

paper 1

by A S

Submission date: 14-Jan-2021 10:51PM (UTC-0800)

Submission ID: 1487933769

File name: ALKALOID_TOTAL_DAUN_PEPAYA_Carica_papaya_L._SECARA_IN_VITRO.doc (308.5K)

Word count: 4662

Character count: 29456

1
**UJI AKTIVITAS ANTIPLATELET, ANTIKOAGULAN, DAN AGEN
TROMBOLITIK ALKALOID TOTAL DAUN PEPAYA (*Carica papaya L.*)
SECARA IN VITRO**

**ANTIPLATELET, ANTICOAGULANT, THROMBOLYTIC ACTIVITY OF TOTAL
ALKALOID EXTRACT OF PAPAYA LEAVES (*Carica papaya L.*) IN VITRO**

ABSTRAK

Alkaloid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang telah terbukti memiliki aktivitas antiplatelet, antikoagulan, maupun trombolitik. Daun pepaya (*Carica papaya L.*) memiliki sejumlah senyawa alkaloid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik alkaloid total daun pepaya secara *in vitro*. Penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu kontrol negatif (placebo), kontrol positif alkaloid total daun pepaya dengan konsentrasi 0.5, 1.0, dan 2.0 mg/ml. Berdasarkan analisis statistik diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara persentase inhibisi agregasi alkaloid total dibandingkan dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan nilai $F=10.225$ ($F_{hit} > F_{tabel}$) dan $p=0.000$ ($p<0.01$). Uji LSD menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif clopidogrel dengan nilai signifikansi $p>0.01$. Pada uji antikoagulan, alkaloid total daun pepaya secara signifikan dapat memperpanjang CT, PT, dan APTT dan memiliki perbedaan dengan kontrol negatif yang ditunjukkan dengan nilai $p=0.000$ ($p<0.01$), namun tidak berbeda dengan kontrol positif (heparin) dengan nilai signifikansi $p>0.01$. Berdasarkan hasil uji trombolitik menunjukkan bahwa alkaloid total daun pepaya dapat meningkatkan persentase trombolitik yang berbeda dengan kontrol negatif yang ditunjukkan nilai $F = 6.980$ ($F_{hit} > F_{tabel}$) dengan $p=0.000$ ($p<0.01$), namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif (nattokinase) dengan nilai signifikansi $p>0.01$.

Kata kunci: alkaloid, antiplatelet, antikoagulan, trombolitik

ABSTRACT

*Alkaloid is secondary metabolit that has been proven to have antiplatelet, anticoagulant, and thrombolytic. Papaya (*Carica papaya L.*) leaves have a number of alkaloid compound. This study aims to determine the antiplatelet, anticoagulant, and thrombolytic activity of total alkaloids of papaya leaves in vitro. This study was divided into 5 groups: (1) negative control, positive control (drug), total alkaloids of papaya leaves (0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml). Based on statistical analysis, it is known that there is a significant difference between aggregate inhibitors, total alkaloids compared with negative controls calculated with the value of $F = 10.225$ ($F_{hit} > F_{table}$) and $p = 0.000$ ($p < 0.01$). LSD test*

showed no significant difference between the control group with clopidogrel with a significance value of $p > 0.01$. In the anticoagulant test, the total alkaloid of papaya leaves significantly extended the CT, PT, and APTT values and had a negative control with a value of $p = 0,000$ ($p < 0.01$), but was not different from heparin with a significance value of $p > 0.01$. Based on the results of the thrombolytic test showed that the total alkaloid of papaya leaves can increase the percentage of thrombolytic that is different from the negative control with $F = 6.980$ ($F_{hit} > F_{table}$) and $p = 0,000$ ($p < 0.01$), but not significantly different from nattokinase with a significance value of $p > 0.01$.

Key words: *alkaloid, antiplatelet, anticoagulant, thrombolytic*

PENDAHULUAN

Hemostasis merupakan mekanisme untuk menutup pembuluh dari saat terjadi luka, menjaga keenceran darah, serta menghilangkan bekuan darah setelah perbaikan integritas pembuluh darah. Hemostasis meliputi 3 proses utama yaitu agregasi platelet, koagulasi, dan fibrinolisis. Mekanisme agregasi platelet dan koagulasi mengarah pada proses pembekuan darah sedangkan fibrinolisis terjadi untuk menstabilkan kondisi keenceran darah dalam hemostasis. Agregasi platelet merupakan kemampuan platelet untuk berkumpul dan melekat satu sama lain untuk membentuk bekuan dengan bantuan sejumlah mediator kimiawi seperti ADP dan Tromboxan A₂ (TxA₂). Platelet yang telah beragregasi dan telah aktif akan melakukan tahap koagulasi dengan bantuan faktor pembekuan darah melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Setelah integritas pembuluh darah telah dicapai, maka bekuan darah akan lisis oleh mekanisme trombolitik yang diaktifkan oleh *tissue Plasminogen Activator* (t-PA) [1].

Hemostasis dikatakan normal apabila proses pembekuan darah dan fibrinolisis terjadi secara seimbang [2]. Hiperkoagulasi pada fase agregasi platelet dan koagulasi serta hipofibrinolitik dapat menyebabkan bekuan darah menjadi sumbatan (thrombus) dan tromboemboli. Faktor penyebab hiperkoagulasi dan hipofibrinolisis antara lain gangguan molekul pada sistem koagulasi dan fibrinolisis, kurangnya aktivitas fisik, obesitas, kanker, gangguan hormonal, autoimun, inflamasi di dalam pembuluh darah, serta serosis hati [3].

