

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini mengacu pada keseluruhan objek yang menjadi fokus kajian. Populasi yang diteliti adalah agen fibrinolitik yang diperoleh dari ekstrak enzim tempe gembus, yang bersumber dari Pasar Gemolong, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari keseluruhan populasi yang dipilih sebagai objek penelitian, dengan harapan memiliki sifat dan karakteristik yang mencerminkan populasi secara menyeluruh. Dalam studi ini, sampel yang dipakai berupa tempe gembus yang diambil secara acak dengan syarat telah difermentasi selama 48 jam pada rentang suhu 25–35 °C dan tingkat kelembapan 60–80%. Sampel tersebut berupa padatan yang padat dan kompak, sudah ditumbuhi jamur berwarna putih, memiliki aroma khas tempe gembus, serta tidak menunjukkan gejala pembusukan.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama merupakan semua faktor yang secara langsung menggambarkan objek penelitian. Variabel ini meliputi variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol. Pada penelitian ini, variabel utama yang digunakan adalah ekstrak enzim dari tempe gembus sebagai agen fibrinolitik yang diuji menggunakan metode *clot lysis* secara *in vitro*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Setelah variabel utama ditentukan, variabel tersebut kemudian dapat diklasifikasikan menjadi beberapa jenis, yaitu variabel tergantung, variabel bebas, dan variabel kendali.

2.1 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah variabel yang hasilnya dipengaruhi variabel bebas. Penelitian ini, variabel tergantung adalah potensi ekstrak enzim tempe gembus sebagai agen fibrinolitik yang diukur dengan metode *clot lysis in vitro* (pengujian pemecahan bekuan darah).

2.2 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah berfluktuasi untuk menentukan variabel pengaruhnya. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak enzim fibrinolitik tempe gembus dengan berbagai konsentrasi 15; 25, 50 dan 100% sebelum dan setelah pemurnian.

2.3 Variabel kendali. Variabel kendali adalah variabel yang tidak diubah atau dimanipulasi dalam penelitian, tetapi perlu dijaga agar tetap konstan atau stabil. Hal ini untuk memastikan bahwa perubahan pada variabel tergantung hanya disebabkan oleh variabel bebas, bukan faktor lain yang tidak diinginkan. Variabel kendali bisa mencakup kondisi laboratorium (misalnya suhu dan kelembapan) dan metode yang digunakan dalam penelitian (misalnya prosedur pengujian yang konsisten).

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, ekstrak enzim dari tempe gembus adalah hasil ekstrak yang mengandung enzim yang diperoleh dari proses ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini untuk menguji aktivitas fibrinolitik. Enzim merupakan protein yang bertindak sebagai katalis dalam berbagai reaksi biokimia. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut tertentu untuk memperoleh larutan yang mengandung enzim aktif. Enzim yang diekstraksi dapat meliputi protease atau fibrinolysin yang memiliki kemampuan untuk memecah fibrin dalam gumpalan darah. Aktivitas enzim ini diukur dengan cara mengamati proses penghancuran gumpalan fibrin menggunakan metode *clot lysis* secara *in vitro*.

Kedua, agen fibrinolitik adalah kemampuan ekstrak enzim dari tempe gembus untuk memecah fibrin dalam gumpalan darah. Penelitian ini, aktivitas fibrinolitik diukur dengan menggunakan uji *clot lysis*. Kemampuan ekstrak enzim untuk melarutkan atau menghancurkan gumpalan fibrin. Proses ini diukur dengan memantau waktu yang diperlukan untuk melarutkan gumpalan fibrin atau persentase pengurangan massa gumpalan setelah diberi perlakuan ekstrak enzim tempe gembus.

Ketiga, metode *clot lysis* adalah metode untuk mengukur kemampuan ekstrak enzim dalam menghancurkan atau melarutkan gumpalan fibrin yang terbentuk dalam media darah atau plasma. Pada uji ini, gumpalan fibrin dibuat dan kemudian dipaparkan dengan ekstrak enzim tempe gembus dalam kondisi yang dikontrol secara *in vitro*. Keberhasilan penghancuran gumpalan fibrin diukur berdasarkan perubahan visual (seperti kelarutan gumpalan) atau dengan mengukur massa atau volume gumpalan darah yang tersisa setelah pemaparan dengan ekstrak enzim.

