

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi Dan Sampel**

#### **1. Populasi**

Populasi merupakan sejumlah obyek yang terkumpul di suatu tempat yang nantinya akan menjadi sasaran penelitian. Populasi yang dipakai pada penelitian ini adalah buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang diperoleh dari Mojolaban, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

#### **2. Sampel**

Sampel merupakan bagian kecil yang berasal dari populasi yang terletak di suatu tempat tertentu yang nantinya akan dipakai dalam melakukan penelitian. Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) yang bebas dari penyakit, masih muda, dan segar.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak enzim buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) sebagai agen fibrinolitik secara *in vitro*.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas fibrinolitik dari ekstrak enzim buah asam jawa (*Tamarindus indica* L.) dengan menggunakan media *clot lysis* dan variasi konsentrasi antara lain: 20%, 40%, dan 80%.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang diidentifikasi dapat dibedakan menjadi berbagai macam yaitu variabel pengaruh, variabel kendali dan variabel terpengaruh. Pengertian variabel pengaruh merupakan variabel yang memengaruhi variabel terpengaruh yang nantinya diteliti. Pengertian variabel terpengaruh yaitu suatu hal yang menyangkut permasalahan yang nantinya akan memengaruhi suatu penelitian selain dari variabel pengaruh.

Variabel pengaruh dalam penelitian ini yaitu ekstrak enzim buah asam jawa dengan bervariasi konsentrasi antara lain: 20%, 40%, dan 80%.

Variabel kendali yaitu variabel yang memengaruhi variabel pengaruh, maka harus dibuat suatu kualifikasinya agar hasil yang didapatkan tidak tersebar, dan oleh peneliti bisa mengulanginya lagi secara tepat. Variabel kendali yang terdapat dalam penelitian ini yaitu ekstrak enzim buah asam jawa, kesehatan peneliti, kondisi dan keadaan laboratorium, serta metode yang digunakan dalam penelitian.

Variabel terpengaruh yaitu gagasan pokok dari persoalan yang dipilih dalam penelitian. Pada penelitian ini variabel terpengaruhnya yaitu potensi fibrinolitik ekstrak enzim buah asam jawa dengan menggunakan *clot lysis*.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, adalah mencari literatur dan mengidentifikasi tanaman yang mempunyai suatu gen penyandi fibrinolitik. Identifikasi menggunakan NCBI dan pencarian literatur jurnal tanaman asam jawa.

Kedua, adalah buah asam jawa diambil secara acak di satu pohon harus bebas penyakit, masih muda, dan segar. Buah asam jawa didapatkan di daerah Mojolaban, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

Ketiga, adalah ekstraksi enzim buah asam jawa dengan cara dihancurkan dengan diblender dan dihomogenkan dengan buffer fosfat pH 7 kemudian diblender kembali. Setelah didapatkan filtrat yang selanjutnya dilakukan sentrifugasi dan diperoleh supernatan enzim.

Keempat, adalah pemurnian enzim dilakukan dengan penambahan garam ammonium sulfat.

Kelima, adalah pengukuran dengan metode Lowry dan menggunakan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan kurva standar. Pengukuran menggunakan spektrofotometri untuk menentukan kadar protein dari absorbansi.

Keenam, adalah fibrinolitik adalah agen yang termasuk kelompok protease serin akan menghancurkan atau mendegradasi bekuan darah atau fibrin.

Ketujuh, adalah uji aktivitas fibrinolitik yang pengujiannya dilakukan dengan menggunakan metode *clot lysis* yang dilakukan dengan cara menghitung persentase (%) lisis bekuan darah.

## **C. Alat Dan Bahan**

### **1. Alat**

Alat yang digunakan untuk penelitian ini antara lain: beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, tabung eppendorf, erlenmeyer, labu

ukur, botol bening, botol berwarna gelap (coklat atau hitam), pipet volume, mikropipet, pipet tetes, penggaris, batang pengaduk, *magnetic stirrer*, autoklaf, alat timbang, inkubator, sentrifugator, blender, kain flanel, serbet, alat penangas air, spatula, thermometer, pH meter, dan spektrofotometri.

