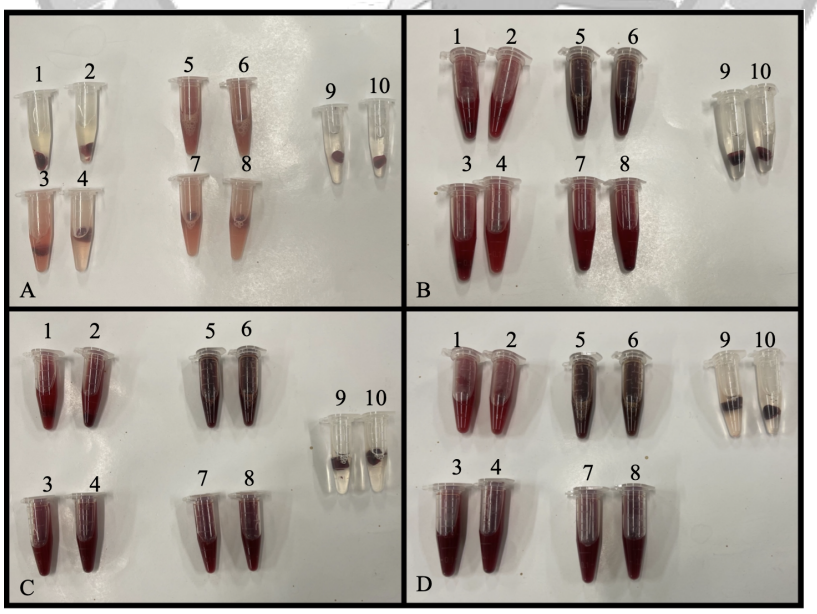
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan beberapa uji untuk mengetahui aktivitas fibrinolitik dari suplemen bromelin dan suplemen nattokinase. Suplemen bromelin yang digunakan merupakan produk komersial yang mengandung 1500 GDU dalam setiap kapsulnya. Pengujian yang dilakukan yaitu uji degradasi gumpalan darah, uji aktivitas fibrinolitik dengan uji degradasi gumpalan *euglobulin*, dan *fibrin plate assay*.

4.1 Uji Degradasi Gumpalan Darah

Uji degradasi gumpalan darah dimulai dengan menginkubasi enzim bromelin dan nattokinase dengan gumpalan darah ayam yang telah ditimbang dengan berat sekitar 0,1 sampai 0,15 gram. Sampel-sampel tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 0, 1, 2, dan 3 jam. Hasil dari uji degradasi gumpalan darah dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil uji degradasi gumpalan darah.

Keterangan: Gambar A: Inkubasi 0 jam; B: Inkubasi 1 jam; C: Inkubasi 2 jam; D: Inkubasi 3 jam; nattokinase sebagai kontrol positif; 1&2: 50 FU nattokinase; 3&4: 500 FU nattokinase; 5&6: 500 GDU bromelin; 7&8: 50 GDU bromelin; 9&10: PBS sebagai kontrol negatif.

