

UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SERTA UJI AKTIVITAS
FUKOIDAN SEBAGAI ANTI KOAGULAN DARI RUMPUT LAUT
COKLAT
(*Sargassum crassifolium*)**

TESIS

**Ellya Sinurat
NPM: 0906573326**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK**

JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SERTA UJI
AKTIVITAS FUKOIDAN SEBAGAI ANTIKOAGULAN DARI
RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum crassifolium*)**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh magister sains

**Ellya Sinurat
NPM: 0906573326**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM MAGISTER ILMU KIMIA
KEKHUSUSAN KIMIA HAYATI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ellya Sinurat
NPM : 0906573326
Tanda Tangan : ... 
Tanggal : 14 Juli 2011

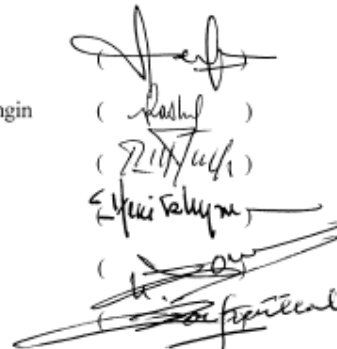
HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Ellya Sinurat
NPM : 0906573326
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul Tesis : Isolasi dan karakterisasi serta uji aktivitas fukoidan
sebagai antikoagulan dari rumput laut coklat
Sargassum crassifolium

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Endang Saepudin
Pembimbing : Prof. Dr. Rosmawaty Peranginangin
Penguji : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS
Penguji : Dr. Antonius Herry Cahyana
Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela
Penguji : Dr. Asep Saefumillah Ph.d



(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)

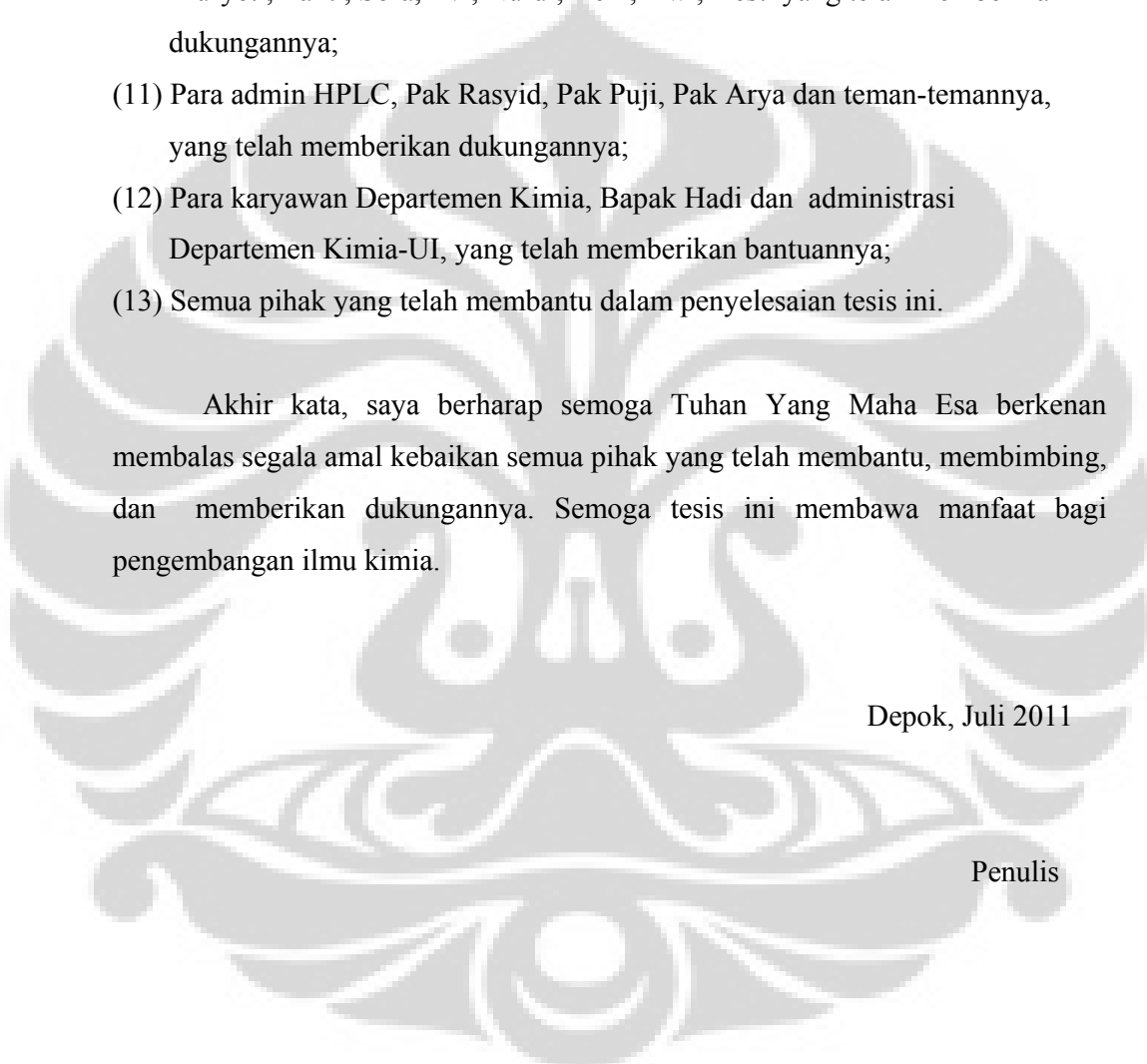
Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 14 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan hikmat dan kebijaksanaan serta karunia-Nya, sehingga tesis ini dapat penulis selesaikan. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Jurusan Ilmu Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Dalam proses penelitian dan penyusunan tesis ini, penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