Trombosis merupakan kontributor utama penyakit global dunia seperti Ischemic Heart Disease, Ischemic Stroke, dan Venous thromboembolism yang

menyumbangkan 1 dari 4 kematian penduduk dunia. Berdasarkan data diketahui bahwa penyebab utama thrombosis yang terjadi di seluruh dunia merata mulai dari negara miskin, berkembang bahkan negara maju dengan penyebab utama adalah infeksi dan efek obat [4].

Sejumlah obat anti pembekuan darah telah banyak digunakan baik berupa antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik. Salah satu antiplatelet yang banyak digunakan yaitu clopidogrel yang bekerja sebagai antagonis reseptor ADP sehingga dapat mencegah agregasi platelet [5]. Untuk bisa aktif, obat ini membutuhkan proses oksidasi oleh hepatic cytochrome P450 (CYP450) [5]. Pada kondisi *in vitro*, clopidogrel dapat berikatan dengan plasma darah manusia dan dimetabolisme oleh CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2 and CYP2B6 [6]. Efek samping yang ditimbulkan obat ini adalah sakit kepala, kram perut, muntah dan ulserasi lambung [7].

Heparin merupakan salah satu antikoagulan yang sering digunakan. Obat ini bekerja sebagai penghambat faktor Xa untuk menghambat pembekuan darah. Heparin berperan sebagai antikoagulan yang berikatan dengan faktor IX dan XI, namun interaksi yang paling berperan adalah dengan plasma antitrombin III [8]. Heparin memiliki efek samping diantaranya menyebabkan perdarahan, osteoporosis, dan trombositopenia [8].

Streptokinase dan Nattokinase merupakan obat trombolitik yang banyak digunakan. Kedua obat ini biasanya diberikan pada penderita emboli dini dan infark miokard. Streptokinase bekerja pada plasminogen secara tidak langsung dengan mengaktifkan kompleks plasminogen aktivator (tPA) [9]. Efek samping streptokinase antara lain menimbulkan alergi, Nattokinase bekerja langsung dalam proses trombolitik layaknya plasmin yang langsung melisiskan bekuan. Berbeda dengan jenis trombolitik lain, nattokinase tergolong minim efek samping. Namun dilaporkan bahwa Nattokinase yang diproduksi dari tanaman transgenik dapat menimbulkan respon imun [10].

Alkaloid (*alkali like*) merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan telah banyak dimanfaatkan sebagai obat sejak dahulu. Ciri spesifik dari golongan alkaloid adalah adanya

atom nitrogen heterosiklik yang membuatnya memiliki sejumlah efek farmakologis diantaranya sebagai analgesik, memiliki efek sedatif, antibakteri, antimalarial, gangguan perdarahan, antihipertensi, anti kanker, anti inflamasi, antioksidan, kardioprotektif, dan imunoregulator [11]. Dalam mengatasi gangguan perdarahan, sejumlah alkaloid diketahui memiliki aktivitas antiplatelet [12], antikoagulan [13,14,15,16] dan trombolitik [12].

Pepaya (*Carica papaya*) merupakan salah satu spesies dari Famili *Caricaceae*. Bagian daun, buah dan biji pepaya banyak dimanfaatkan sebagai obat karena terbukti memiliki aktivitas biologis dan efek farmakologis. Daun pepaya memiliki kandungan berbagai senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid (kaempferol dan myricetin), alkaloid (carpaine, pseudocarpaine, dehydrocarpaine I dan II), senyawa fenolik (asam ferulat, asam caffeic, asam klorogenat), senyawa sinogenetik (benzylglucosinolate), karotenoid yaitu β -karoten, likopen, antrakuinon glikosida, choline, carposide, vitamin C dan E [17]. Daun pepaya terbukti memiliki manfaat sebagai anti kanker [18], anti mikroba dan anti inflamasi [19], analgesik [20], antioksidan [21], serta dapat menurunkan kadar gula dan lipid dalam darah [22]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas alkaloid total daun pepaya pada aktivitas pembekuan darah sebagai antiplatelet, antikoagulan, dan trombolitik secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi Alkaloid Total Daun Pepaya

(1) Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 500 g serbuk daun papaya dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam sebanyak 3 kali. Filtrat hasil maserasi diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanol daun papaya [23]. Ekstraksi dilakukan di Unit Layanan Pengujian (ULP) FF UNAIR.

(2) Pemisahan Alkaloid Total Daun Pepaya

Ditimbang 10 g ekstrak etanol lalu dilarutkan dalam 100 ml etil asetat kemudian disaring. Residu di siapkan untuk Alkaloid Total. Residu dilarutkan dengan 100 ml etanol dan ditambahkan HCL 2N sampai pH 2, kemudian

dipartisi dengan 100 ml kloroform, dan 30 ml aquades lapisan kloroform lalu dipisahkan. Lapisan etanol ditambahkan dengan NH_4OH 1N hingga pH 12 kemudian dipartisi lagi dengan 100 ml kloroform diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kloroform (Alkaloid Total) lalu dikeringkan [23].