Keempat, hemolisis atau lisis darah merupakan proses rusaknya membran sel darah merah yang menyebabkan hemoglobin keluar ke dalam media sekitarnya, seperti plasma atau serum. Lisis darah dapat terjadi secara alami, misalnya akibat infeksi virus, atau secara buatan untuk keperluan penelitian. Darah yang tidak mengalami lisis adalah darah yang sel-selnya tetap utuh dan tidak rusak. Kondisi darah yang tidak lisis dapat dikenali secara visual dengan adanya warna jernih pada serum atau plasma.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, pipet volume, gelas ukur, incubator, corong kaca, gelas beaker, mikropipet yang digunakan untuk pengambilan sampel dengan skala mikroliter, tabung reaksi, pipet tetes, alat sentrifugasi untuk memisahkan campuran padat dan cair, magnetic stirrer sebagai alat pengaduk, blender, kain flanel, spektrofotometer, pH meter, serta tabung Eppendorf.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi sampel dan bahan Analisa. Sampel yang digunakan adalah tempe gembus dari Gemolong, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Sementara itu, bahan analisa yang digunakan terdiri dari Buffer fosfat 0,05M, Bovine Serum Albumin (BSA) untuk larutan standar, garam ammonium sulfat, darah kelinci, aquadest sebagai kontrol negatif dan Nattokinase sebagai kontrol positif.

D. Tahapan Penelitian

1. Identifikasi Gen

Identifikasi gen dilakukan dengan menggunakan data base dari Gene Bank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan analisis BLAST dapat diakses melalui situs <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan cara memasukkan kata kunci terkait gen fibrinolitik pada kolom pencarian, kemudian memilih jenis database nukleotida untuk pencarian. Analisis BLAST didapatkan dari kumpulan data dalam bentuk FASTA, FASTA tersebut dapat digunakan untuk analisis penyelarasian ganda menggunakan ClustalW. Melalui situs

<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> dimana lima data dari FASTA dapat di analisis sekaligus.

2. Pengambilan Bahan

Tempe gembus yang digunakan diperoleh dari Pasar Gemolong, Kabupaten Sragen, Jawa Tengah. Tempe gembus yang dipilih memiliki kriteria telah difermentasi selama 48 jam pada suhu 25–35 °C dengan kelembaban 60–80%, berbentuk padatan kompak, berwarna putih, telah berjamur, memiliki aroma khas tempe gembus, dan tidak menunjukkan tanda-tanda kebusukan. Kriteria tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa tempe gembus yang dipilih mengandung enzim protease dan senyawa bioatif lain dalam jumlah yang optimal (Radiati, 2016). Dalam penelitian ini, sampel tempe gembus diperoleh melalui metode pengambilan acak untuk menguji aktivitas enzim fibrinolitiknya menggunakan metode *clot lysis* secara *in vitro*.

3. Pembuatan Buffer Fosfat

Pembuatan buffer fosfat dilakukan dengan cara menimbang NaH₂PO₄ sebanyak 1,4990 gram dan Na₂HPO₄ sebanyak 1,7972 gram kemudian masing-masing serbuk dilarutkan dalam 250 ml aquadest. Dilakukan pengukuran pH, untuk mendapatkan larutan buffer fosfat sebanyak 500 ml dengan pH 7 maka 250 ml larutan A ditambahkan larutan B hingga diperoleh pH 7. Jika pH telah mencapai 7, maka ditambahkan dengan menggunakan aquadest ad 1000 ml.

4. Ekstraksi Enzim

Ekstraksi dimaksudkan untuk mengeluarkan ekstrak enzim dari sel dan jaringan tempe gembus. Ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 1:2, dimana tempe gembus sebanyak 200 gram dipotong-potong hingga ukurannya menjadi kecil, kemudian ditambahkan larutan buffer fosfat sebanyak 500 mL sebagai pelarut, campuran dihaluskan dengan blender hingga tercampur merata. Campuran disaring dengan kain flanel untuk menghilangkan residu. Ekstrak enzim supernatan ini diperoleh setelah proses sentrifugasi dilakukan pada kecepatan 5.000 rpm dengan suhu 4°C selama 30 menit (Michail *et al.*, 2006).