- (1) Dr.Endang Saepudin selaku dosen pembimbing tesis dan pembimbing akademis yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan, membimbing penulis dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini;
- (2) Prof. Dr. Rosmawaty Peranginangin selaku pembimbing sekaligus pemimpin proyek penelitian yang sudah berupaya untuk mengalokasikan dana untuk penelitian ini serta memberikan tenaga dan pikirannya dalam membimbing penulis dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini;
- (3) Prof. Sumi Hudyono PWS selaku pembimbing akademik, yang mengarahkan penulis dalam pengambilan mata kuliah;
- (4) Prof.Dr.Rahayu, kepala laboratorium patologi klinik Fakultas kedokteran Universitas Indonesia, yang memberikan arahan dan bimbingan dalam penelitian ;
- (5) Para Dosen Departemen Kimia yang memberi masukan dan pengarahan dalam rangka penyempurnaan tesis ini;
- (6) Prof. Dr. Hari Eko Irianto, Kepala BBRP2B yang memberikan saya kesempatan ijin belajar dari kantor;
- (7) Bu Murdinah dan kelompok peneliti rumput laut BBRP2B serta para teknisi di Laboratorium Kimia, pelayanan teknis dan instrument BBRP2B;

- 
- (8) Suami dan anak-anak tercinta yang telah memberikan kesempatan, dukungan materiil dan spiritual selama masa perkuliahan dan penyelesaian tesis ini;
 - (9) Orang tua saya yang telah rela menjaga dan mengasuh anak-anak saya selama kuliah dan memberikan dukungan semangat dan doa;
 - (10) Teman-teman seperjuangan, para mahasiswa S2 angkatan 2009, terutama bu Muryeti, Tanti, Sofa, Evi, Nurul, Deni, Dwi, Desti yang telah memberikan dukungannya;
 - (11) Para admin HPLC, Pak Rasyid, Pak Puji, Pak Arya dan teman-temannya, yang telah memberikan dukungannya;
 - (12) Para karyawan Departemen Kimia, Bapak Hadi dan administrasi Departemen Kimia-UI, yang telah memberikan bantuannya;
 - (13) Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian tesis ini.

Akhir kata, saya berharap semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala amal kebaikan semua pihak yang telah membantu, membimbing, dan memberikan dukungannya. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu kimia.

Depok, Juli 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

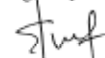
Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ellya Sinurat
NPM : 0906573326
Program Studi : Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : MIPA
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul : Isolasi dan karakterisasi serta uji aktivitas fukoidan sebagai antikoagulan dari rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : Juli 2011
Yang menyatakan



(Ellya Sinurat)

ABSTRAK

Nama : Ellya Sinurat
Program Studi : Ilmu Kimia
Judul : Isolasi dan karakterisasi serta uji aktivitas fukoidan sebagai antikoagulan dari rumput laut coklat *Sargassum crassifolium*

Fukoidan dikenal sebagai polisakarida sulfat dengan senyawa penyusun utama fukosa dan sulfat, dapat dimanfaatkan sebagai antikoagulan dalam proses pembekuan darah. Fukoidan umumnya diperoleh dari rumput laut coklat, namun penelitian mengenai fukoidan ini belum banyak dilakukan, khususnya di Indonesia, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengingat fukoidan mempunyai banyak bioaktivitas. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi fukoidan yang ada dalam rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* serta uji aktivitasnya sebagai antikoagulan. Metode isolasi fukoidan dilakukan dengan ekstraksi asam lemah dan diendapkan dengan etanol. Untuk memisahkan fukoidan dengan alginat ditambahkan CaCl_2 . Ekstrak fukoidan dimurnikan dengan resin penukar anion Sephadex A-25 dan eluen NaCl. Fukoidan dikarakterisasi dengan FT-IR, penentuan berat molekul, penentuan sulfat, analisa unsur dan monosakarida penyusun fukoidan serta uji aktivitasnya sebagai antikoagulan. Berdasarkan pemisahan kolom diperoleh 5 fraksi, dengan rendemen tertinggi pada fraksi kedua. Hasil total rendemen fukoidan diperoleh 1,46% dari berat awal tepung rumput laut, terdapat gugus sulfat pada bilangan gelombang 820 cm^{-1} , berat molekul $(5,8 - 7,71) \times 10^4$ Dalton, analisa komposisi unsur (C 22%; H 4,4 %; N 0,18%; S 0,78%), monosakarida penyusun fukoidan yang ditemukan fukosa dan galaktosa dengan rasio mol 1: 1,5. Hasil uji aktivitas fukoidan yang diperoleh dilihat dari perpanjangan nilai APTT nya mempunyai perbedaan signifikan antara kontrol dengan darah yang mengandung fukoidan pada konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$ (berbeda 25 detik), hal ini menunjukkan bahwa fukoidan berpotensi sebagai antikoagulan.

Kata Kunci : fukoidan, rumput laut coklat, L- fukosa, antikoagulan.
xiv+58 halaman: 24 gambar; 9 tabel; 11 lampiran
Daftar Pustaka : 47 (1918-2010)

ABSTRACT

Name : Ellya Sinurat
Program Study : Chemistry
Title : Isolation, Characterisation and Activity Test
of Fucoidan as Anticoagulant from Brown Seaweed *Sargassum crassifolium*

Fucoidan is group of marine sulfated polysaccharides containing large proportions of L-fucose and sulfate, can be used as an anticoagulant on blood coagulation. Fucoidans from brown seaweed in Indonesia has not received much attention, this research was conducted to isolate and characterize fucoidan in brown algae, *Sargassum crassifolium*., and also to test its activity as anticoagulant. Method used to isolate the fucoidan was extraction by weak acid which followed by precipitation in ethanol. To separate the fucoidan and alginate, CaCl₂ was used. Extract containing fucoidan was purified using anion – exchange chromatography Sephadex A-25 and eluent NaCl. Fucoidan was characterized using FT – IR, molecular weight determination, sulphate determination, organic compounds and monosaccharide of composition, and activity test as anticoagulant. Based on column chromatography, 5 fractions were obtained with the highest yield at second fraction. Total yield of fucoidan was 1.46% (w/w), sulphate group was found on 820 cm⁻¹ wave number, molecular weight (5.8 – 7.71) x 10⁴ Dalton, elemental analysis (C 22%; H 4.4%; N O, 18%; S O, 78%). The fucoidan was composed of fucose and galactose with an approximately ratio of 1.0 : 1.5. Based on APTT test, there is significant difference between activities of controlled fucoidan and treated at concentration 100 µg/mL. Therefore this fucoidan has potential candidate for an anticoagulant as alternative to heparin