(3) Uji Fitokimia Alkaloid

Beberapa mL ekstrak alkaloid total daun pepaya ditambahkan dengan 2 mL kloroform dan 2 mL amonia lalu disaring. Filtrat kemudian ditambahkan 3- 5 tetes H_2SO_4 pekat lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas dipindahkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 mL. Ketiga larutan ini dianalisis dengan pereaksi Mayer, Dragendorff dan Wagner sebanyak 4-5 tetes. Terbentuknya endapan menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung alkaloid. Reaksi dengan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih, dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga dan dengan pereaksi wagner terbentuk endapan coklat [24].

(4) Uji Fitokimia Flavonoid

Beberapa ml ekstrak alkaloid total ditambahkan dengan 100 ml air panas, didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan 0.05 g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuk warna merah, kuning atau jingga [24].

(5) Uji Fitokimia Saponin

Beberapa mL ekstrak alkaloid total daun pepaya ditambahkan dengan 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil selama kurang lebih 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin [24].

(6) Uji Tanin

Beberapa mL ekstrak alkaloid total daun pepaya ditambahkan dengan 10 tetes FeCl_3 10%. Ekstrak positif mengandung tanin apabila menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman [24].

Uji Etik

Penelitian ini menggunakan sampel darah vena yang diambil dari subjek. Sebelum pelaksanaan pengambilan sampel, peneliti melaksanakan uji etik di RSUD Sidoarjo Jawa Timur. Penelitian ini mendapat Persetujuan Etik (*Ethical Approval*) oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) RSUD Kabupaten Sidoarjo dengan Nomor Surat Pernyataan Lain Etik Penelitian Kesehatan Nomor: 893.3/ 2450/ 438.6.7/ 2019. Pengambilan sampel dilakukan dengan informasi dan persetujuan Subjek serta dilakukan oleh Analis Medis bersertifikat.

Persiapan Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah Whole blood, Platelet Rich Plasma (PRP), dan Platelet Poor Plasma (PPP) dengan kriteria inklusi subjek dengan kondisi tubuh sehat dibuktikan dengan tekanan darah normal, kadar glukosa dan kolesterol darah normal.

Darah vena diambil pada menggunakan spuit steril ukuran 22. Sampel darah vena dibagi ke dalam 3 grup uji:

1. Untuk uji antikoagulan (Pengamatan *Clotting Time*), darah vena per sampel uji dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi (5 kelompok uji) masing-masing sebanyak 1 ml.
2. Uji Fibrinolitik, darah vena dimasukkan ke dalam microtube (5 kelompok uji) masing-masing sebanyak 0.5 ml.
3. Untuk uji antiplatelet, PT dan APTT, darah vena dimasukkan ke dalam vacutainer Na Citrat untuk mengambil plasma.

Persiapan Bahan Uji

- (1) Pembuatan Kontrol Negatif

Larutan yang digunakan untuk kontrol negatif adalah placebo (pelarut) dari larutan uji yaitu larutan saline (NaCl 0.9%).

- (2) Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif uji antiplatelet adalah menggunakan 75 mg clopidogrel yang dilarutkan dalam aquades dengan tween 1% sebanyak 50 ml lalu

ditambah pelarut hingga 100 ml sehingga didapatkan larutan clopidogrel dengan konsentrasi 0.75 mg/ml [6].

Kontrol positif untuk uji antikoagulan menggunakan heparin injek 5000 IU/ml. Sebanyak 1 ml (berisi 50 mg heparin) dalam 50 ml aquades sehingga konsentrasi akhir heparin 1 mg/ml [25].

Kontrol positif uji fibrinolitik menggunakan nattokinase. Dua kapsul nattokinase (1 kapsul = 50 mg nattokinase) dilarutkan dalam 10 ml aquades dengan 1% tween dalam labu ukur lalu dihomogenkan sehingga didapatkan konsentrasi nattokinase sebesar 10 mg/ml [26].

- (3) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Alkaloid Total 0.5 mg/ml, 1.0 mg/ml, dan 2.0 mg/ml

Pembuatan larutan uji ekstrak alkaloid total dilakukan dengan menimbang ekstrak alkaloid total sebanyak total kebutuhan pada masing-masing konsentrasi dan dilarutkan dalam pelarut NaCl 0.9%.

Uji Aktivitas Antiplatelet Secara In Vitro

Uji aktivitas antiplatelet secara in vitro dapat dilakukan dengan mengamati penghambatan agregasi platelet yang terjadi saat plasma darah diberi perlakuan beserta induksi dengan ADP. Agregat platelet yang terbentuk dinilai dengan cara membandingkan serapan plasma sebelum dan sesudah diberi ADP menggunakan spektrofotometer UV Vis. Semakin besar penurunan serapan platelet plasma, maka semakin besar agregat yang terbentuk.

Platelet Rich Plasma (PRP) sebanyak 1 ml ditambahkan dengan larutan uji sebanyak 250 μ l lalu diinkubasi pada suhu 37°C di dalam waterbath selama 20 menit. Setelah diinkubasi, PRP diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan Platelet Poor Plasma (PPP) sebagai blanko. PRP yang telah diukur serapannya kemudian ditambah dengan Adenosine Diphosphate (ADP) sebanyak 20 μ l lalu diinkubasi di dalam waterbath pada suhu 37°C selama 20 menit lalu diukur serapannya kembali [25].