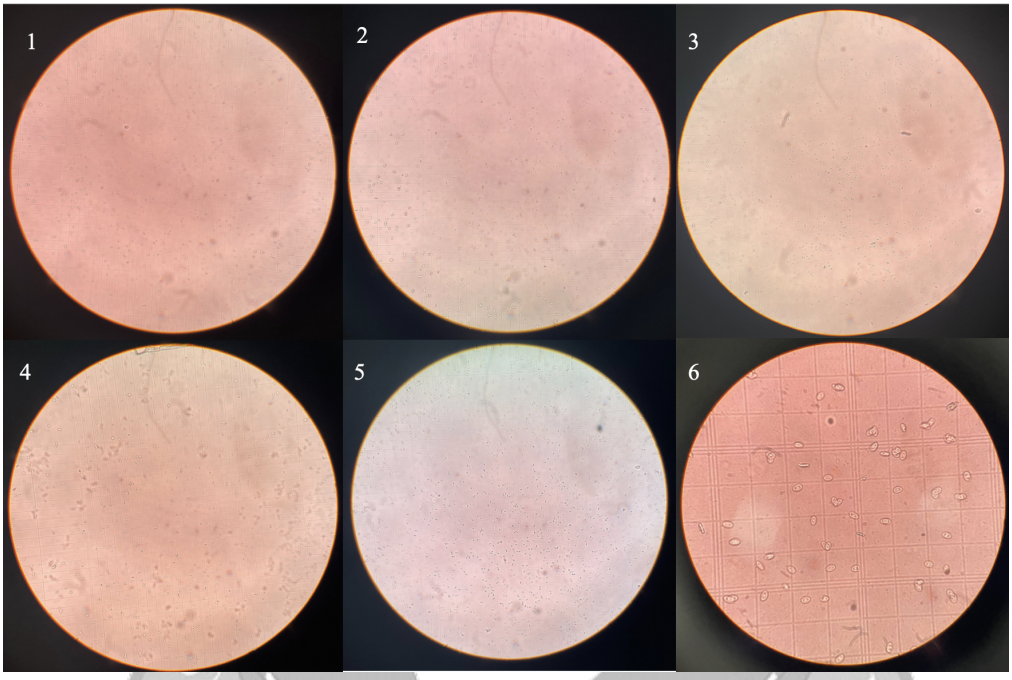
Dapat dilihat dari Gambar 4.1 bahwa semua sampel dapat mendegradasi darah dengan baik yang ditandai dengan perubahan warna larutan dan mengecil atau hilangnya gumpalan darah. Sebaliknya, tidak ada perubahan warna dan ukuran gumpalan pada tabung kontrol negatif yang berisi *phosphate buffer saline* (PBS). Secara visual, dari jam ke-0 hingga jam ke-3 inkubasi, bromelin 50 dan 500 GDU dapat mendegradasi gumpalan darah lebih cepat dibandingkan dengan nattokinase. Pada jam ke-0, semua tabung belum mendegradasi darah kecuali tabung bromelin 500 FU. Dapat dilihat warna tabung bromelin 500 FU terlihat lebih merah dan telah mendegradasi darah lebih cepat daripada yang lainnya. Pada jam ke-1 dan ke-2, pada tabung berisi nattokinase 50 FU terlihat masih ada gumpalan darah yang belum terdegradasi. Pada jam ke-3, nattokinase baru dapat mendegradasi darah sepenuhnya.

Seperti yang bisa dilihat pada Gambar 4.1, warna darah pada bromelin 50 dan 500 GDU lebih keruh daripada nattokinase 50 dan 500 FU. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan warna suplemen antara bromelin dan nattokinase. Suplemen bromelin memiliki warna bubuk kapsul lebih gelap dibandingkan suplemen nattokinase. Untuk mengetahui kemampuan degradasi gumpalan darah secara lebih kuantitatif, dilakukannya perhitungan untuk mengetahui persentase degradasi gumpalan darah dari semua sampel. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus persentase degradasi (%). Hasil perhitungan yang telah diubah menjadi persentase dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil perhitungan persentase uji degradasi gumpalan darah

No	Sampel	Jam ke-	Persentase Degradasi (%)
1	Nattokinase 50 FU (+)	3	99,65
2	Nattokinase 500 FU (+)	3	99,43
3	Bromelin 50 GDU	3	99,95
4	Bromelin 500 GDU	3	96,21
5	PBS (-)	3	0

Dapat dilihat dari hasil perhitungan persentase uji degradasi gumpalan darah pada Tabel 4.1, semua sampel uji dapat mendegradasi gumpalan darah pada jam ke-3 inkubasi. Sampel bromelin 50 dan 500 GDU mampu mendegradasi gumpalan darah dengan baik sehingga persentase yang didapatkan yaitu 99,95 % dan 96,21 %. Sampel nattokinase 50 dan 500 FU juga mampu mendegradasi gumpalan darah dengan persentase 99,65 % dan 99,43 %. Jumlah sel darah yang banyak terlepas ditunjukkan dengan persentase degradasi gumpalan darah yang tinggi. Berdasarkan hasil perhitungan dan observasi visual, dapat disimpulkan bahwa bromelin dapat mendegradasi gumpalan darah secara lebih baik dan lebih cepat dibandingkan nattokinase. Jumlah sel darah merah yang terlepas dari gumpalan darah yang telah terdegradasi dapat dihitung dengan menggunakan alat hemositometer dan dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Tabel 4.2.



Gambar 4.2 Hasil pengamatan hemositometer sel darah merah dengan perbesaran total mikroskop cahaya 100x dan 400x
Keterangan: Perbesaran (100x) 1: bromelin 500 GDU; 2: bromelin 50 GDU; 3: nattokinase 500 FU; 4: nattokinase 50 FU; 5: PBS (-); perbesaran 400x 6: bromelin 50 GDU.