Key Words : fucoidan, brown seaweed, L-fucose, anticoagulant
xiv+58 pages ; 24 pictures; 9 tables; 11 attachments
Bibliography : 47 (1918-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	iv
ABSTRAK	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Hipotesis Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Polisakarida sulfat.....	5
2.1.1. Heparin	5
2.1.2. Dekstran Sulfat	5
2.1.3. Laminaran.....	6
2.1.4. Fukoidan	6
2.2. Sumber Fukoidan	7
2.2.1. Kandungan Kimia Rumput Laut Coklat dan Aktivasnya	7
2.2.2. Jenis – Jenis Rumput Laut Coklat Penghasil Fukoidan ...	8
2.3. Metode Isolasi dan Struktur Fukoidan	10
2.4. Bioaktivitas Fukoidan sebagai Antikoagulan	15
2.4.1. Antikoagulan	15
2.4.2. Sistem Pembekuan Darah.....	16

2.4.3. Potensi Fukoidan sebagai Antikoagulan	18
2.5. Metode Analisa untuk Fukoidan	22
2.5.1. Kromatografi Permeasi Gel atau Filtrasi Gel	22
2.5.2. Spektrofotometer Infra Merah	24
3. METODOLOGI PENELITIAN	26
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.2. Peralatan Penelitian	26
3.3. Bahan Penelitian	26
3.4. Prosedur kerja	27
3.4.1. Isolasi fukoidan	27
3.4.2. Pemurnian ekstrak fukoidan	27
3.4.3. Karakterisasi fukoidan	28
3.4.3.1. Penentuan total karbohidrat	28
3.4.3.2. Penentuan Berat Molekul	28
3.4.3.3. Analisa FT-IR.....	28
3.4.3.4. Penentuan sulfat	29
3.4.3.5. Penentuan kadar protein	29
3.4.3.6. Hidrolisis fukoidan	29
3.4.4. Uji aktivitas sebagai antikoagulan	31
3.5. Diagram kerja	32
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1. Isolasi fukoidan	35
4.2. Karakterisasi Fukoidan	37
4.2.1. Total Karbohidrat	38
4.2.2. Penentuan estimasi berat molekul	39
4.2.3. Analisis FT-IR fukoidan	41
4.2.4. Analisis uji sulfat	43
4.2.5. Analisis protein	43
4.2.6. Analisis unsur organik (C, H, N, S)	44
4.2.7. Hidrolisis fukoidan	45
4.3. Bioaktivitas fukoidan sebagai antikoagulan	47

5. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1. Kesimpulan	53
5.2. Saran	53
6. DAFTAR PUSTAKA	54



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Struktur Heparin	5
Gambar 2.2. Struktur Garam Natrium Dekstran.....	6
Gambar 2.3. Struktur Laminaran sulfat.....	6
Gambar 2.4. Struktur Alginat.....	8
Gambar 2.5. Rumpun laut penghasil fukoidan	9
Gambar 2.6. Rumpun Laut Coklat <i>Sargassum crassifolium</i> di Indonesia...	10
Gambar 2.7. Fukoidan dari Rumpun Laut coklat.....	11
Gambar 2.8. Fukoidan (rantai bercabang) dari rumput laut.....	12
Gambar 2.8. Fukoidan (gugus samping berbeda) dari rumput laut.....	13
Gambar 2.9. Fukoidan dari Timun laut.....	13
Gambar 2.10. Jalur Pembekuan Darah	17
Gambar 2.11. Mekanisme kerja kromatografi permeasi gel.....	23
Gambar 4.1. Profil fukoidan yang dimurnikan	35
Gambar 4.2. Hasil fraksinasi dari kolom kromatografi.....	36
Gambar 4.3. Produk fukoidan yang sudah diliofilisasi	36
Gambar 4.4. Produk fukoidan fraksi kedua.....	37
Gambar 4.5. Kromatogram fukoidan fraksi kedua.....	40
Gambar 4.6. Kromatogram fukoidan komersil.....	40
Gambar 4.7. Spektrum hasil analisis FT-IR fraksi kedua	42
Gambar 4.8. Kromatogram analisa unsur organik (C,H,N,S) fukoidan.....	45
Gambar 4.9. Hasil hidrolisis fukoidan yang dimurnikan.....	46
Gambar 4.10. Hasil hidrolisis fukoidan komersil	47
Gambar 4.11. Nilai APTT dari variasi inkubasi fukoidan dalam menit.....	48
Gambar 4.12. Nilai APTT dari variasi inkubasi fukoidan dalam jam.....	49

Gambar 4.13. Perbandingan aktivitas antikoagulan.....	50
---	----

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Komposisi fukoidan dari beberapa spesies.....	14
Tabel 2.2. Nomenklatur faktor pembekuan darah.....	18
Tabel 4.1. Hasil rendemen fukoidan dari masing-masing fraksi melalui penambahan eluen NaCl	37
Tabel 4.2. Hasil analisis total karbohidrat dari masing-masing fraksi....	38
Tabel 4.3. Hasil analisis estimasi berat molekul dari 5 fraksi fukoidan..	39
Tabel 4.4. Hasil intensitas absorbansi infra merah fukoidan.....	41
Tabel 4.5. Hasil analisis ester sulfat dari fukoidan	43
Tabel 4.6. Hasil analisis protein dari fukoidan	44
Tabel 4.7. Hasil uji antikoagulan fukoidan pada berbagai konsentrasi...	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Kurva kalibrasi Standar Fukosa	59
Lampiran 2. Profil Kromatogram Penentuan Berat Molekul.....	60
Lampiran 3. Spektrum masing-masing fraksi dari analisis FT-IR.....	66
Lampiran 4. Penentuan Kadar Sulfat menggunakan Turbidimeter.....	69
Lampiran 5. Penentuan Kadar Protein menggunakan Uji Lowry – Folin..	67
Lampiran 6. Kromatogram dari Analisis Unsur Organik (C, H, N, S).....	71
Lampiran 7. Kromatogram larutan standar monosakarida.....	72
Lampiran 8. Kromatogram variasi larutan standar fukosa.....	74
Lampiran 9. Kromatogram gabungan standar monosakarida	77
Lampiran 10. Rangkuman hasil analisis dari masing-masing fraksi.....	78
Lampiran 11. Hasil Uji Statistik Antikoagulan.....	79