Perhitungan agregasi platelet dihitung dengan rumus (1) dan (2) [27]:

$$\% \text{ Inhibisi agregasi} = \frac{(1 - B)}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

B: absorbansi setelah penambahan ADP

A: absorbansi sebelum penambahan ADP

Persentase (%) inhibisi agregasi relatif terhadap kontrol negatif

$$= \frac{A - B}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

A: persentase inhibisi agregasi kontrol negatif

B: persentase inhibisi agregasi perlakuan

Uji Aktivitas Antikoagulan Secara In Vitro

Uji aktivitas antikoagulan secara *in vitro* dilakukan dengan mengamati waktu pembekuan darah/ Clotting Time (CT) dengan Metode Lee and White. Darah vena sebanyak 1 ml diletakkan di dalam tabung serologi berdiameter 7-8 mm kemudian diamati waktu pembekuan darahnya (Gandasoebrata, 2007).

Selain CT, uji aktivitas antikoagulan juga dilakukan dengan mengamati aktivitas jalur ekstrinsik dan intrinsik koagulasi. Uji aktivitas jalur ekstrinsik pembekuan darah melalui pengamatan masa Prothrombin/ Prothrombine Time (PT), dan uji aktivitas jalur intrinsik pembekuan darah melalui pengamatan Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) [28].

Uji Aktivitas Trombolitik Secara In Vitro

Setiap 500 µl darah dipindah ke mikrotube yang telah ditimbang terlebih dahulu. Darah kemudian dibekukan kemudian beratnya ditimbang sebagai berat bekuan awal. Setelah ditimbang, darah diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit setelah terbentuk bekuan. Secara langsung serum akan terperas keluar dari bekuan. Setelah 60 menit, keluarkan mikrotube berisi darah diambil serum hingga tertinggal bekuan saja kemudian bekuan ditimbang sebagai berat bekuan akhir.

Persentase trombolitik dapat dihitung dari rumus 3 [29]:

$$\% \text{ Trombolitik} = \frac{A - B}{A} \times 100\% \dots \dots \dots (3)$$

A : Berat bekuan (*clot*) awal, B : Berat bekuan (*clot*) akhir

Analisis Data

Data yang diperoleh berupa persentase inhibisi agregasi platelet relatif, nilai CT, nilai PT dan APTT, serta persentase trombolitik diuji normalitasnya menggunakan analisis Kolmogorof Smirnov ($p=0.01$) Data kemudian dilihat homogenitasnya menggunakan analisis uji beda One way Anova (Analysis of Variance) ($p=0.01$). Hubungan antar konsentrasi alkaloid total daun pepaya dianalisis menggunakan uji Korelasi Pearson ($p=0.01$).

HASIL DAN DISKUSI

Hasil Ekstraksi Alkaloid Total Daun Pepaya dan Uji Fitokimia

Dari 500 g serbuk daun pepaya didapatkan ekstrak kenal daun pepaya berwarna hijau tua dengan berat 42.6 g (8.52%). Setelah dilakukan pemisahan alkaloid total didapatkan alkaloid total hijau pekat sebanyak 0.781 g.

Uji fitokimia dilakukan untuk memastikan bahwa hasil ekstraksi alkaloid total daun pepaya telah didapatkan alkaloid total dan sudah terpisah dari senyawa metabolit lain. Hasil Uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Alkaloid Total Daun Pepaya

Uji Fitokimia		Ekstrak Alkaloid Total Daun Pepaya	
Golongan	Pereaksi	Fraksi Metanol	Fraksi Klorofom
Alkaloid	Mayer	+	+
	Wagner	+	+
	Drugendorff	+	+
Flavonoid		+	-
Saponin		+	-
Tanin		+	-

Berdasarkan hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa pada fraksi methanol (belum dilakukan pemisahan alkaloid) masih mengandung senyawa dari

golongan flavonoid, saponin, tannin dan alkaloid. Pada fraksi klorofom menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat di dalamnya hanya alkaloid saja (ditunjukkan dengan hasil positif), sehingga bisa dipastikan bahwa pemisahan alkaloid dengan klorofom merupakan alkaloid total.

Efek Antiplatelet Alkaloid Total Daun Pepaya Secara in Vitro

Aktivitas antiplatelet alkaloid daun pepaya secara *in vitro* diketahui dengan melihat adanya aktivitas penghambatan agregasi platelet yang ditunjukkan dengan nilai persentase (%) inhibisi agregasi platelet relatif terhadap kontrol negatif. Semakin tinggi nilai % inhibisi agregasi platelet, maka semakin kuat aktivitas antiplatelet. Hasil uji antiplatelet ditunjukkan pada Tabel 2.

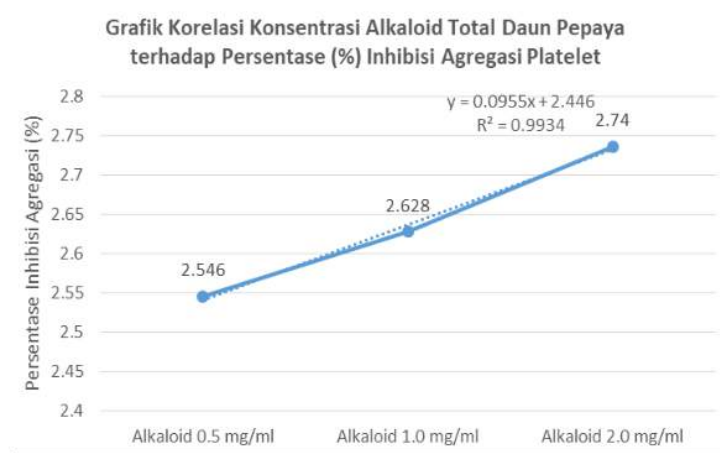
Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antiplatelet Ekstrak Alkaloid Total Daun Pepaya