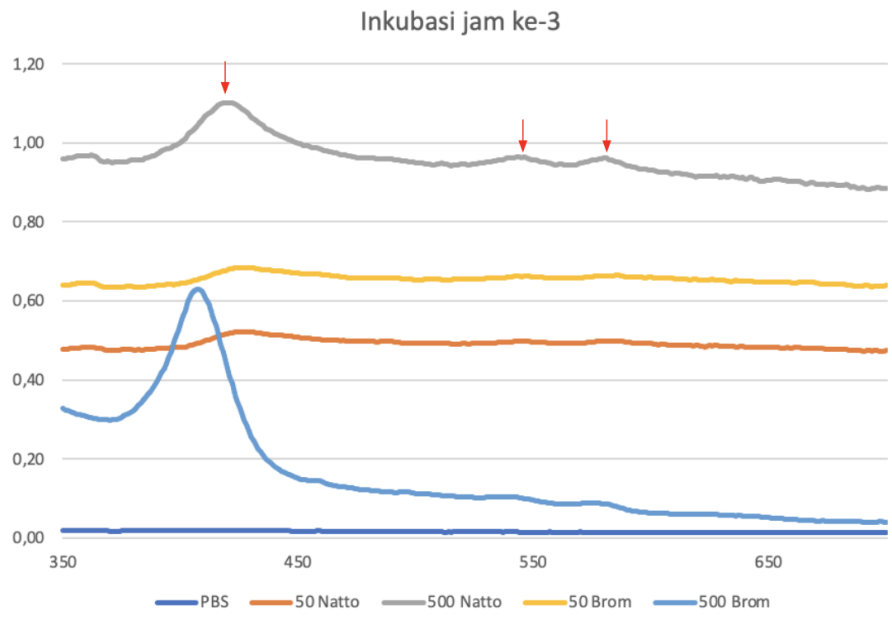
Gambar 4.2 merupakan hasil pengamatan jumlah sel darah yang terlepas dari bromelin 500 GDU, bromelin 50 GDU, nattokinase 500 FU, nattokinase 50 FU, dan PBS yang dihitung menggunakan hemositometer. Pada perbesaran 100x dan 400x terlihat sampel bromelin 50 GDU, bromelin 50 GDU, nattokinase 500 FU, nattokinase 50 FU, dan PBS menunjukkan jumlah sel darah merah yang terlepas cukup banyak. Hal ini disebabkan karena darah tidak mengalami hemolisis. Hemolisis dapat terjadi apabila sel darah merah menjadi rusak atau hancur. Sel darah merah mengandung molekul hemoglobin yang dilepaskan selama hemolisis (Colvin, 2018). Selain itu hal tersebut dapat disebabkan karena adanya aktivitas fibrinolitik dari suplemen bromelin dan suplemen nattokinase. Perhitungan jumlah sel darah merah yang lepas dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Perhitungan jumlah sel darah merah yang terlepas

No	Sampel	Jumlah Sel Darah (Sel/ml)
1	Nattokinase 50 FU	$1,05 \times 10^{9}$
2	Nattokinase 500 FU	$1,55 \times 10^{9}$
3	Bromelin 50 GDU	$1,50 \times 10^{9}$
4	Bromelin 500 GDU	$1,075 \times 10^{10}$
5	PBS (-)	$2,825 \times 10^{10}$

Keterangan: Data di tabel merupakan hasil dari inkubasi 37 °C selama 3 jam. Densitas sel didapatkan berdasarkan rumus (jumlah sel / kotak) x faktor dilusi. Volume kotak yang digunakan adalah 4×10^{-6} ml.

Berdasarkan perhitungan jumlah sel darah merah yang terlepas pada tabel 4.2, dapat dilihat jumlah sel darah yang terlepas pada sampel yang tertinggi adalah nattokinase 500 FU. Kemudian diikuti dengan bromelin 50 GDU, bromelin 500 GDU, nattokinase 50 FU dan PBS. Berikut merupakan analisis *wavelength scan* pada panjang gelombang 300-700 nm menggunakan spektrofotometer yang dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Analisis spektrofotometri uji degradasi gumpalan darah

Keterangan: Kurva (---) PBS sebagai kontrol negatif; nattokinase sebagai kontrol positif; (---) nattokinase 50 FU; (---) nattokinase 500 GDU; (---) bromelin 50 GDU; (---) bromelin 500 GDU.