5. Pemurnian Ekstrak Enzim

Pemurnian ekstrak enzim tempe gembus dilakukan menggunakan metode salting out dengan penambahan ammonium sulfat. Sebanyak 135,25 gram ammonium sulfat 80% ditambahkan ke dalam 250 ml volume ekstrak enzim. Penambahan ammonium sulfat dilakukan secara perlahan ke dalam ekstrak enzim tempe gembus sambil terus

diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 4°C hingga tercampur merata (Michail *et al.*, 2006). Selanjutnya, campuran enzim dan ammonium sulfat dipisahkan melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C.

Tingkat kemurnian enzim ditilai dengan mengukur perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Untuk menentukan kemurnian protein, 50 µL supernatan dari ekstrak enzim tempe gembus dicampur dengan 10 mL larutan buffer fosfat pH 7. Selanjutnya, campuran tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV, dengan buffer pH 7 sebagai blanko. Rasio absorbansi antara panjang gelombang 260 nm dan 280 nm kemudian dijadikan sebagai parameter untuk menilai kemurnian protein (Yowani and Wirajana, 2014).

6. Penetapan Kadar Protein

Penelitian ini menggunakan metode Lowry untuk mengukur kadar protein enzim hasil purifikasi (Lowry *et al.*, 1951).

6.1 Pembuatan larutan stok BSA (*Bovine Serum Albumine*).

Bovine Serum Albumine digunakan sebagai standar untuk membuat kurva kalibrasi yang nantinya digunakan untuk menentukan kadar protein berdasarkan nilai absorbansi saat pengukuran menggunakan spektrofotometer (Poernomo *et al.*, 2014). Larutan stok BSA dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara menimbang 50 mg serbuk BSA yang kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Selanjutnya, larutan stok tersebut diencerkan secara bertahap untuk menghasilkan seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Contohnya, untuk membuat 50 mL larutan dengan konsentrasi 20 ppm, diambil 1 mL larutan stok 1000 ppm dan diencerkan dengan aquadest hingga mencapai volume 50 mL.

6.2 Pembuatan reagen Lowry. Reagen Lowry A dibuat dengan 2 gram Na₂CO₃ dilarutkan dengan 100 ml 0,1N NaOH. Lowry B dibuat dari CuSO₄.5H₂O 1% 5 ml dan larutan Na (K)-Tartat 2% 5 ml. Reagen Lowry C berisi campuran larutan reagen Lowry A 50 ml dan 1 ml larutan reagen Lowry B. Reagen Lowry D dibuat dari reagen Folin ciocalteau dan aquadest dengan perbandingan 1:1.

6.3 Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks).

Pengukuran panjang gelombang maksimum untuk bovine serum albumin (BSA) dilakukan menggunakan metode Lowry. Sebanyak 1,5 mL larutan stok BSA dimasukkan ke dalam tabung reaksi berukuran 10 mL kemudian diencerkan menggunakan aquadest. Setelah itu, 1 mL

larutan hasil pengenceran diambil dan dicampur dengan 5 mL pereaksi Lowry C, lalu diaduk merata selama 10 menit. Selanjutnya, ditambahkan 0,5 mL pereaksi Lowry D, kemudian campuran dikocok dan dibiarkan pada suhu kamar selama 30 menit. Absorbansi dari kompleks yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan rentang panjang gelombang antara 500 hingga 750 nm, dengan pengukuran dilakukan setiap 20 nm.

6.4 Penentuan *operating time* (OT). Penentuan waktu operasi (*operating time*) bertujuan untuk mengetahui durasi pengukuran saat absorbansi senyawa mencapai kestabilan maksimal. Prosedur penentuan ini dimulai dengan memasukkan 1,5 mL larutan induk BSA ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambah dengan aquadest steril hingga mencapai tanda batas. Selanjutnya, sebanyak 1 mL larutan tersebut dipipet dan dicampur dengan 5 mL reagen Lowry C, kemudian diaduk hingga homogen. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry D. Pengukuran absorbansi dilakukan secara berkala mulai menit ke 0 hingga menit ke 60 pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya.