Perlakuan	Rerata Persentase (%) Inhibisi Agregasi Platelet \pm SD
Kontrol - Aquades	0 \pm 0 ^a
Kontrol + Clopidogrel	2.127 \pm 0.75 ^b
Alkaloid Total Daun Pepaya 0.5 mg/ml	2.546 \pm 0.85 ^b
1 mg/ml	2.628 \pm 1.9 ^b
2 mg/ml	2.74 \pm 0.94 ^b

Notasi a-e menunjukkan hasil uji lanjut LSD. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

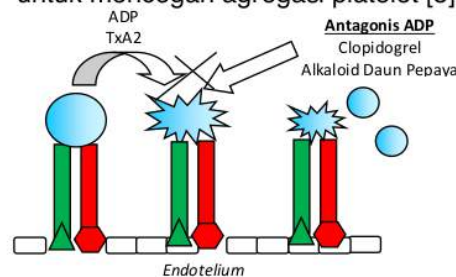
Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov menyebutkan bahwa, data persentase inhibisi agregasi platelet berdistribusi normal ($p > 0.01$). Berdasarkan uji One Way Anova diketahui terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ditunjukkan dengan nilai $F = 10.225$ ($F_{hit} > F_{tabel}$) dan $p = 0.000$. Berdasarkan uji lanjut LSD diketahui bahwa kelompok perlakuan alkaloid total ekstrak daun pepaya berbeda signifikan dengan kontrol negatif ($p < 0.01$) namun tidak berbeda signifikan dengan kontrol positif ($p > 0.01$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian alkaloid total ekstrak daun pepaya memiliki aktivitas sejalan dengan kontrol positif yaitu sebagai antiplatelet terbukti dengan adanya nilai persentase inhibisi agregasi platelet.

Berdasarkan hasil uji Korelasi Pearson diketahui bahwa terdapat korelasi positif antara konsentrasi alkaloid terhadap persentase inhibisi agregasi dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0.059. Adapun hubungan antar konsentrasi alkaloid ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1 Grafik Korelasi Konsentrasi Alkaloid Total Daun Pepaya Terhadap Persentase (%) Inhibisi Agregasi Platelet. Grafik tersebut menunjukkan adanya korelasi positif yang berarti bahwa semakin besar konsentrasi alkaloid total daun pepaya (0.5 – 2.0 mg/ml), maka semakin besar nilai persentase inhibisi agregasi platelet yang ditimbulkan.

Adanya aktivitas antiplatelet alkaloid total daun pepaya belum dapat diasumsikan karena adanya penghambatan reseptor ADP untuk dapat berikatan dengan platelet yang memicu terjadinya agregasi karena dalam penelitian ini menggunakan ADP sebagai penginduksinya (*inducer*). Mekanisme ini mirip dengan aktivitas antiplatelet yang bertindak sebagai antagonis reseptor ADP untuk mencegah agregasi platelet [5].



Gambar 2. Ilustrasi Aktivitas Antiplatelet Alkaloid Total Daun Pepaya.

Sejumlah alkaloid seperti berberin, piperin, piperlongumine, rutacarpine, spiramine, harmone, romucosine, dan curcumin dapat mencegah agregasi platelet dengan menghambat sintesis TxA₂, menghambat aktivitas ADP dan thrombin, serta mencegah perlekatan platelet dengan kolagen pada endothelium [12].

Efek Antikoagulan Alkaloid Total Daun Pepaya secara in vitro

Efek antikoagulan alkaloid total daun pepaya dapat diketahui dengan pengaruh pemberian alkaloid total terhadap nilai waktu pembekuan darah yang ditunjukkan dengan nilai *Clotting Time* (CT). Uji antikoagulan juga ditunjukkan oleh uji PT dan APTT untuk menunjukkan aktivitas jalur koagulasi yang dipengaruhi. Hasil uji antikoagulan berdasarkan nilai CT ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan Berdasarkan Nilai CT

Perlakuan		Rerata Nilai CT ± SD
Kontrol -	Aquades	9.295 ± 0.68 ^a
Kontrol +	Heparin	60 ± 0 ^b
Alkaloid Total Daun Pepaya	0.5 mg/ml	11.62 ± 0.85 ^c
	1 mg/ml	14.06 ± 1.06 ^d
	2 mg/ml	18.21 ± 1.42 ^e

Notasi a-e menunjukkan hasil uji lanjut LSD. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

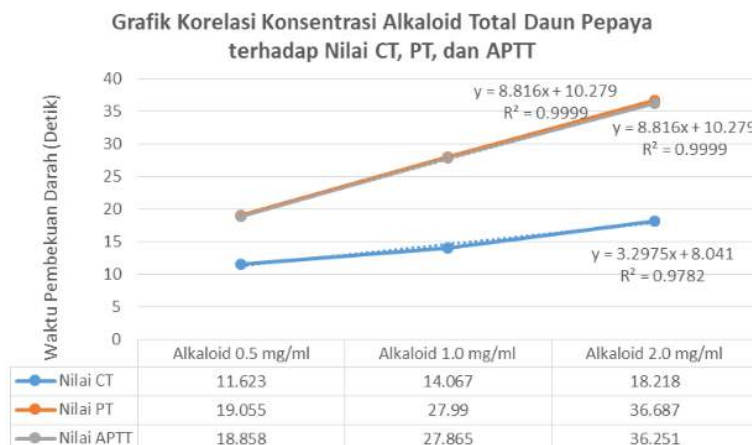
Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov menyebutkan bahwa, data persentase inhibisi agregasi platelet berdistribusi normal ($p > 0.01$). Berdasarkan uji One Way Anova diketahui terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan terhadap nilai CT, PT dan APTT berturut-turut ditunjukkan dengan nilai $F=134.105$, $F=82.060$, dan $F=88.158$ ($F_{hit} > F_{tabel}$) dengan nilai signifikansi $p=0.000$ ($p < 0.01$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan nilai CT, PT, dan APTT antar kelompok perlakuan.