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia adalah sumber penghasil rumput laut terbesar di dunia saat ini (sejak 2010), dimana sebelumnya adalah Filipina. Produksi rumput laut dari Indonesia pada tahun 2010 sebesar 3,082 juta ton. Jenis rumput laut yang memiliki nilai ekonomis tinggi yang berasal dari Indonesia antara lain : *E.cottonii*, *Gracilaria*, *Sargassum* dan lain-lain. Khususnya rumput laut coklat sampai saat ini masih belum dioptimalkan penggunaannya, bila dibandingkan jenis rumput laut lain seperti: *E.cottonii* dan *Gracilaria*. Di daerah perairan laut selatan Jawa (seperti Banten) sangat banyak ditemukan rumput laut coklat yang berasal dari alam terbuang di pinggiran pantai. Kalaupun ada nelayan yang mengumpulkannya, dijual dengan harga rendah. Namun jika rumput laut tersebut diolah dengan cara mengekstrak senyawa essensial yang terdapat didalamnya maka akan mendapat nilai tambah ekonomis bagi masyarakat pesisir.

Rumput laut coklat (*Phaeophyceae*) adalah salah satu famili penghasil fukoidan sulfat. Fukoidan adalah polisakarida yang mengandung persentase substansional dari L-fukosa dan golongan ester sulfat (Duarte *et al*, 2001). Fukoidan ditemukan terutama pada spesies rumput laut coklat , mozuku, limu dan wakame namun ditemukan juga pada binatang laut seperti timun laut. Fukoidan pertama kali ditemukan oleh Kylin pada tahun 1913 dari rumput laut coklat yang sekarang juga dikenal dengan fukan sulfat atau fukosan. Secara umum fukoidan terdiri dari fukosa, galaktosa dan sejumlah polisakarida lain seperti manosa, xilosa, asam glukoronat. Komponen utama fukoidan adalah fukosa dan sulfat. Fukoidan yang sudah diteliti dari rumput laut coklat memiliki struktur sangat kompleks dan bervariasi dari tiap spesies. Perbedaan utama dari struktur fukoidan yang mendasar adalah proses biosintesis yang berbeda dari fukoidan tersebut. Kelemahan dari hasil-hasil penelitian sebelumnya adalah tidak jelasnya struktur fukoidan yang diperoleh, komponen minor (seperti pentosa, heksosa, asam uronat, protein) dan posisi sulfat yang dimiliki dari bentuk ulangan oligosakarida. Struktur dari bentuk ulangan unit oligosakarida tersebut dapat ditentukan dengan

menggunakan alat spektroskopi NMR resolusi tinggi. Struktur fukoidan dari alga lebih kompleks bila dibandingkan dengan fukoidan dari invertebrata. Polisakarida alga umumnya heterogen dan bercabang, biasanya informasi yang diperoleh hanya sebagian dari struktur hasil analisa spektroskopi NMR. Hasil penelitian menyebutkan bahwa bentuk fukoidan terdiri dari dua ikatan fukosa ester sulfat yaitu 95% (F-fukoidan) dan 5% U-fukoidan, diperkirakan bahwa 20 % dari senyawa tersebut adalah asam glukoronat. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa produk nutrisi yang mengandung U-fukoidan dan F-fukoidan konsentrasi tinggi dapat dijadikan menjadi suplemen makanan (Bo li, 2008).

Perbandingan fukosa dan galaktosa yang dihasilkan berbeda-beda dari masing-masing spesies rumput laut coklat, bergantung jenis spesiesnya. Jenis *Macrocystis pyrifera* mengandung fukosa dan galaktosa dengan perbandingan 18 :1. Sedangkan hasil ekstrak fukoidan dari jenis rumput laut coklat *Hizikia fusiformis* mengandung fukosa dan galaktosa (7:3).

Beberapa hasil penelitian yang sudah dilakukan untuk isolasi fukoidan dari beberapa sumber bahan baku rumput laut coklat antara lain *Blades of Lessonia vadosa (Phaeophyta)* dengan cara ekstraksi menggunakan larutan CaCl_2 2% diperoleh rendemen 4,4% polisakarida yang mengandung fukosa dan sulfat dengan perbandingan molar 1.0 : 1.12. Depolimerisasi fukoidan murni dengan H_2O_2 dalam Cu asetat menghasilkan rendemen 5,8% dengan kandungan sulfat 33,7%. Fukoidan murni (MW 320.000) menunjukkan aktivitas antikoagulan yang sangat baik, sedangkan (MW 32.000) menunjukkan antikoagulan yang rendah (Chandia *et al*, 2007).

Hasil penelitian Shiroma (2008) menunjukkan hasil isolasi fukoidan menghasilkan rendemen polisakarida sebesar 0,4% (w/w) dari berat basah dengan total karbohidrat (66,5%), asam uronat (13,7 %), abu (30,8 %) dan sulfat (26,3 %). Sesudah polisakarida dihidrolisis dengan katalis asam dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi diperoleh monomer L-fukosa, D-galaktosa, D-glukosa, D-mannosa, D-xylosa dan D-asam glukuronat. Perbandingan molar komponen polisakarida dan sulfat tersebut yaitu : L-Fuc:D-Gal:D-Glc:D-Man:DXyl:DGlcA:H₂SO₄=5:1:1:0.5:0.5:2:7. Massa molekul polisakarida diperkirakan sebesar $4,3 \times 10^4$ dengan menggunakan kromatografi gel permeasi.

