

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 μ 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

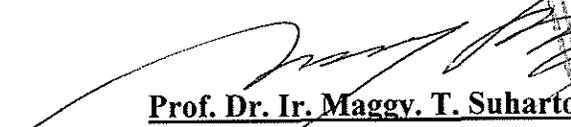
Dilahirkan pada tanggal 30 Juni 1982

Di Semarang

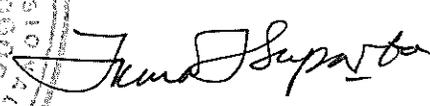
Tanggal lulus: 8 DESEMBER 2004

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