## 2. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini antara lain: buah dari asam jawa yang diambil adalah bebas dari penyakit, masih muda, dan segar, darah atau plasma darah kelinci, aquadest, aquadest steril, buffer fosfat 0,05M ( $\text{NaHPO}_4$  dan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), air bersih, *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai larutan stok/induk dan larutan standar, nattokinase sebagai kontrol positif, amonium sulfat, reagen Lowry yang berupa *Folin-Ciocalteu*, natrium karbonat, natrium hidroksida 0,1 N, tembaga (II) sulfat, dan natrium kalium tartarat.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi gen penyandi dengan NCBI dan referensi Jurnal

Pertama-tama untuk melakukan identifikasi, dengan mengunjungi situs NCBI selanjutnya klik pada *All Databases*, kemudian pilih *Nuclotide*. Langkah selanjutnya memasukkan kata kunci tanaman yang dicari (*Tamarindus indica* L.) yang berikutnya pilih FASTA dan *copy paste* ke kolom Nucleotide BLAST. Tahapan ini dilakukan bertujuan sebagai tahap awal pemastian apakah pada tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* L.) mempunyai aktivitas fibrinolitik serta apakah terdapat gen penyandi protease serin pada tanaman ini.

### 2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman buah asam jawa dirancang dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran sampel buah asam jawa yang berdasarkan karakteristik secara makroskopik dan juga mikroskopik. Selanjutnya, menghindari terjadinya kekeliruan dalam mengumpulkan sampel buah asam jawa serta membandingkan karakteristik secara morfologi tanaman asam jawa terhadap literatur di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) yang terletak di Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

### 3. Pengumpulan bahan

Buah asam jawa didapat dari Mojolaban, Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah. Buah asam jawa dikumpulkan secara acak dari beberapa pohon, dalam kondisi yang segar dan harus bebas dari penyakit.

#### **4. Ekstraksi enzim pada buah asam jawa**

Ekstraksi enzim pada buah asam jawa bertujuan untuk proses pengeluaran enzim yang terdapat pada sel-sel jaringan buah asam jawa dan memperoleh supernatan dari hasil sentrifugasi. Buah asam jawa ditimbang jumlahnya sebanyak 200 gram kemudian dihancurkan dan dicincang sedikit untuk memudahkan pemblenderan. Kemudian diblender sampai benar-benar halus dan tidak ada bongkahan kecil dari buah asam jawa. Selanjutnya buah asam jawa dilakukan penambahan dengan suspensi larutan buffer fosfat 0,05 M di pH 7 (1:2), kemudian campuran yang diperoleh diaduk hingga homogen. Campuran tersebut dipisahkan dari endapannya dengan menggunakan kertas saring, lalu filtrat yang diperoleh didinginkan selama 3 jam pada suhu kurang lebih 4°C. Filtrat yang didapatkan disentrifugasi di kecepatan 5.000 rpm selama kurang lebih 30 menit pada suhu 4°C. Hasil yang diperoleh dari sentrifugasi adalah endapan dan supernatan. Supernatan adalah ekstrak kasar dari enzim (EL-Hefnawy *et al.*, 2014).

#### **5. Pemurnian ekstrak enzim buah asam jawa**

Amonium sulfat ditambahkan dengan sedikit demi sedikit secara bertahap dan secara perlahan diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C. *Magnetic stirrer* atau pengaduk magnetik yang digunakan untuk proses pelarutan akan meningkatkan suhu dan menyebabkan denaturasi dan perubahan pada kelarutan. Suhu 4°C dipilih karena tidak merusak enzim, produk atau enzim dari bahan pangan dianjurkan untuk disimpan pada suhu di bawah 10°C yaitu 4°C. Pada suhu tersebut reaksi biokimia dan perubahan yang diakibatkan oleh pertumbuhan mikroba menjadi lambat. Hal ini akan menyebabkan daya simpan lebih panjang (Putri, 2016).

Campuran dari supernatan di sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit agar endapan enzim terpisah (Yuningsih, 2006 & Rachmadani, 2007). Lalu endapan yang didapat ditimbang, endapan tersebut adalah sebagai pelet pemurnian enzim. Kemudian endapan tersebut yang telah dilarutkan didialisis dengan larutan buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 (Purwanto, 2016). Pemurnian tadi dilakukan pada endapan atau ekstrak kasar enzim (*crude enzim*) buah asam jawa dengan amonium sulfat pada tingkat kejenuhan sebesar 80% (Afifah *et al.*, 2014).