Dapat dilihat dari Gambar 4.3, hasil absorbansi yang diperoleh yaitu nattokinase 500 FU memiliki absorbansi paling tinggi dari yang lainnya. Kemudian diikuti dengan bromelin 50 GDU, bromelin 500 GDU, nattokinase 50 FU, dan PBS. Dapat dikatakan bahwa absorbansi tersebut tinggi maka artinya banyak sel darah yang terlepas dari gumpalan darah. Pada nattokinase 50 FU menunjukkan adanya *peak* pada panjang gelombang 412, 540, 580 nm. Dari hasil analisis *wavelength scan* yaitu adanya *peak* absorbansi pada panjang gelombang 412, 540, dan 580 nm menunjukkan adanya oksihemoglobin (Surgenor, 1975). Nilai absorbansi sampel dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil analisis spektrofotometri uji degradasi gumpalan darah

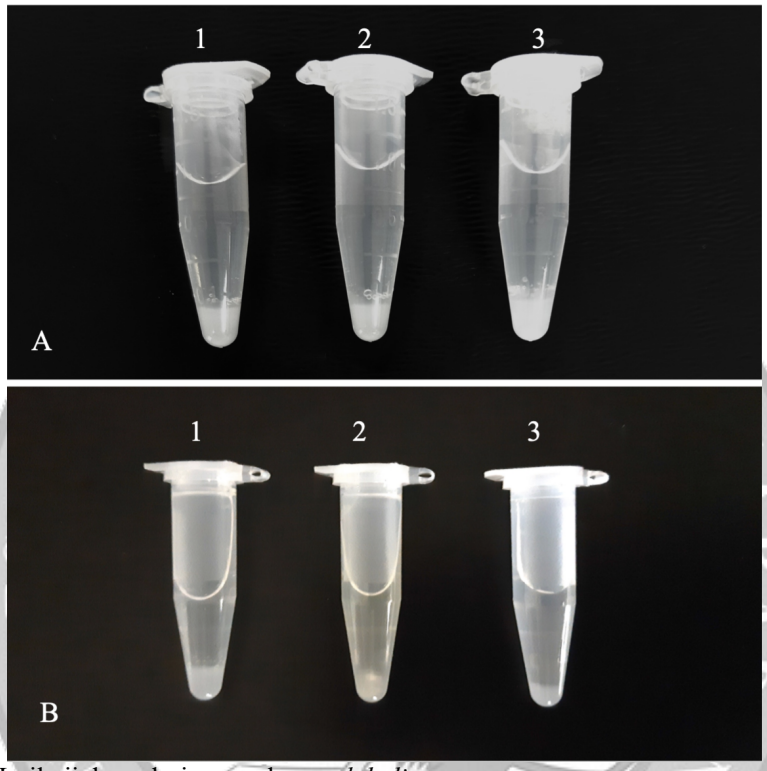
No	Sampel	Panjang Gelombang	Nilai Absorbansi
1	Nattokinase 50 FU	425 nm	0,52
2	Nattokinase 500 FU	420 nm	1,10
3	Bromelin 50 FU	425 nm	0,68
4	Bromelin 500 FU	409 nm	0,63
5	PBS	420 nm	0,02

4.2 Uji Aktivitas Fibrinolitik

4.2.1 Uji Degradasi Gumpalan *Euglobulin*

Uji degradasi gumpalan *euglobulin* dimulai dengan menginkubasi ketiga sampel selama 1 jam pada suhu 37 °C. Sampel yang digunakan adalah PBS sebagai kontrol negatif, bromelin 50 GDU, dan nattokinase 50 FU. Sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* dengan gumpalan *euglobulin* yang telah terbentuk. Penambahan asam asetat pada plasma darah merupakan awal dari