Hasil ekstraksi alga dari spesies *Cladosiphon okamuranus* famili *Phaeophyceae* menghasilkan rendemen fukoidan sebesar 2% dari berat basah yang mengandung L-fukosa dan sulfat (Sakai, 2003).

Pada dekade sebelumnya telah ditemukan bioaktivitas dari fukoidan sebagai anti virus (Snoeck, 1988), antithrombin (Frank, 1989) antikoagulan (Nishino, 1996) dan sebagai anti tumor dari jenis rumput laut *Eisenia bicyclis* dan *L. japonica*. Fukoidan ini banyak digunakan karena sedikit mempunyai efek samping. Heparin adalah obat antikoagulan yang sudah umum digunakan secara medis. Namun baru-baru ini hasil penelitian menunjukkan bahwa pemakaian terapi heparin dalam jangka panjang mengakibatkan efek buruk. Salah satu efek pemakaian heparin adalah penurunan jumlah trombosit, trombositopenia, osteoporosis, kerusakan pada sumsum tulang belakang. Oleh karena itu dicari sumber alternatif lain sebagai antikoagulan alami pengganti heparin. Telah diperoleh bahwa ekstrak polisakarida dari rumput laut ditemukan lebih baik dan obat yang aman dengan sedikit atau tidak mempunyai efek samping (Athukorala, 2006). Mengingat banyaknya potensi bioaktivitas fukoidan sehingga fukoidan banyak diteliti dari berbagai sumber penghasil fukoidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan karakterisasi fukoidan dari rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* dan di uji aktivitasnya sebagai antikoagulan.

1.2. Rumusan Masalah

Bukti-bukti telah menunjukkan bahwa fukoidan mempunyai bioaktivitas yang tinggi terutama sebagai antikoagulan yang bersumber dari rumput laut coklat. Di Indonesia ditemukan banyak rumput laut coklat dimana jenisnya berbeda dengan jenis rumput laut coklat yang ada di luar negeri (Jepang dan Korea). Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi fukoidan dari rumput laut coklat *Sargassum crassifolium*. Hasil isolasi akan dikarakterisasi dan dilanjutkan uji aktivitasnya secara *in vitro* terhadap plasma darah manusia untuk mengetahui aktivitasnya sebagai antikoagulan.

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi fukoidan yang ada di dalam rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* serta pengujian aktivitasnya sebagai antikoagulan secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk meningkatkan nilai tambah rumput laut coklat, mendapatkan teknik ekstraksi fukoidan dari rumput laut coklat dan memberikan informasi bioaktivitas fukoidan sebagai antikoagulan. Jika mempunyai bioaktivitas sebagai antikoagulan, maka informasi ini akan dijadikan sebagai informasi awal bahwa fukoidan dapat berpotensi menjadi bahan obat antikoagulan.

1.5. Hipotesa Penelitian

Rumput laut coklat mengandung fukoidan dan mempunyai aktivitas sebagai antikoagulan. Fukoidan yang diperoleh dari rumput laut coklat memiliki satu atau lebih jenis monosakarida.

BAB II

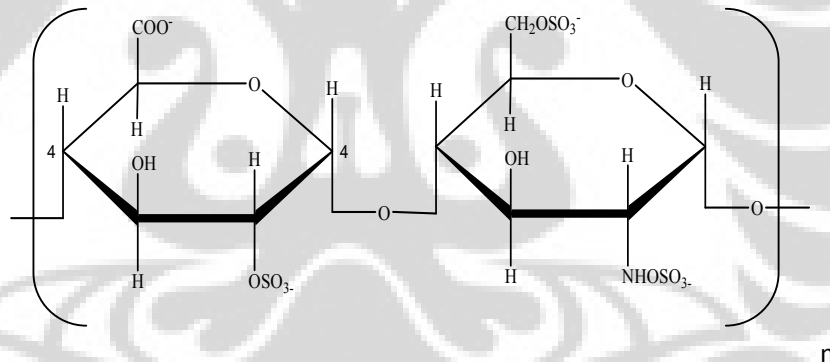
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Polisakarida sulfat

Fukoidan merupakan polisakarida sulfat yang terdapat pada dinding sel mengandung beberapa jenis monosakarida. Beberapa jenis polisakarida sulfat yang sering diteliti dan diketahui mempunyai struktur dan karakteristik menyerupai fukoidan, antara lain : heparin, dekstran sulfat, dan laminaran.

2.1.1. Heparin

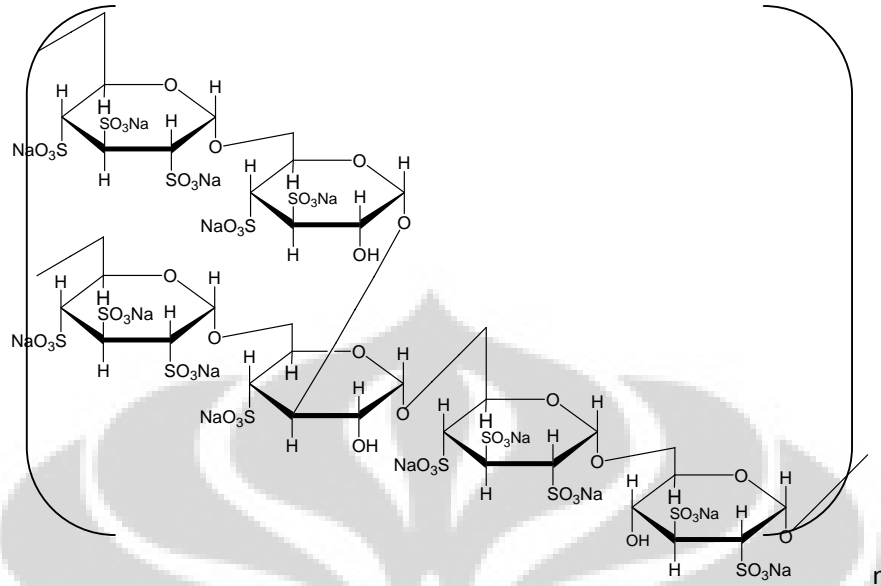
Senyawa heparin terdiri dari D-fukan glukosamin dan asam uronat, memiliki berat molekul disekitar 4-40 kDa dan mempunyai ikatan glikosida pada posisi α di C-1 dan C-4. Di antara jenis polisakarida sulfat tersebut, fukoidan merupakan jenis polisakarida yang menyerupai struktur dan fungsi heparin (Shanmugam and Mody, 2000).