6.5 Kurva baku BSA. Pembuatan kurva baku BSA dilakukan dengan menyiapkan labu ukur 10 mL. Kemudian larutan stok dipipet sesuai dengan volume perhitungan seri pengenceran sebelumnya yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 mL, selanjutnya masing-masing larutan di dalam labu ukur ditambahkan dengan aquadest steril hingga tanda batas 10 mL. Kemudian satu labu ukur yang tersisa isi dengan 10 mL aquadest steril sebagai larutan blanko. Selanjutnya, dari setiap labu ukur, diambil 1 mL larutan kemudian ditambahkan 5 mL reagen Lowry C dan diaduk hingga merata. Setelah itu, ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry D. Absorbansi diukur pada menit ke-50 dengan menggunakan panjang gelombang maksimum yang telah ditetapkan sebelumnya. Kurva standar BSA dibuat dengan nilai absorbansi sebagai sumbu y dan konsentrasi protein sebagai sumbu x, kemudian konsentrasi protein pada setiap sampel dihitung berdasarkan kurva tersebut.

6.6 Pengukuran kadar protein sampel. Sebanyak 1 mL ekstrak enzim dicampurkan dengan 5 mL reagen Lowry C dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu kamar, kemudian secara cepat ditambahkan 0,5 mL reagen Lowry A dan diaduk hingga merata. Selanjutnya, campuran ini diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Wijayanti, 2021).

7. Uji Fibrinolitik

7.1 Penyiapan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah nattokinase yang dibuat dari 100 mg nattokinase dan dituangkan ke dalam labu takar 10 mL, serbuk dilarutkan menggunakan aquadest hingga tanda batas labu takar 10 mL.

7.2 Penyiapan kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah larutan baffer fosfat karena buffer fosfat tidak memiliki aktivitas sebagai fibrinolitik.

7.3 Penyiapan sampel uji. Ekstrak enzim tempe gembus sebelum pemurnian dan ekstrak enzim setelah pemurnian dibuat menjadi beberapa variasi konsentrasi yaitu 15; 25; 50 dan 100%. Larutan dengan volume 10 mL disiapkan menggunakan labu ukur dengan cara mengambil 1,5 mL ekstrak enzim kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai tanda batas untuk konsentrasi tertentu. Untuk konsentrasi 25%, diambil 2,5 mL ekstrak enzim dan ditambah aquadest sampai tanda batas. Konsentrasi 50% dibuat dengan mengambil 5 mL ekstrak enzim lalu diencerkan dengan aquadest hingga mencapai tanda batas. Konsentrasi 100% menggunakan ekstrak enzim murni tanpa pengenceran. Setiap pengujian dilakukan dalam tiga kali replikasi, sehingga setiap sampel diuji sebanyak tiga kali untuk perhitungan hasil (Nadea *et al.*, 2023).

7.4 Pengujian fibrinolitik dengan metode *clot lysis in vitro*. Uji *clot lysis in vitro* dilakukan dengan memasukkan 500 µl darah kelinci ke dalam 10 tabung Eppendorf steril yang sebelumnya telah ditimbang. Tabung-tabung tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit hingga terbentuk gumpalan darah. Setelah gumpalan terbentuk, serum darah dibuang, dan berat setiap bekuan darah yang tersisa di dalam tabung Eppendorf ditimbang kembali untuk memastikan beratnya.

Ekstrak enzim tempe gembus sebelum dimurnikan dengan konsentrasi 15; 25; 50 dan 100% yang diperoleh dimasukkan ke 4 tabung eppendorf dengan masing-masing tabung berisi 100 µl. Sampel ekstrak enzim yang telah dimurnikan dengan ammonium sulfat dengan konsentrasi 15; 25; 50 dan 100% yang dimasukkan ke dalam 4 tabung Eppendorf dengan volume masing-masing 100 µl per tabung. Dua tabung lainnya diisi sebagai kontrol, yaitu kontrol positif menggunakan nattokinase dan kontrol negatif menggunakan buffer fosfat. Seluruh sepuluh tabung Eppendorf tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 90 menit hingga cairan dan gumpalan darah terpisah, sehingga proses fusi gumpalan dapat diamati.