Berdasarkan hasil uji PT dan APTT diperoleh hasil Uji Aktivitas Antikoagulan Berdasarkan Nilai PT dan APTT pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antikoagulan Berdasarkan Nilai PT dan APTT

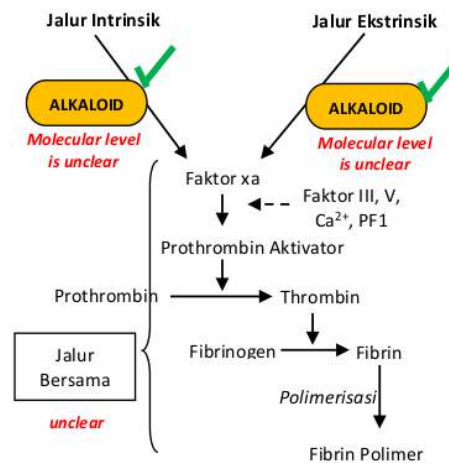
Perlakuan		Rerata Nilai PT ± SD	Rerata Nilai APTT ± SD
Kontrol -	Aquades	11.66 ± 1.62 ^a	11.55 ± 1.56 ^a
Kontrol +	Heparin	60 ± 0 ^b	60 ± 0 ^b
Alkaloid Total Daun Pepaya	0.5 mg/ml	19.05 ± 2.88 ^c	18.85 ± 2.79 ^c
	1 mg/ml	27.99 ± 3.95 ^d	27.86 ± 3.91 ^d
	2 mg/ml	36.69 ± 5.56 ^e	36.25 ± 5.18 ^e

Berdasarkan hasil uji Korelasi Pearson diketahui bahwa terdapat korelasi positif antara konsentrasi alkaloid total daun pepaya terhadap perpanjangan CT, PT, dan APTT dengan nilai koefisien korelasi berturut-turut adalah 0.920, 0.871, dan 0.878. Adapun grafik korelasi antara konsentrasi alkaloid total daun pepaya dengan nilai CT, PT dan APTT ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik Korelasi Konsentrasi Alkaloid Total Daun Pepaya terhadap Nilai CT, PT, dan APTT. Grafik tersebut menunjukkan adanya korelasi positif yang berarti bahwa semakin besar konsentrasi alkaloid total daun pepaya (0.5 – 2.0 mg/ml), semakin besar waktu pembekuan darah yang ditunjukkan dengan perpanjangan nilai CT, PT, dan APTT.

Berdasarkan analisis data diketahui bahwa, alkaloid total daun pepaya memiliki aktivitas antikoagulan secara *in vitro* yang dibuktikan dengan adanya pemanjangan waktu pembekuan darah (nilai CT). Aktivitas antikoagulan alkaloid total daun pepaya mempengaruhi jalur intrinstik dan ekstrinsik koagulasi yang melibatkan berbagai faktor koagulasi. Hal ini dibuktikan dengan terjadinya pemanjangan pada nilai PT (jalur ekstrinsik) dan nilai APTT (jalur intrinsik). Adapun ilustrasi aktivitas antikoagulan alkaloid total daun pepaya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Ilustrasi Aktivitas Antikoagulan Alkaloid Total Daun Pepaya Melalui Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik dan Memperpanjang Clotting Time

Adanya pemanjangan PT menunjukkan bahwa adanya penghambatan pada jalur ekstrinsik koagulasi yaitu penghambatan pada tromboplastin. Pemanjangan APTT menunjukkan adanya penghambatan pada jalur intrinsik meliputi faktor XII, XI, dan IX.

Berdasarkan kajian literatur, alkaloid dari tanaman memiliki sejumlah mekanisme sebagai antikoagulan. Pellitorine yang merupakan alkaloid dari tanaman *Asarum sieboldii* dapat meningkatkan nilai PT dan APTT melalui penghambatan aktivitas trombin dan Faktor Xa pada jalur bersama [13]. Alkaloid dari tanaman *Scolopendra subspinipes mutilans* dapat menurunkan produksi

trombin, faktor Xa, dan fibrin polimerisasi sehingga dapat menurunkan aktivitas koagulasi [15].

Efek Trombolitik Alkaloid Total Daun Pepaya secara in vitro

Efek trombolitik (fibrinolitik) alkaloid total daun pepaya dilihat dari persen trombolitik yang menggambarkan seberapa banyak plasma darah terperas dari bekuan (*clot*). Hasil uji trombolitik ditunjukkan pada Tabel 5.