Gambar 2.1. Struktur heparin (Voet, 2004)

2.1.2. Dekstran Sulfat

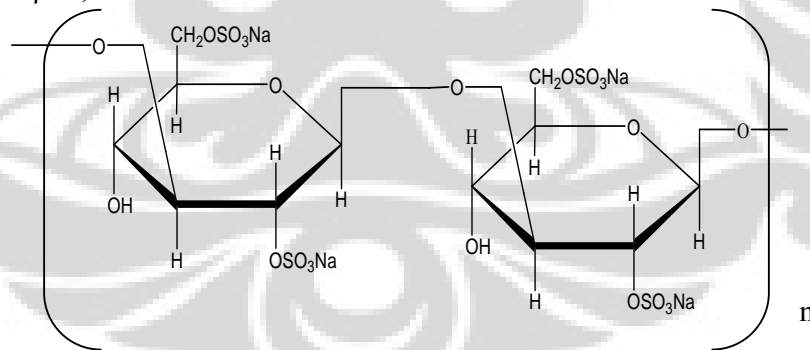
Dekstran sulfat juga sering digunakan sebagai standar dalam menentukan berat molekul polisakarida termasuk berat molekul fukoidan. Dekstran sulfat merupakan polimer glukosa sulfat yang berikatan melalui ikatan glikosida pada posisi α -1,3 dan α -1,6. Kandungan sulfatnya sekitar 17% dimana ekuivalen dengan setiap residu glukosil mempunyai gugus 2,3 disulfat.



Gambar 2.2. Struktur garam natrium dekstran sulfat dari spesies *Leuconostoc sp*

2.1.3. Laminaran

Laminaran adalah jenis polisakarida sulfat yang sering ditemukan dalam satu spesies dengan fukoidan, hanya bisa dibedakan dengan menggunakan pelarut. Laminaran mempunyai dimer dari 2 unit glukosa, terikat melalui ikatan glikosida pada posisi β -1,3.



Gambar 2.3. Struktur *Laminaran sulfat*

2.1.4. Fukoidan

Fukoidan merupakan polisakarida sulfat yang terdapat pada dinding sel mengandung beberapa jenis monosakarida. Komponen utama fukoidan adalah α -L-fukosa dan sulfat. Selain itu terdapat beberapa komponen monosakarida lainnya yaitu galaktosa, mannosa, xilosa, asam uronat dan gugus asetil.

Isolasi fukoidan pertama kali ditemukan oleh Kylin pada tahun 1913. Namun struktur fukoidan dan aplikasinya dijelaskan lebih dalam lagi oleh seorang ahli kimia Elisabeth Percival tahun 1960. Kemudian struktur fukoidan dikaji ulang secara luas dan dipublikasikan oleh Berteau dan Mulloy (2003). Nama fukoidan yang dibenarkan dengan aturan IUPAC disebut fukan, fukosan atau fukan sulfat. Struktur fukoidan bervariasi cukup signifikan antar spesies, bergantung pada : iklim setempat, faktor lingkungan, metode ekstraksi dan pemurnian (Franck, 2004). Hasil penelitian yang sudah dikomersilkan produknya yaitu dari spesies *Fucus vesiculosus*. Komposisi kimia fukoidan dari *Fucus vesiculosus* relatif sederhana yaitu homofukan, tetapi kebanyakan fukoidan mempunyai komposisi kimia heterofukan yaitu tidak hanya memiliki fukosa, juga memiliki galaktosa, glukosa, xilosa (Li Bo, 2008).

2.2. Sumber Fukoidan

Fukoidan dapat ditemukan pada berbagai jenis makhluk hidup yang ada di laut. Makhluk hidup laut tersebut antara lain, timun laut (Ribeiro *et al.*, 1994) dan rumput laut coklat (Descamps *et al.*, 2006). Kandungan fukoidan dari timun laut sangat sederhana hanya terdiri dari fukosa dan golongan sulfat. Sedangkan fukoidan dari rumput laut coklat memiliki komposisi polisakarida lebih kompleks.

2.2.1. Kandungan Kimia Rumput Laut Coklat dan Aktivitasnya

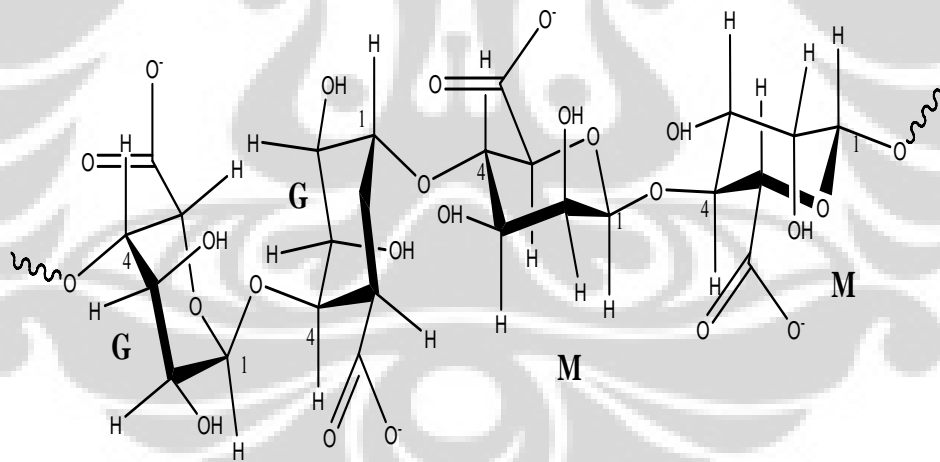
Komposisi kimia yang terdapat pada rumput laut coklat sebagai hasil fotosintesis, jumlahnya sangat bervariasi, karena tergantung pada jenis, masa perkembangan dan kondisi tempat tumbuhnya. Setiap jenis rumput laut mempunyai pigmen khlorofil a dan β - karoten, serta pigmen khasnya. Pada rumput laut coklat terdapat pigmen santofil, violasantin, fukosantin, flavosantin, neosantin A dan B. Keberadaan pigmen fukosantin yang dominan pada rumput laut coklat dapat menutupi pigmen lainnya sehingga memberikan warna coklat (Yunizal, 2004).