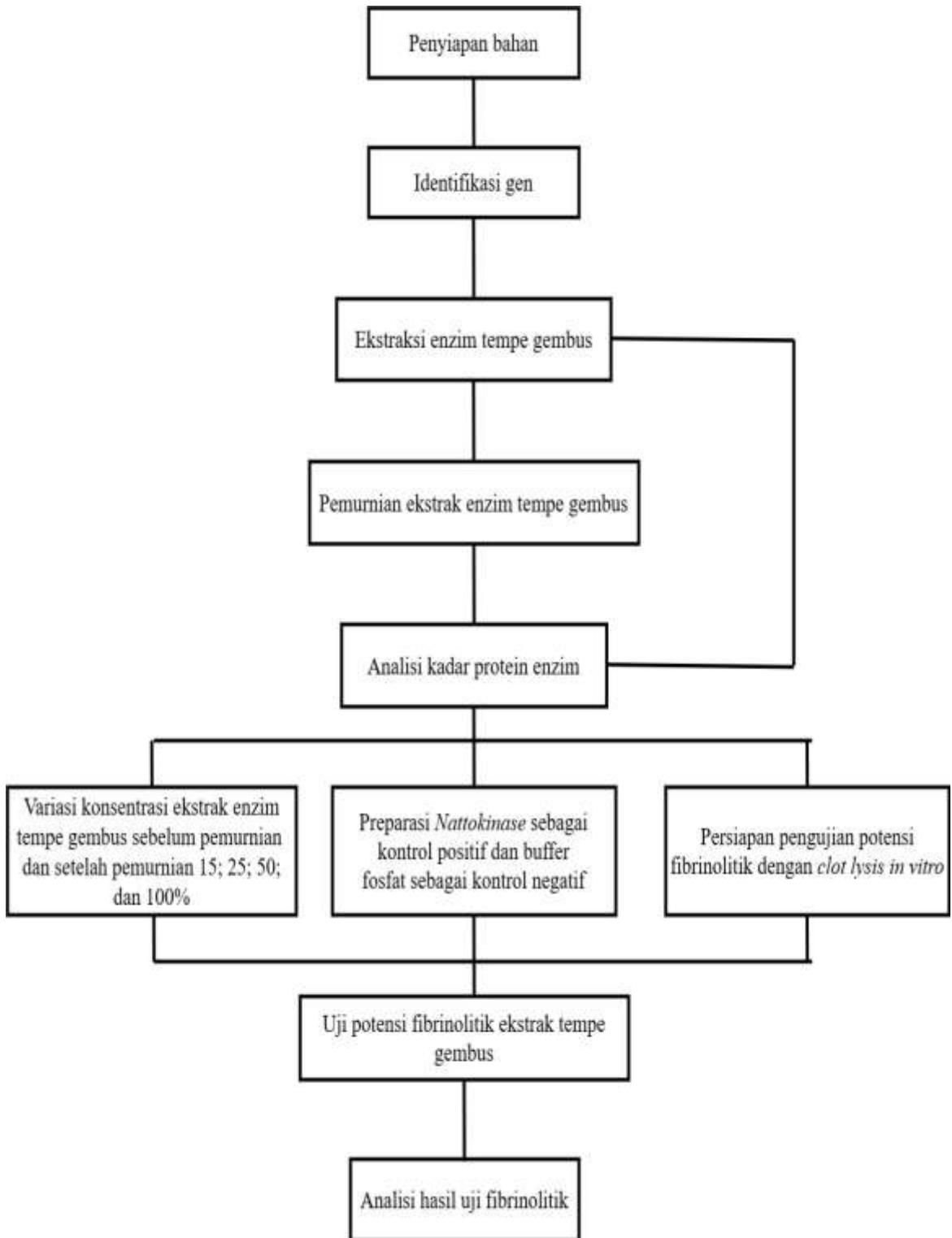
Pengambilan lisisan darah dilakukan dengan menggunakan mikropipet yang kemudian diletakan pada tabung eppendorf kosong. Tabung Eppendorf yang berisi hasil leburan gumpalan darah kemudian ditimbang kembali untuk mengukur perubahan berat setelah bekuan darah mengalami lisis. Selisih berat sebelum dan sesudah proses lisis tersebut dihitung dan dinyatakan dalam bentuk persentase lisis bekuan darah. Persentase lisis dapat dihitung dengan rumus berikut (Setyowati, 2015) :

$$\text{Presentase lisis (\%)} = \frac{\text{berat lisis bekuan darah}}{\text{berat bekuan darah sebelum lisis}} \times 100\%$$