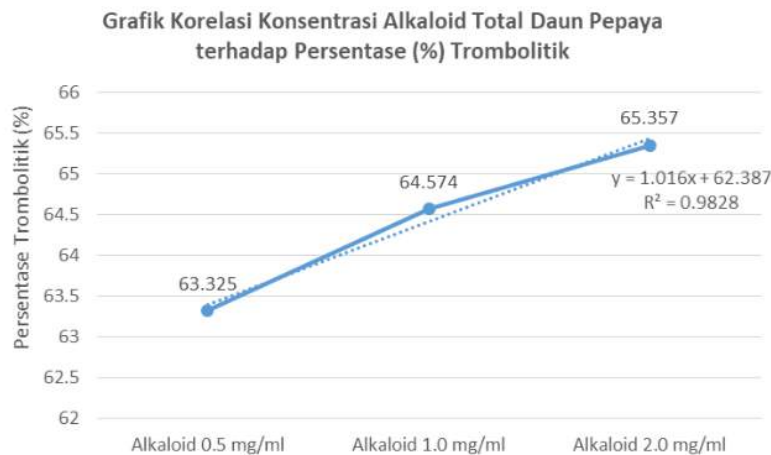
Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Trombolitik

Perlakuan		Rerata Nilai CT \pm SD
Kontrol -	Aquades	45.39 \pm 7.8 ^a
Kontrol +	Nattokinase	66.27 \pm 11.2 ^b
Alkaloid Total Daun Pepaya	0.5 mg/ml	63.32 \pm 10.6 ^b
	1 mg/ml	64.57 \pm 11.2 ^b
	2 mg/ml	65.36 \pm 11.3 ^b

Notasi a dan b menunjukkan hasil uji lanjut LSD. Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Uji Normalitas Kolmogorov Smirnov menyebutkan bahwa, data persentase inhibisi agregasi platelet berdistribusi normal ($p > 0.01$). Berdasarkan uji One Way Anova diketahui terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ditunjukkan dengan nilai $F = 6.980$ ($F_{hit} > F_{tabel}$) dan $p = 0.000$ ($p < 0.01$).

Berdasarkan hasil uji Korelasi Pearson diketahui bahwa terdapat korelasi positif antara konsentrasi alkaloid total daun pepaya terhadap persentase trombolitik dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0.079. Korelasi konsentrasi alkaloid total daun pepaya terhadap persentase trombolitik secara *in vitro* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik Korelasi Konsentrasi Alkaloid Total Daun Pepaya terhadap Persentase Trombolitik. Grafik tersebut menunjukkan adanya korelasi positif yang berarti bahwa semakin besar konsentrasi alkaloid total daun pepaya (0.5 – 2.0 mg/ml), semakin besar aktivitas trombolitiknya.

Adanya aktivitas trombolitik ¹ alkaloid total daun pepaya dibuktikan dengan meningkatnya persentase trombolitik dibandingkan dengan kontrol negatif mencapai 63 – 65%. Alkaloid total daun pepaya memiliki aktivitas trombolitik mendekati aktivitas nattokinase. Meski demikian, belum dapat dijelaskan bagaimana mekanisme trombolitik alkaloid total daun pepaya. Berdasarkan kajian literatur, sejumlah alkaloid dari beberapa tanaman memiliki mekanisme dalam meningkatkan lisis bekuan. Alkaloid jenis pellitorine dapat meningkatkan aktivitas lisis bekuan (trombolitik/ fibrinolisis) melalui penghambatan induksi TNF α dalam memproduksi Platelet Activator Inhibitor-1 (PAI-1) sehingga inhibitor plasmin tidak terbentuk, dan plasmin dapat mendegradasi fibrin polimer yang menyebabkan lisisnya bekuan.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa alkaloid total daun pepaya memiliki aktivitas antiplatelet dengan menghambat agregasi platelet melalui penghambatan penginduksi agregasi yaitu ADP. Alkaloid total daun pepaya

memiliki aktivitas antikoagulan melalui pemanjangan masa pembekuan darah/*Clotting Time* (CT) melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik yang dibuktikan dengan pemanjangan APTT dan PT. Alkaloid total daun pepaya juga dapat menyebabkan trombolisis atau lisis bekuan dibuktikan dengan tingginya persentase trombolitik dibandingkan dengan kontrol negatif dan hampir menyamai aktivitas nattokinase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (KEMENRISTEKDIKTI) yang telah memberikan dana dalam penelitian ini dalam pendanaan tahun 2018, serta STIKES Rumah Sakit Anwar Medika yang merupakan Institusi tempat peneliti berkarya.

REFERENSI

- [1] Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New Fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, 93(1), 327–358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2011>.
- [2] Rasche, H. (2001). Haemostasis and thrombosis: An overview. *European Heart Journal, Supplement*, 3(Q), 3–7. [https://doi.org/10.1016/S1520-765X\(01\)90034-3](https://doi.org/10.1016/S1520-765X(01)90034-3).
- [3] Smalberg, J. H., Kruij, M. J. H. A., Janssen, H. L. A., Rijken, D. C., Leebeek, F. W. G., & De Maat, M. P. M. (2011). Hypercoagulability and hypofibrinolysis and risk of deep vein thrombosis and splanchnic vein thrombosis: Similarities and differences. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(3), 485–493. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213371>.
- [4] Raskob, G. E., Angchaisuksiri, P., Blanco, A. N., Büller, H., Gallus, A., Hunt, B. J., ... Weitz, J. I. (2014). Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(7), 724–735. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1390325>.
- [5] Ageno, W., Mbbs, A. S. G., Pharmd, A. W., Crowther, M., Hylek, E. M., &