Dinding sel rumput laut coklat mengandung jumlah polisakarida yang berbeda yaitu antara lain asam alginat (alginat), laminaran (laminarin), dan fukoidan (fukan sulfat). Senyawa kimia yang paling banyak dalam rumput laut

coklat adalah alginat (40%), sedangkan senyawa lain dalam jumlah kecil diantaranya fukoidan, laminaran, selulosa, manitol dan senyawa bioaktif lainnya. Selain itu rumput laut coklat juga mengandung protein, lemak, serat kasar, vitamin serta mineral. Alginat pada rumput laut coklat adalah dalam bentuk asam. Di dalam jaringan thallus/daun, asam alginat mengisi ruangan antar sel sehingga memperkokoh saluran jaringan tersebut (Bilan, 2006; Yunizal, 2004).

Asam alginat pada industri digunakan sebagai pengental, pengemulsi dan penstabil, pengikat, bahan pembentuk gel pada makanan, kosmetik, tekstil, farmasi dan biomedis. Asam alginat adalah molekul polisakarida linear yang dibentuk oleh β -D manuronat dan α -L- asam glukoronat.

Molekul asam alginat berbentuk polimer linier tak bercabang dan disusun oleh kurang lebih 700-1000 residu asam β -D- manuronat (M) dan α -L- guluronat (G). Asam D-manuronat memiliki ikatan diekuatorial di C-4 dan C-1 sedangkan asam guluronat memiliki ikatan diaksial di C₁ dan C₄. Rantai yang terdiri atas 3 segmen polimer yang berbeda terlihat pada Gambar 2.4, yaitu: -G-G-, -G-M- dan -M-M-



Gambar 2.4. Struktur alginat

2.2.2. Jenis – Jenis Rumput Laut Coklat Penghasil Fukoidan

Beberapa spesies rumput laut yang sudah diteliti kandungannya sebagai penghasil fukoidan antara lain : *Fucus vesiculosus* (Beress *et al.*, 1993;; Wu *et al.*, 2002), *Sargassum stenophyllum* (Duarte *et al.*, 2001), *Chorda filum* (Bakunina *et al.*, 2002), *Ascophyllum nodosum* (Medcalf and Larsen, 1977), *Kjellmaniella*

crassifolia (Sakai *et al.*, 2002), *Cladosiphon okamuranus* (Sakai *et al.*, 2003b), *Dictyota menstrualis* (Albuquerque *et al.*, 2004), *Padina gymnospora* (Usov *et al.*, 2004), *Fucus distichus* (Bilan *et al.*, 2004), *Fucus serratus* (Bilan *et al.*, 2006), *Hizikia fusiforme* (Shiroma *et al.*, 2008).

Setiap spesies rumput laut menghasilkan kandungan monosakarida yang berbeda-beda. Namun sampai saat ini jenis rumput laut penghasil fukoidan yang sudah dikomersilkan hanya dari satu jenis yaitu *Fucus vesiculosus*. Beberapa sumber penghasil fukoidan dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5. Rumput laut penghasil fukoidan. 1: *Fucus vesiculosus*, 2: *Laminaria digitata*, 3: *Fucus evanescens*, 4: *Fucus serratus*, 5: *Ascophyllum nodosum*, 6: *Pelvetia canaliculata*, 7: *Cladosiphon okamuranus*, 8: *Hizikia fusiforme*, 9: *Laminaria japonica*, 10: *Sargassum horneri*, 11: *Nemacystus decipiens*, 12: *Padina gymnospora*, 13: *Stichopus japonicus* (<http://vietritosca.blogspot.com/>)

Di Indonesia jenis rumput laut coklat yang banyak dijumpai adalah jenis *Sargassum crassifolium*. Rumput laut ini mempunyai *thallus* bercabang seperti jari, dan merupakan tanaman yang berwarna coklat, berukuran relatif besar,

tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat. Bagian atas tanaman menyerupai semak yang berbentuk simetris bilateral atau radial serta dilengkapi dengan bagian-bagian untuk pertumbuhan (Atmadja, 1996) dalam Yunizal, (2004).

Rumput laut coklat hidup melekat pada batu atau bongkahan karang dan dapat terlepas dari substratnya karena ombak besar dan hanyut ke permukaan laut atau terdampar di atas permukaan pantai. Rumput laut coklat, warnanya bermacam-macam mulai dari coklat muda sampai coklat tua. Rumput laut yang termasuk marga *Sargassum* kelihatannya tidak banyak bedanya dari warna daun, bentuk cabang, dan ukurannya.



Gambar 2.6. Rumput Laut Coklat *Sargassum crassifolium* di Indonesia

Rumput laut coklat (*Phaeophyceae*) mempunyai lebih dari 1000 spesies yang sudah diidentifikasi. Beberapa spesies rumput laut coklat diperoleh dari populasi tumbuhan yang hidup di alam dan sebagian sudah di budidaya.