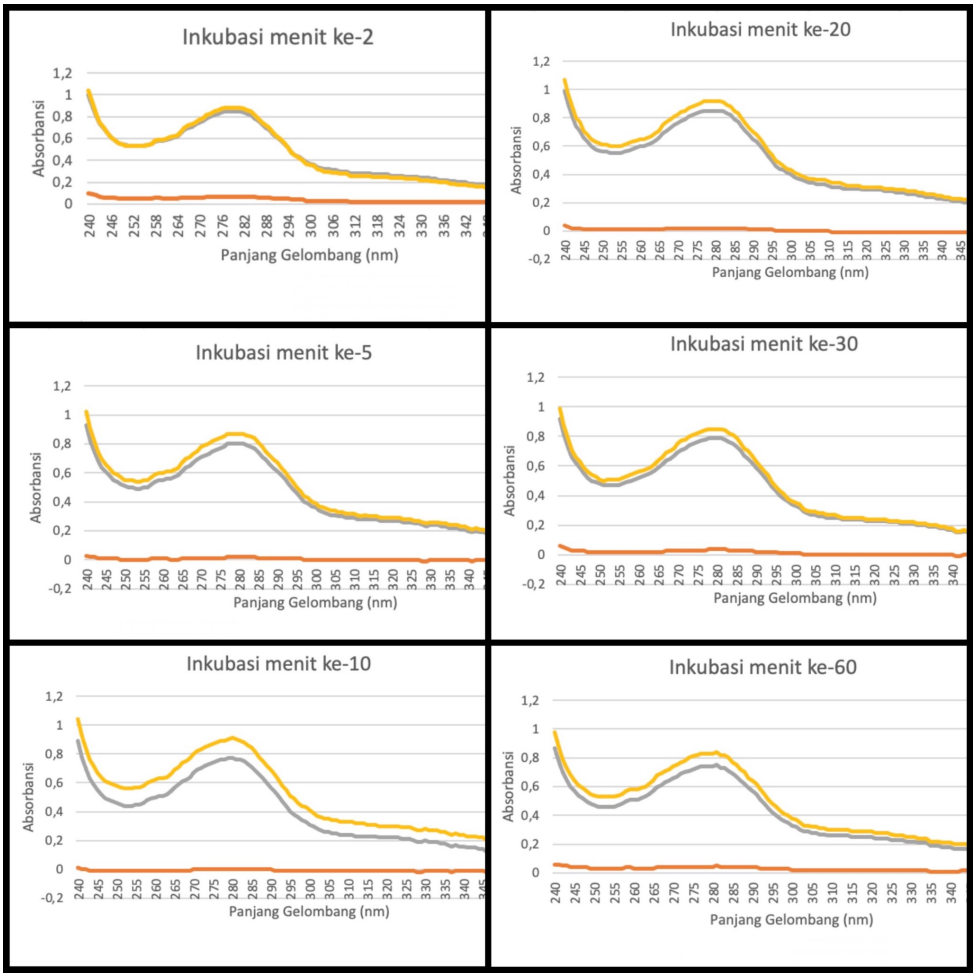
terbentuknya gumpalan *euglobulin*. Selama beberapa dekade terakhir, uji degradasi gumpalan *euglobulin* telah banyak digunakan sebagai tes *screening* secara global karena pelaksanaannya yang sederhana dan mudah (Davidson & Walker, 1987). Hasil uji degradasi gumpalan *euglobulin* dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil uji degradasi gumpalan *euglobulin*
Keterangan: 1: PBS sebagai kontrol negatif; 2: bromelin 50 GDU; 3: nattokinase 50 FU. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama A: 0 jam; B: 1 jam.

Berdasarkan hasil Gambar 4.4, dapat dilihat secara kualitatif bahwa terjadi degradasi gumpalan *euglobulin* pada tabung 2 dan 3 pada gambar B. Tabung 2 merupakan bromelin 50 GDU mampu mendegradasi gumpalan *euglobulin* sampai larut dibandingkan dengan tabung tiga nattokinase 50 FU. Melalui observasi visual, dapat diketahui bahwa enzim bromelin dan nattokinase memiliki kemampuan untuk mendegradasi gumpalan *euglobulin* yang ditandai dengan berkurangnya ukuran gumpalan *euglobulin* yang berwarna putih di dasar tabung. Untuk menganalisis

kemampuan sampel dalam mendegradasi gumpalan *euglobulin* secara lebih jauh, dilakukan analisis degradasi gumpalan *euglobulin* dengan menggunakan spektrofotometer, dengan pilihan *wavelength scan* pada gelombang 240-360 nm yang dilakukan pada setiap sampel. Hasil pengukuran pada inkubasi menit ke-2, 5, 10, 20, 30, dan 60 dapat dilihat pada Gambar 4.