#### **6. Pengukuran kadar protein ekstrak enzim dengan metode Lowry**

Pengukuran menggunakan metode Lowry, bertujuan untuk mengukur dan mengetahui jumlah protein dari enzim hasil purifikasi

(Lowry *et al.*, 1951). Pembuatan pereaksi A dibuat dengan penimbangan 2 gram Natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) dalam 100 ml NaOH 0,1N. Pereaksi B dibuat dengan 5 ml larutan Tembaga (II) sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) 1% dan ditambahkan 5 ml larutan natrium kalium tartarat 1%. Pereaksi C adalah campuran yang terdiri dari 50 ml pereaksi A dan ditambahkan 1 ml pereaksi B. Pereaksi D dibuat dengan pengenceran Folin Ciocalteu 5 ml dalam 5 ml aquadest steril dengan perbandingan (1:1). Pembuatan larutan stok atau induk dari serbuk *Bovine Serum Albumin* atau BSA ditimbang beratnya sebanyak 50 mg dimasukkan kedalam labu ukur dan ditambahkan aquadest steril 50 ml (1000 ppm atau 1 mg/ml). Larutan tadi, lalu digunakan untuk pengenceran dengan seri konsentrasi (0, 40, 80, 120, 160, 200 ppm) untuk memperoleh larutan standar. BSA digunakan sebagai larutan kurva standar untuk mencari persamaan regresi yang selanjutnya digunakan untuk menentukan kadar protein dari absorbansi yang diukur dengan alat spektrofotometri (Purwanto, 2014).

Pengukuran dan penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$ -maks) yang bertujuan untuk mengetahui dan memperoleh absorbansi maksimum sampel uji sehingga didapatkan nilai absorbansi yang akurat. Dilakukan dengan pengambilan larutan standar 1,5 ml ke dalam labu ukur 10 ml ditambah aquadest steril sampai tanda batas. Larutan tersebut dipipet lagi 1 ml lalu ditambah 5 ml pereaksi C dan 0,5 ml pereaksi D digojog sampai homogen. Pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang di 400 - 800 nm (Purwanto, 2014). Komposisi larutan blanko adalah sama, maka ekstrak enzim buah asam jawa diganti dengan aquadest steril dan perlakuannya sama seperti sampel (Lowry *et al.*, 1951; Widiastuti dan Aini, 2008).

Penentuan *Operating Time* (OT) tujuannya adalah saat mengukur senyawa tertentu, diketahui waktu senyawa tersebut mulai stabil yang diperoleh saat absorbansi. Pengambilan larutan stok atau induk 1,5 ml ke dalam labu ukur 10 ml ditambah aquadest steril sampai tanda batas. Larutan tersebut dipipet lagi 1 ml kemudian ditambah 5 ml pereaksi C dan 0,5 ml pereaksi D digojog sampai homogen. Larutan tersebut dibaca absorbansinya pada menit 0-45 menit dengan panjang gelombang yang sudah ditentukan (Lowry *et al.*, 1951 dalam penelitian Widiastuti dan Aini, 2008).

Pembuatan kurva baku *Bovine Serum Albumin* (BSA) tujuannya untuk mencari persamaan regresi linier dan menghitung kadar protein dari absorbansi. Larutan blanko yang dipakai adalah aquadest steril dan larutan standar yang telah dibuat dengan seri konsentrasi (0, 40, 80, 120, 160, 200 ppm) dibuat dalam labu ukur 50 ml. Masing-masing larutan tadi kemudian dipipet 1 ml yang selanjutnya ditambahkan 5 ml pereaksi C dan 0,5 ml pereaksi D digojog sampai homogen. Pembacaan absorbansi pada menit ke-30 dengan panjang gelombang yang telah ditentukan dan didapatkan (Lowry *et al.*, 1951).

Pengukuran kadar protein pada sampel hasil ekstrak enzim pada buah asam jawa, diukur sebanyak 50 µl kemudian diencerkan 100 kali. Hasil dari pengenceran tadi ditambah sebanyak 5 mL pereaksi C dan ditambah sebanyak 0,5 mL pereaksi D. Campuran tersebut dihomogenkan dengan cara digojog serta dibiarkan selama kurang lebih setengah jam, kemudian dilakukan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum (Wijayanti, 2021).

