g SDS dilarutkan dalam akuades sedikit-sedikit sambil distirrer, lalu ditera hingga volume total 100ml (Pengadukan stirrer pelan-pelan supaya tidak berbusa)

### **Pereaksi C**

Komposisi larutan terdiri dari 50ml buffer Tris-HCl 1M p 6,8, 4ml SDS 10%b/v, dan ditera dengan akuades sampai volume total 100ml

### **Buffer Tris-HCl 1M pH 6,8**

Sebanyak 12,114g Tris dilarutkan dalam 100ml akuades, sedikit-sedikit sambil distirrer hingga larut, lalu ditera pH-nya hingga 6,8 dengan penambahan HCl 1M

### **Amonium persulfat (APS) 10%b/v**

Sebanyak 1g APS dilarutkan dalam akuades, sedikit-sedikit sambil distirrer, lalu ditera hingga volume total 10ml

### **Buffer Sampel Zimogram**

Komposisi larutan terdiri dari 1,0g SDS, 1,25ml Tris-HCl 1M pH6,8, 2,0ml gliserol 50%v/v, dan 2ml bromfenol blue 1%b/v sambil diaduk stirrer dan ditera dengan akuades hingga volume total 10ml

**Larutan pewarna (staining solution)**

Komposisi larutan terdiri dari 1,0g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450ml methanol, dan 100ml asetat glacial yang diaduk stirrer dan diencerkan dengan akuades hingga volume total 1000ml.

**Larutan peluntur (destaining solution)**

Komposisi larutan terdiri dari 100ml methanol, dan 100ml asetat glacial yang diaduk stirrer dan diencerkan hingga volume total 1000ml.

**Buffer fosfat 50mN pH8,0**

Dilakukan pengenceran dari stik buffer fosfat 0,2M pH 8,0 dengan rumus  $M_1 V_1 = M_2 V_2$

**Tween 20 2,5%v/v**

Sebanyak 2,5ml Tween 20 dilarutkan dalam 97,5ml akuades (tambahkan sedikit-sedikit) sambil distirrer hingga larutan homogen

**Sampel protein**

Sebanyak 0,05g sampel protein dilarutkan dalam akuades/buffer pH 7, sedikit-sedikit sambil distirrer, lalu ditera hingga volume total 10ml.

**d. Cakram Fibrin****Fibrinogen 0,5%b/v**

Sebanyak 0,25g fibrinogen dilarutkan dengan 50ml buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,0 sedikit-sedikit sambil distirrer sampai homogen

**Trombin 1000NIH**

Sebanyak 25 $\mu$ l stok trombin 2000NIH dilarutkan dengan 975 $\mu$ l buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,0 dalam tabung *appendorf*, kemudian divorteks hingga homogen

## Lampiran 2. Tabel Data Hasil Pengujian *In Vivo*

Tabel 5. Data perubahan berat badan (kg) *Macaca fascicularis*

KP	I							II							III							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	3,40	3,95	3,60	3,90	4,00	3,77	0,26	3,25	3,90	3,55	3,95	3,85	3,70	0,30	3,30	3,90	3,55	4,00	3,95	3,74	0,30	3,40	3,95	3,60	4,10	4,00	3,81	0,30
L	3,30	3,70	3,75	3,60	2,50	3,37	0,52	3,30	3,65	3,75	3,60	2,50	3,36	0,51	3,30	3,65	3,75	3,65	2,50	3,37	0,52	3,30	3,75	3,85	3,70	2,50	3,42	0,56
H	4,70	6,20	3,30	3,85	4,00	4,41	1,12	4,60	6,15	3,25	3,80	3,90	4,34	1,12	4,70	6,00	3,25	3,80	3,90	4,33	1,07	4,80	5,95	3,20	3,85	3,90	4,34	1,07

Tabel 6. Data perubahan kadar trombosit ( $\times 10^3/\mu\text{L}$  darah)

KP	I							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	385	411	285	247	285	322,6	71,15	401	392	277	234	328	326,4	72,2
H	303	263	280	230	265	268,2	26,68	265	294	285	251	327	284,4	29,15

Tabel 7. Data konsentrasi D-dimer (mg/L)

KP	I				IV			
	1	5	Mean	SD	1	5	Mean	SD
C	0,1	0,2	0,15	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
H	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0