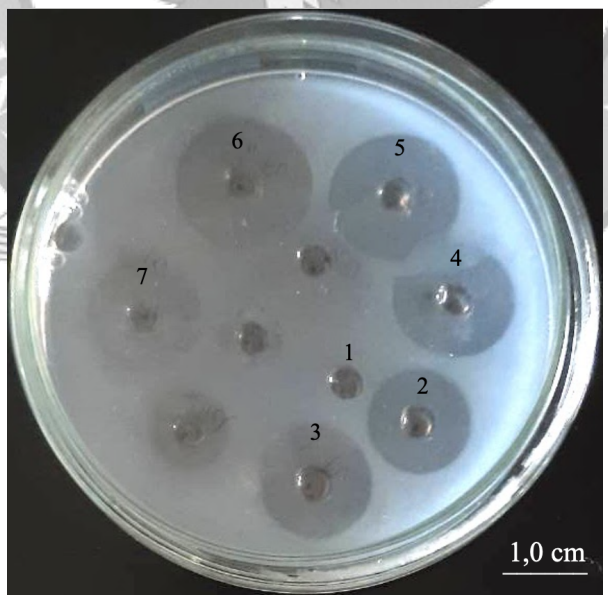
Gambar 4.5 Hasil degradasi gumpalan *euglobulin*
Keterangan: (---) PBS sebagai kontrol negatif; (---) bromelin 50 GDU; dan (---) nattokinase 50 FU.

Berdasarkan hasil yang spektrofotometer pada Gambar 4.5, adanya peningkatan absorbansi pada setiap sampel pada menit ke-2, 5, 10, 20, 30, 60. Hal ini menunjukkan bahwa bromelin dan nattokinase memiliki aktivitas degradasi

gumpalan *euglobulin*. Selain itu, protein pada setiap sampel juga meningkat. Dapat dilihat pada setiap menit inkubasi, bromelin memiliki aktivitas lebih tinggi daripada bromelin. *Peak* absorbansi pada panjang gelombang 280 nm merupakan asam amino aromatik (Anthis & Clore, 2013).

4.2.2 *Fibrin Plate Assay*

Fibrin plate assay merupakan metode yang dapat mengetahui kemampuan sampel bromelin dan sampel lainnya dalam mendegradasi fibrin secara langsung. Metode *fibrin plate* dapat mengukur aktivitas aktivator plasminogen pada darah (Brakman *et al*., 1966). Pengujian *fibrin plate assay* dilakukan menggunakan metode *well diffusion* dimana sampel-sampel diletakkan di dalam lubang pada *fibrin plate agar*. Terbentuknya zona bening menunjukkan adanya aktivitas fibrinolitik pada sampel. *Well* yang telah dibuat kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 8 jam. Hasil dari *fibrin plate assay* dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Hasil *fibrin plate assay*
Keterangan: 1: PBS sebagai kontrol negatif; *nattokinase* sebagai kontrol positif dengan aktivitas 2: 2 FU; 3: 5 FU; 4: 10 FU; 5: 25 FU; 6: 50 FU *nattokinase* sebagai kontrol positif; 7: bromelin 5 GDU.

Berdasarkan Gambar 4.6, dapat dilihat bahwa terlihat adanya zona bening pada sampel bromelin 5 GDU kemudian diikuti dengan kontrol positif nattokinase 2 FU, 5 FU, 10 FU, 25 FU, 50 FU. Terbentuknya zona bening pada sampel-sampel tersebut menandakan bahwa bromelin 50 GDU dan kontrol positif nattokinase 2 FU, 5 FU, 10 FU, 25 FU, 50 FU berhasil mendegradasi fibrin secara langsung. Dari hasil *fibrin plate assay* yang telah dilakukan, semua sampel memiliki aktivitas fibrinolitik yang berbeda. Tabel 4.4 merupakan tabel hasil perhitungan diameter zona bening dari setiap sampel.

Tabel 4.4 Diameter zona bening pada *fibrin plate assay*

No	Sampel	Diameter Zona Bening (cm)
1	Bromelin 5 GDU	0,7
2	Nattokinase (+) 2 FU	0,7
3	Nattokinase (+) 5 FU	0,8
4	Nattokinase (+) 10 FU	1
5	Nattokinase (+) 25 FU	1,1
6	Nattokinase (+) 50 FU	1,2

Keterangan: Diameter zona bening sudah dikurangi dengan diameter *well* yang terbentuk yaitu 0,7 cm.

Berdasarkan Tabel 4.4, didapatkannya hasil dari perhitungan diameter zona bening yang dihasilkan oleh bromelin 5 GDU, nattokinase 2 FU, 5 FU, 10 FU, 25 FU, 50 FU. Perhitungan dalam Tabel 4.3 menunjukkan bahwa nattokinase 50 FU memiliki aktivitas degradasi fibrin paling tinggi dibandingkan sampel yang lainnya. Kemudian diikuti dengan nattokinase 25 FU, 10 FU, 5 FU, 2 FU, dan bromelin 5 GDU. Hal ini terjadi seperti demikian karena semakin tinggi konsentrasi pada sampel maka akan semakin tinggi aktivitas degradasi fibrin yang dihasilkan.