#### **7. Uji aktivitas fibrinolitik dengan metode *clot lysis***

Pembuatan sampel uji ekstrak enzim buah asam jawa dengan kelompok perlakuan bervariasi konsentrasi yaitu 20%, 40%, dan 80%. Eppendorf berukuran atau bervolume 1,5 ml dikalibrasi pada 1 ml kemudian konsentrasi 20% dibuat dengan cara mengambil 0,2 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambahkan aquadest steril *ad* 1 ml. Konsentrasi 40% dibuat dengan cara mengambil 0,4 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambahkan aquadest steril *ad* 1 ml. Konsentrasi 80% dibuat dengan cara mengambil 0,8 ml ekstrak enzim dimasukkan ke dalam eppendorf dan ditambahkan aquadest steril *ad* 1 ml. Sampel uji dibuat untuk kelompok perlakuan baik supernatan atau ekstrak kasar enzim (sebelum pemurnian) dan pelet (sesudah pemurnian).

Pengujian pada kelompok perlakuan konsentrasi 20%, 40%, dan 80% masing-masing dilakukan dengan replikasi 3 kali. Kelompok perlakuan kontrol negatif dan positif direplikasi sebanyak 3 kali juga. Pembuatan kontrol negatif adalah dengan menggunakan aquadest steril. Pembuatan kontrol positif yaitu dengan nattokinase (setara dengan 2.000 FU nattokinase dengan merk Doctor's BEST®) kapsul 100 mg, dibuat dengan cara membuka cangkang kapsul dan ditimbang seberat 100 mg. Nattokinase tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml

ditambahkan aquadest steril sampai tanda batas dan dihomogenkan (Zaman *et al.*, 2015).

Pengujian dengan menggunakan metode *clot lysis* untuk melisiskan bekuan darah secara *in vitro*. Uji ini dilakukan dengan 3 kali replikasi untuk setiap masing-masing perlakuan. Hal pertama adalah dengan menyiapkan, dan menimbang 24 tabung eppendorf kosong yang sudah disterilisasi, kemudian diisi dengan darah dari kelinci sebanyak 200  $\mu$ l. Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada inkubator dengan suhu kurang lebih 37°C dan ditunggu selama 60 menit sampai darah menggumpal. Sesudah terbentuk bekuan atau gumpalan pada bagian yang cair harus dipindahkan dengan cepat dan cekatan. Untuk memastikan bobot masing-masing dari eppendorf yang sudah terisi oleh darah yang menggumpal, caranya adalah bobot dari bekuan atau gumpalan darah = (bobot eppendorf isi – bobot eppendorf kosong).

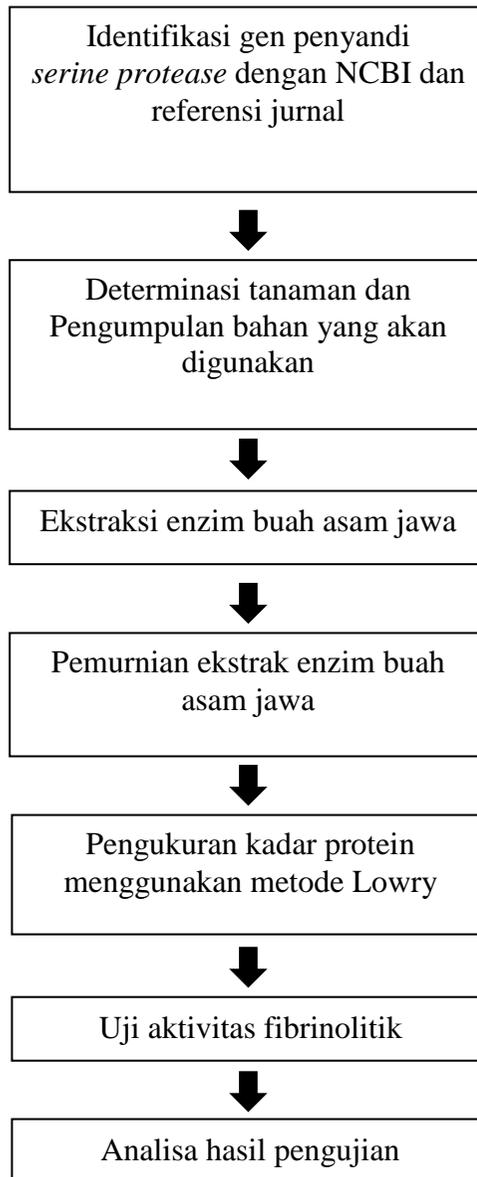
Sampel ekstrak kasar enzim (supernatan sebelum pemurnian) ditambahkan ke dalam 9 tabung eppendorf dengan variasi konsentrasi yaitu 20%, 40%, dan 80% masing-masing sebanyak 100  $\mu$ l. Sampel dari ekstrak enzim yang sudah dimurnikan (pelet sesudah pemurnian) ditambahkan ke dalam tabung 9 eppendorf dengan konsentrasi 20%, 40%, dan 80% masing-masing sebanyak 100  $\mu$ l pula. Kontrol negatif ditambahkan dengan aquadest steril ke 3 tabung eppendorf masing-masing 100  $\mu$ l, kemudian kontrol positif ditambahkan dengan nattokinase ke 3 tabung eppendorf masing-masing 100  $\mu$ l juga. Total 24 tabung eppendorf, semua tabung eppendorf berikutnya diinkubasi pada inkubator pada suhu kurang lebih 37°C selama 90 menit dan diamati proses dari meleburnya bekuan atau gumpalan darah kelinci (Rahaduz *et al.*, 2015).