Tabel 8. Data perubahan waktu protrombin (detik)

KP	I							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	15,4	13,9	14,9	15,6	13,9	14,7	0,81	14,4	13,6	13,3	14,9	14,2	14,1	0,638
H	15,4	16,0	13,8	14,2	14,4	14,8	0,91	15,2	14,2	14	13,4	13,6	14,1	0,70

Tabel 9. Data perubahan waktu protrombin (INR)

KP	I							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9	0,96	0,055	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	0,94	0,055
H	1,0	1,1	0,9	0,9	1,1	1,00	0,100	1,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,92	0,045

Tabel 10. Data perubahan kadar glukosa (mg/dL)

KP	I							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	101	113	89	69	48	84,0	25,87	83	71	59	72	63	69,6	9,263
L	57	119	133	73	129	102,2	34,80	76	76	77	60	63	70,4	8,204
H	44	41	62	76	42	53,0	15,46	61	66	60	84	42	62,6	15,03

Tabel 11. Data perubahan kadar trigliserida (mg/dL)

KP	I							IV						
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD
C	43	82	34	44	25	45,6	21,76	28	59	27	20	29	32,6	15,18
H	49	62	21	34	31	39,4	16,13	25	65	17	39	39	37,0	18,28

Tabel 12. Data perubahan waktu lisis bekuan darah utuh (jam)

KP	I						II						III						IV						
	1	2	3	4	5	Mean	1	2	3	4	5	Mean	1	2	3	4	5	Mean	1	2	3	4	5	Mean	
C	120	144	96	120	96	115,2	192	120	120	96	192	144	168	192	144	192	144	168	192	168	192	192	192	168	187,2
L	72	144	96	144	120	115,2	96	168	72	72	192	120	120	96	144	192	192	149	192	192	192	192	192	168	187,2
H	96	96	96	120	96	100,8	168	192	96	168	168	158,4	168	168	168	192	192	178	192	48	120	192	192	148,8	

Tabel 13. Data perubahan volume serum pada retraksi bekuan (%)

KP	I								II								III								IV								%Chg
	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD	1	2	3	4	5	Mean	SD					
C	34	40	36	38	32	36,0	3,16	34	54	32	50	44	42,8	9,65	32	30	40	20	48	34,0	10,58	30	62	20	38	42	38,4	15,65	6,25				
L	46	50	44	34	20	38,8	12,05	60	40	50	54	50	50,8	7,29	54	46	46	16	50	42,4	15,13	54	50	30	42	48	44,8	9,34	13,39				
H	42	40	50	42	54	45,6	6,07	50	56	50	52	56	52,8	3,03	44	24	70	56	42	47,2	17,12	38	38	66	54	54	50,0	12,00	8,80				

Keterangan:

KP : kelompok

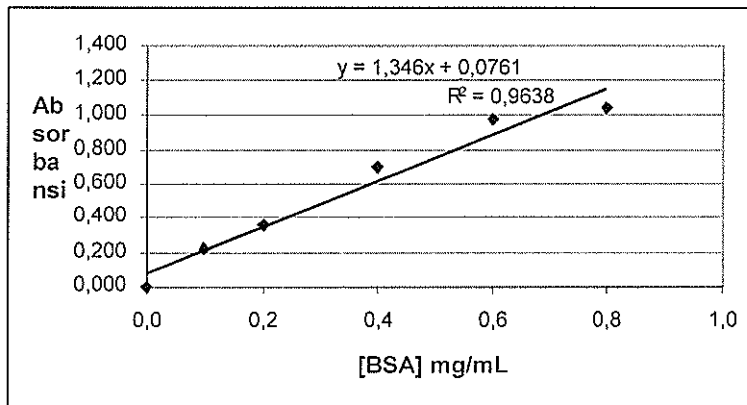
R : nilai rata-rata

SD : nilai standar deviasi

### Lampiran 3. Tabel Absorbansi Standar BSA dan Kurva Standar Konsentrasi Protein

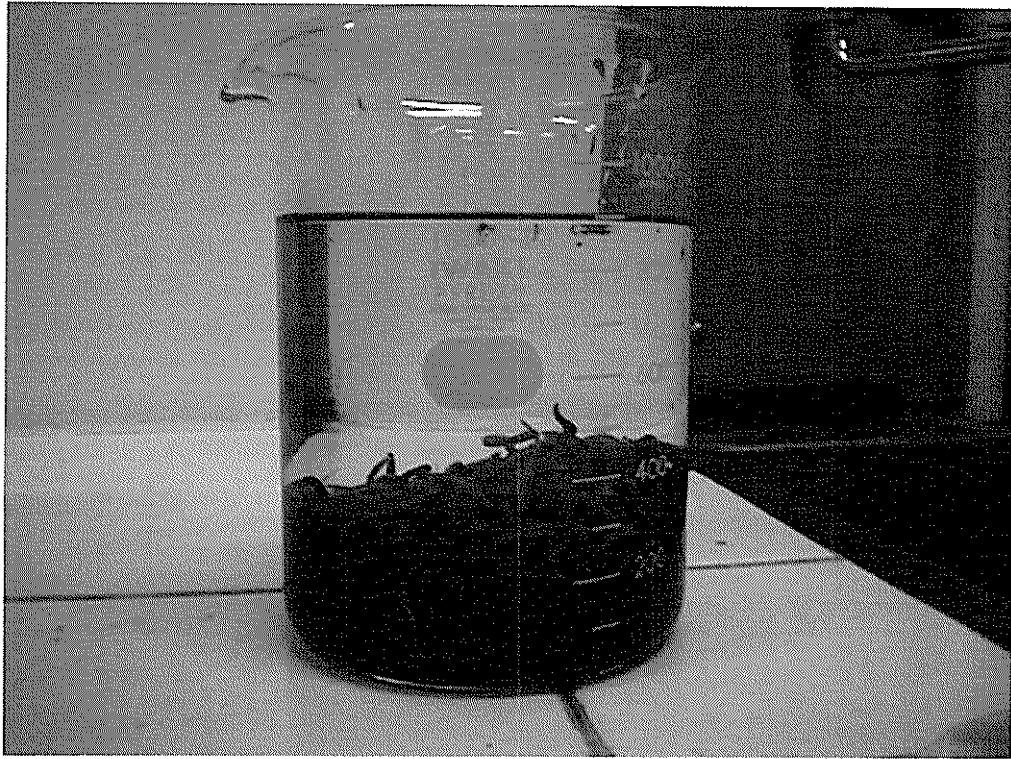
Tabel 14. Hubungan antara konsentrasi larutan standar BSA dengan nilai absorbansi