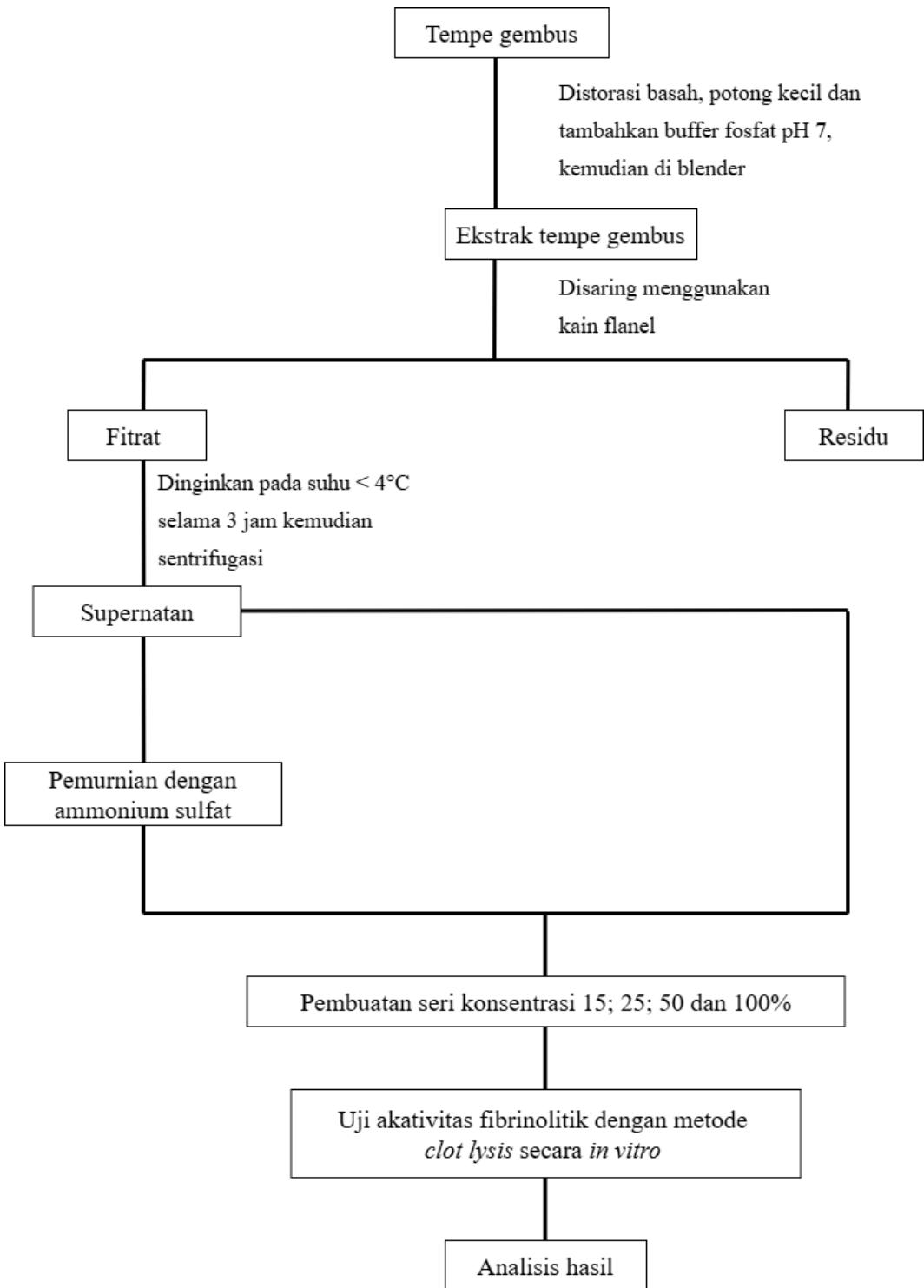
E. Analisis Data

Analisis data hasil penelitian dilakukan menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Data yang dianalisis yaitu persentase lisis dari ekstrak enzim sebelum pemurnian dan ekstrak enzim setelah pemurnian dengan membandingkan pada masing-masing konsentrasi, serta kontrol positif (nattokinase) dan kontrol negatif (buffer fosfat). Hasil data yang didapat dianalisis metode Shapiro-Wilk; apabila data menunjukkan distribusi normal, analisis dilanjutkan dengan menggunakan One Way ANOVA.