- Palareti, G. (2012). 9th ed : American College of Chest Physicians. *Chest*, 141(2), e44S-e88S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2292>.
- [6] Bristol-myers, & Company, S. (2009). *NDA 20-839 / S-044 Page 4*. 4–27.
- [7] Angiolillo, D. J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Alfonso, F., Macaya, C., Bass, T. A., & Costa, M. A. (2007). Variability in Individual Responsiveness to Clopidogrel. Clinical Implications, Management, and Future Perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*, 49(14), 1505–1516. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.11.044>.
- [8] Oduah, E. I., Linhardt, R. J., & Sharfstein, S. T. (2016). Heparin: Past, present, and future. *Pharmaceuticals*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ph9030038>.
- [9] Kunamneni, A., & Durvasula, R. (2014). Streptokinase-A Drug for Thrombolytic Therapy: A Patent Review. *Recent Advances in Cardiovascular Drug Discovery*, 9(2), 106–121. <https://doi.org/10.2174/1574890110999150202150017>.
- [10] Weng, Y., Yao, J., Sparks, S., & Wang, K. Y. (2017). Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030523>.
- [11] Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. *Asian Journal of Botany*, 1(April), 1–6. <https://doi.org/10.63019/ajb.v1i2.467>.
- [12] Ain, Q. U., Khan, H., Mubarak, M. S., & Pervaiz, A. (2016). Plant alkaloids as antiplatelet agent: Drugs of the future in the light of recent developments. *Frontiers in Pharmacology*, 7(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00292>.
- [13] Ku, S. K., Lee, I. C., Kim, J. A., & Bae, J. S. (2013). Antithrombotic activities of pellitorine in vitro and in vivo. *Fitoterapia*, 91, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.08.004>.
- [14] Govindappa, M., Naik, C., & Prakash, B. (2015). Anticoagulant activity of partially purified coumarin (s) extracts of *Sonchus oleraceus*. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 3(July), 87–91.

- [15] Lee, W., Lee, J. I., Kulkarni, R., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M. K., & Bae, J. S. (2016). Antithrombotic and antiplatelet activities of small-molecule alkaloids from *Scolopendra subspinipes mutilans*. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep21956>.
- [16] Lee, J. I., Lee, W., Kim, M. A., Hwang, J. S., Na, M. K., & Bae, J. S. (2017). Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(6), 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13055>.
- [17] Yogiraj, V., Goyal, P. K., Chauhan, C. S., Goyal, A., & Vyas, B. (2014). *Carica papaya* Linn: an overview. *International Journal of Herbal Medicine*, 2(5 Part A), 1–8.
- [18] Parray, Z. A., & Parray, S. (2018). Anticancer activities of Papaya (*Carica papaya*): A Review. *TANG [Humanitas Medicine]*, 8(4), 1–5. <https://doi.org/10.5667/tang.2018.0020>.
- [19] Gupta, A., Patil, S. S., & Pendharkar, N. (2017). Antimicrobial and anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Carica papaya*. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 6(4), 148–152.
- [20] Danbornon, A. M., Ibrahim, S. H., & Mallo, M. J. (2018). The Anti-Inflammatory and Analgesic Effects Of the Aqueous Leaves Extract of *Carica Papaya*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, 13(3), 60–63. <https://doi.org/10.9790/3008-1303046063>.
- [21] Mandal, S. De, Mathipi, V., & Lalnunmawii, E. (2015). An Investigation of the Antioxidant Property of *Carica papaya* Leaf Extracts from Mizoram, Northeast India. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 4(3), 42–45.
- [22] Maniyar, Y., & Bhixavatimath, P. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic activities of aqueous extract of *Carica papaya* Linn. leaves in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 3(2), 70–74. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.96519>.

- [23] Irianto, I.D.K. 2013. Formulasi nanopartikel pentagamavunon-0 menggunakan kitosan viskositas rendah dan natrium alginat dengan metode gelasi ionik serta uji antiinflamasi secara in vivo. *Thesis*. Yogyakarta: Gadjah Mada University.
- [24] Mondong, F. R. (2015). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifolia* Jacq.) dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L.) Herb). *Jurnal MIPA*, 4(1), 81. <https://doi.org/10.35799/jm.4.1.2015.6910>.
- [25] Bash, E. (2015). UJI AKTIVITAS IN VITRO ANTIPLATELET DAN ANTIKOAGULAN FRAKSI N-HEKSANA KULIT BATANG BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.). *PhD Proposal*, 1, 1–18. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- [26] Setyowati, R. (2015). *Skripsi Uji Aktivitas Antiplatelet dan Trombolitik Ekstrak Etanol Kulit Buah Jeruk Purut (Citrus hystrix D.C) In Vitro*.
- [27] Moriyama, H., Hosoe, T., Wakana, D., Itabashi, T., Kawai, K. I., Iizuka, T., ... Lau, F. C. (2009). Assay-guided informatory screening method for antiplatelet effect of adenosine isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300: Inhibitory behaviors of adenosine in different solvents. *Journal of Health Science*, 55(1), 103–108. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.103>.
- [28] Gandasoebata, R. (2007). *Penuntuk Laboratorium Klinik*. Jakarta: Dian Rakyat.
- [29] Prasad, S., Kashyap, R. S., Deopujari, J. Y., Purohit, H. J., Taori, G. M., & Daginawala, H. F. (2007). Effect of *Fagonia Arabica* (Dhamasa) on in vitro thrombolysis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-7-36>.

paper 1

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

14%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

jsfk.ffarmasi.unand.ac.id

Internet Source

10%

2

media.neliti.com

Internet Source

3%

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 2%