Gumpalan atau bekuan darah yang lisis kemudian diambil dan dipisahkan yang selanjutnya ditimbang kembali. Penimbangan kembali dilakukan dengan bertujuan untuk mengetahui dan menghitung perbedaan bobot sebelum dan sesudah terjadinya lisis atau peleburan dari bekuan darah kelinci. Hasil perbedaan yang didapat pada saat sebelum dan sesudah lisisnya bekuan darah kelinci dapat dinyatakan menjadi persentase lisis bekuan darah. Dimana persentase (%) lisis bekuan darah = (bobot lisis bekuan darah / bobot lisis bekuan darah sebelum lisis) x 100 (Drjayaraj, 2014).

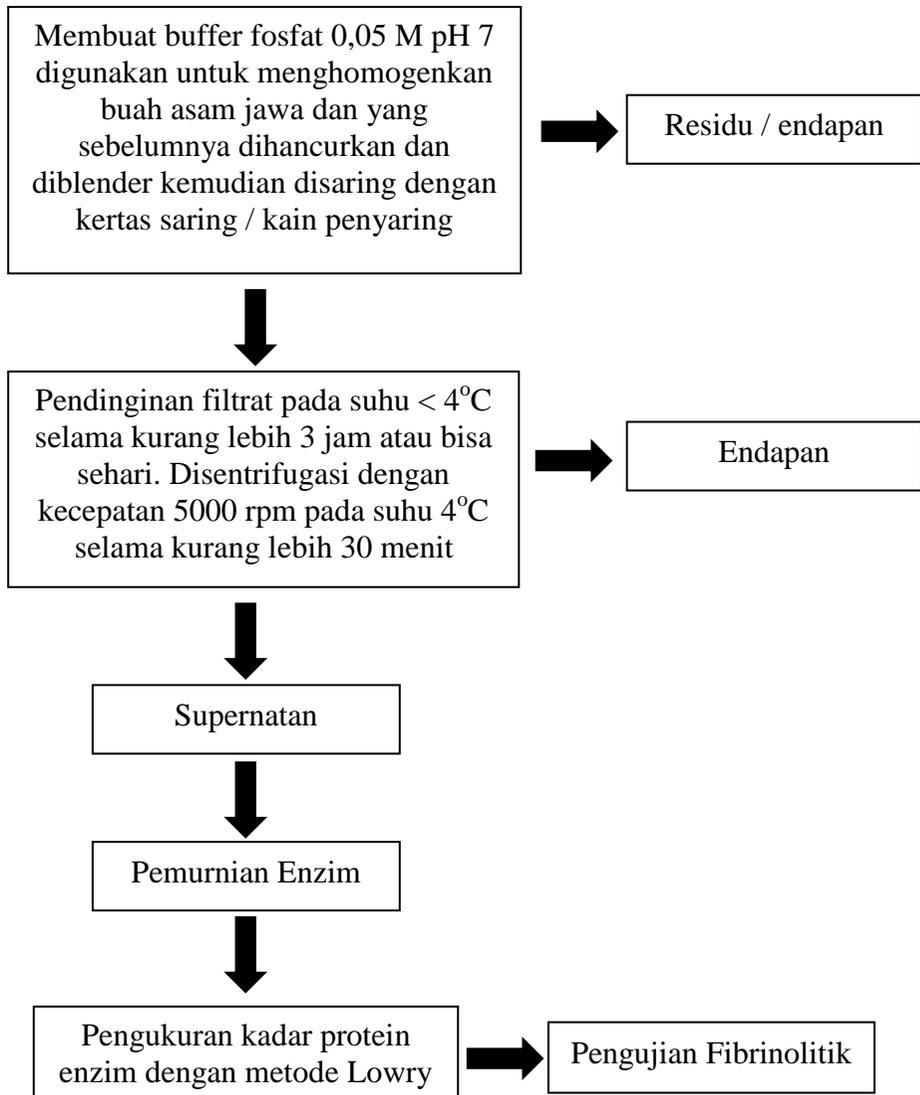
### **E. Analisis Hasil**

Data hasil aktivitas enzim buah asam jawa yang telah ditemukan dengan melihat kemampuan dari aktivitas enzim buah