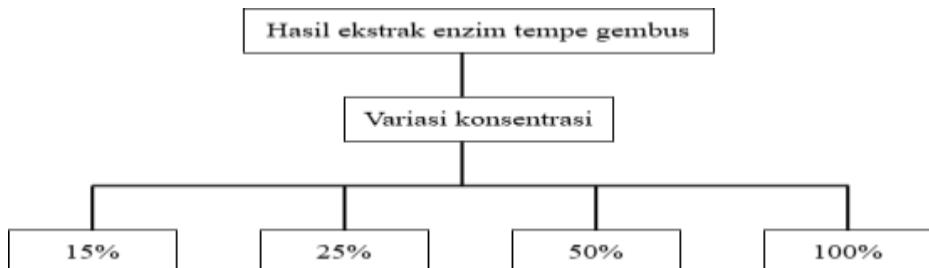
F. Skema Penelitian



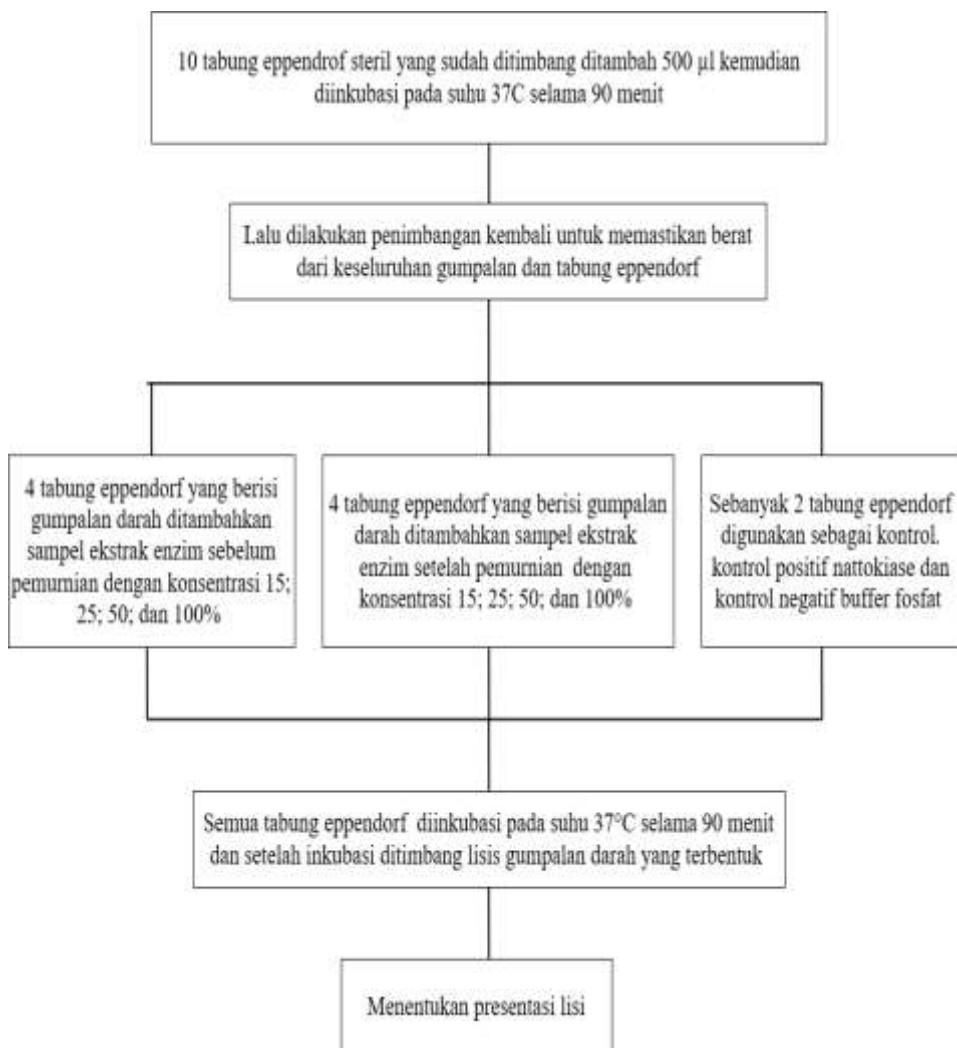
Gambar 4. Skema alur penelitian



Gambar 5. Skema pembuatan ekstrak enzim tempe gembus



Gambar 6. Skema pembuatan variasi konsentrasi sampel ekstrak enzim tempe gembus



Gambar 7. Skema uji potensi fibrinolitik ekstrak tempe gembus

G. Jadwal Penelitian

Tabel 3. Jadwal penelitian