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

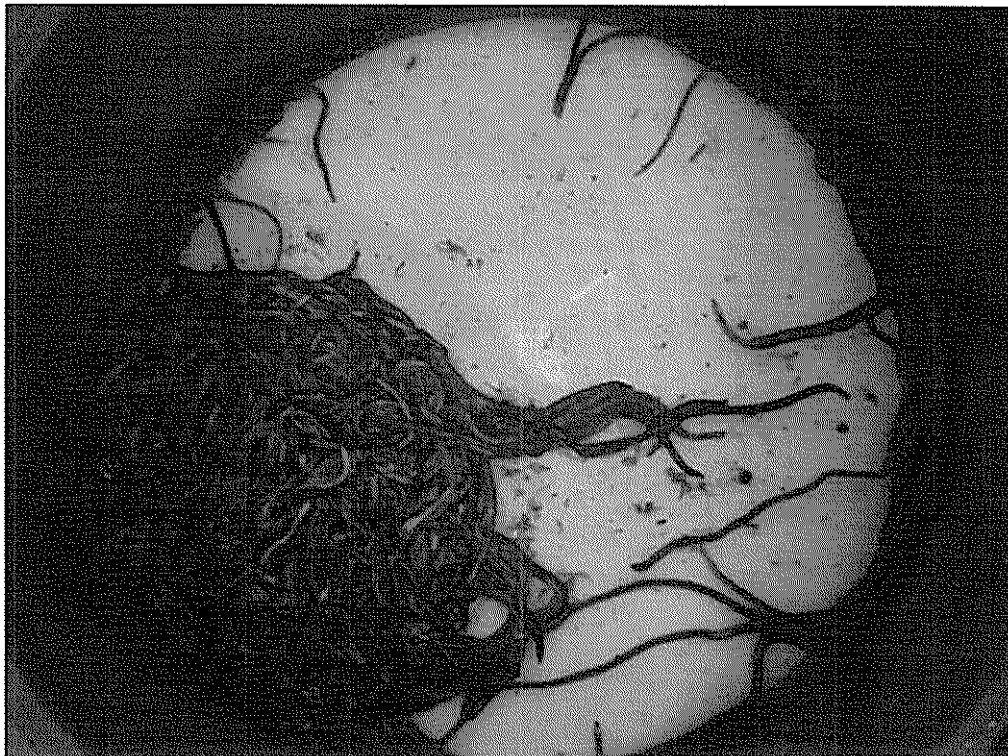


Gambar 13. Kurva standar Bradford

Lampiran 4. Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*



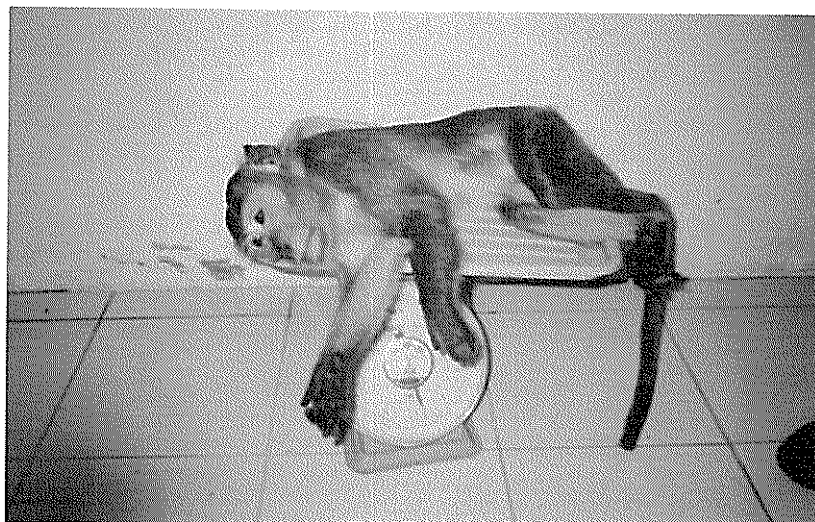
Gambar 14. Cacing *Lumbricus rubellus* dalam akuades



Gambar 15. Cacing *Lumbricus rubellus* setelah perendaman dalam akuades



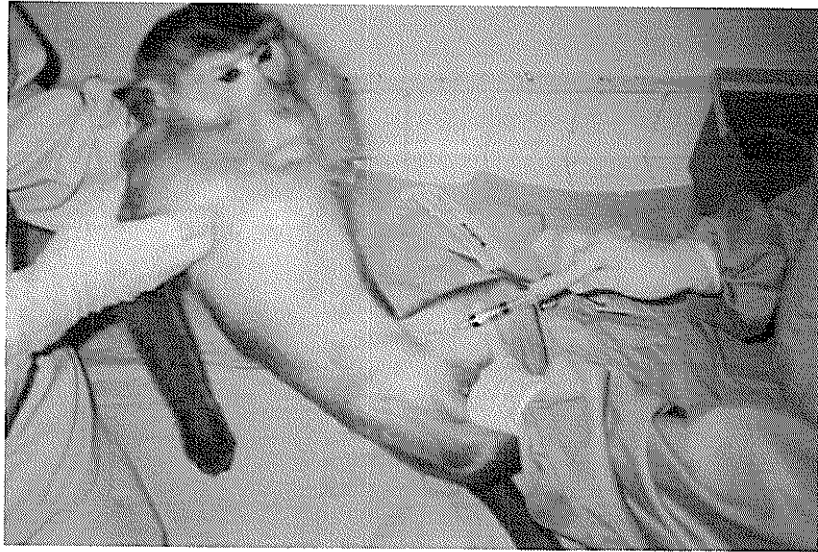
**Lampiran 5. Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*) dan Penanganannya**