asam jawa dalam melisiskan bekuan darah, kemudian dinyatakan sebagai presentase lisis bekuan darah. Presentase (%) lisis bekuan darah dihitung menggunakan rumus =  $(\text{berat lisis bekuan darah} / \text{berat bekuan darah sebelum lisis}) \times 100$ . Hasil data yang didapat dianalisis dengan SPSS, kemudian dianalisis dengan *Shapiro-Wilk*. Data selanjutnya diuji dengan uji homogenitas, *One Way Anova*, dan *Post Hoc-Tuckey*.

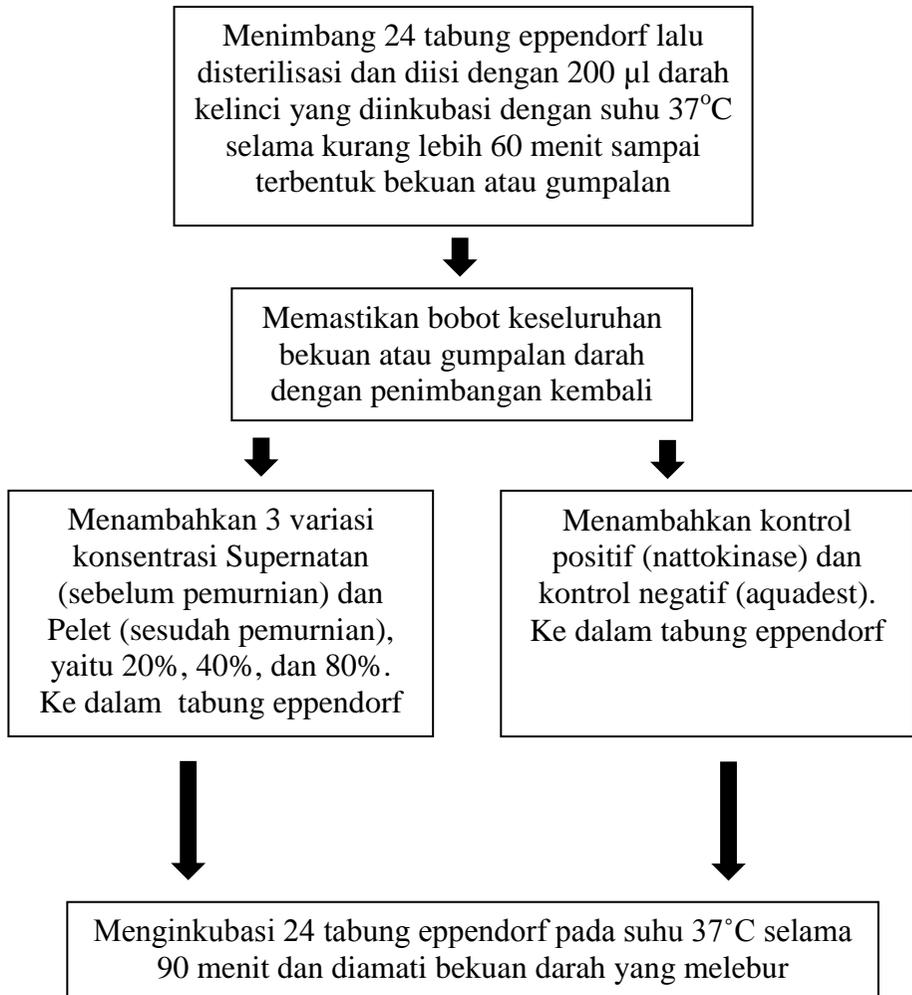
### E. Skema Alur Penelitian



Gambar 2. Skema alur uji aktivitas fibrinolitik ekstrak enzim buah asam jawa



**Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak enzim buah asam jawa**



Gambar 4. Skema alur pengujian fibrinolitik dengan metode *clot lysis*