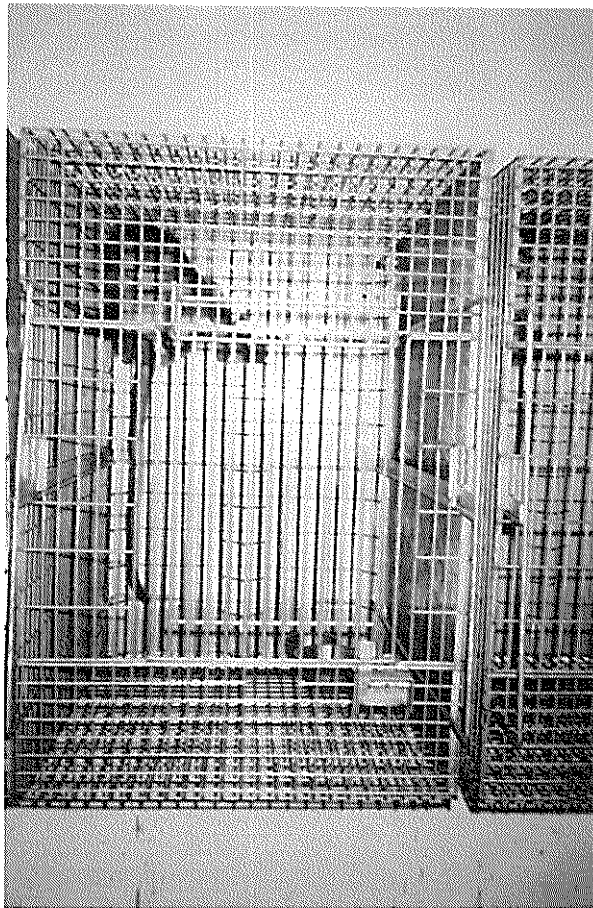
Gambar 16. Penimbangan monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 17. Pemberian sirup pada monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 18. Pengambilan darah monyet *Macaca fascicularis*



Gambar 19. Kandang individu *Macaca fascicularis*

## Lampiran 6. Perhitungan Dosis Pemberian Ekstrak Protein Cacing Kepada Monyet Ekor Panjang (*Macaca fascicularis*)

$$\begin{aligned}\text{Dosis standar untuk manusia} &= 3 \times 250 \text{ mg} \\ &= 750 \text{ mg}\end{aligned}$$

Faktor konversi dosis manusia (BB 70 kg) ke monyet ekor panjang (BB 4 kg) = 0,16

$$\begin{aligned}\text{Dosis rendah untuk monyet ekor panjang} &= (750 \text{ mg} \times 0,16) \times 120\% \\ &\doteq 144 \text{ mg}\end{aligned}$$

Dibulatkan menjadi **150 mg (perlakuan L)**

$$\begin{aligned}\text{Dosis rendah per kg BB monyet ekor panjang} &= 144 \text{ mg} / 4 \text{ kg} \\ &= 36 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis tinggi untuk monyet ekor panjang} &= (3 \times 750 \text{ mg} \times 0,16) \times 120\% \\ &= 432 \text{ mg}\end{aligned}$$

Dibulatkan menjadi **450 mg (perlakuan H)**

$$\begin{aligned}\text{Dosis tinggi per kg BB monyet ekor panjang} &= 432 \text{ mg} / 4 \text{ kg} \\ &= 108 \text{ mg/kg}\end{aligned}$$

**Perhitungan residu ammonium sulfat dalam ekstrak protein:**

$$\begin{aligned}&= 43 \text{ g am.sulfat} / (43 \text{ g am.sulfat} + 2 \text{ g tepung cacing} + 100 \text{ g buffer fosfat}) \\ &= 43 \text{ g} / 145 \text{ g} \\ &= \mathbf{29,66\% (\pm 30\%)}\end{aligned}$$

Sehingga jumlah ekstrak protein yang dikonsumsi oleh monyet perlakuan :

$$\begin{aligned}\text{Dosis rendah} &= 150 \text{ mg} - (30\% \times 150 \text{ mg}) \\ &= \mathbf{105 \text{ mg}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Dosis tinggi} &= 450 - (30\% \times 450 \text{ mg}) \\ &= \mathbf{315 \text{ mg}}\end{aligned}$$

Aktivitas enzim ekstrak protein dapat dihitung dengan rumus :

$$\mathbf{UA = mg \text{ sampel} \times \text{konsentrasi protein (mg/ml)} \times \text{aktivitas spesifik (UA/mg)}}$$