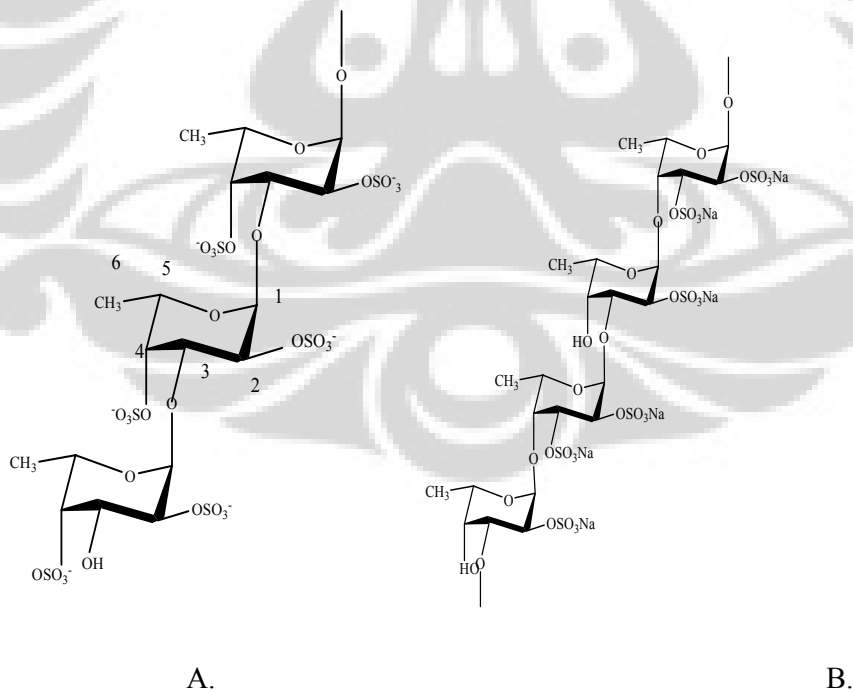
Klassifikasi rumput laut coklat dari *Sargassum crassifolium* yaitu :

- Divisi : Phaeophyta
- Kelas : Phaeophyceae
- Ordo : Fucales
- Famili : Sargassaceae
- Genus : *Sargassum*
- Spesies : *Sargassum crassifolium*

2.3. Metode Isolasi dan Struktur Fukoidan

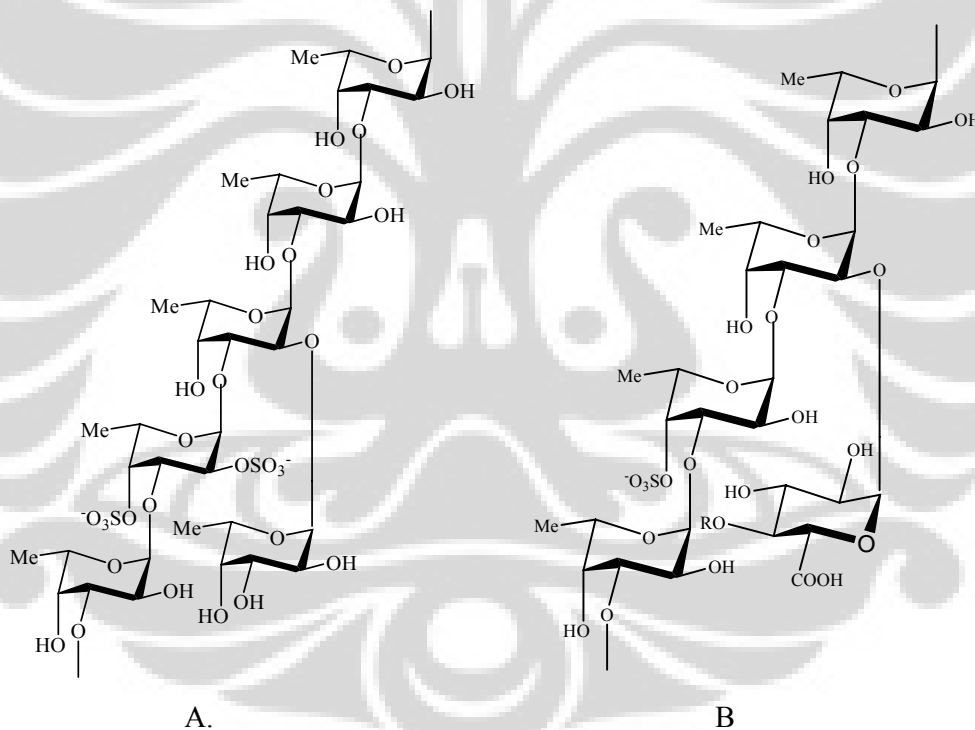
Beberapa hasil penelitian tentang isolasi fukoidan dari rumput laut coklat yang sudah dipublikasikan antara lain : fukoidan dari rumput laut coklat *Sargassum stenopyllum* dengan cara mengendapkan fukoidan menggunakan CaCl_2 2 %, dari hasil isolasi tersebut diperoleh rendemen fukoidan 2,4% dari tepung rumput laut (Duarte, 2001). Fukoidan di isolasi dari rumput laut coklat jenis *Ecklonia cava* kaya akan sulfat (0,92 sulfat/total gula) dengan komposisi utama fukoidan terdiri dari fukosa dan galaktosa dalam jumlah kecil (Athukorala *et al*, 2006). Kim *et al* (2007) memperoleh fukoidan dari rumput laut *Undaria pinnatifida Sporophyll* dengan rendemen 3,9% dari berat tepung melalui ekstraksi menggunakan asam, diendapkan dengan metanol dan pengendapan berikutnya dengan CaCl_2 2 %. Chandia dan Matsuhiro (2008) mengisolasi fukoidan *Lessonia vadosa* dengan cara mengesktraksinya menggunakan CaCl_2 2 %, dari hasil ekstraksi tersebut diperoleh rendemen 4,4% dari tepung rumput laut.

Struktur fukoidan yang sudah dipublikasikan dari beberapa spesies rumput laut coklat dapat dilihat pada Gambar 2.7 – 2.9.



Gambar 2.7. Fukoidan dari rumput laut coklat spesies : A. *F. distichus*. B. *Ascophyllum nodosum*

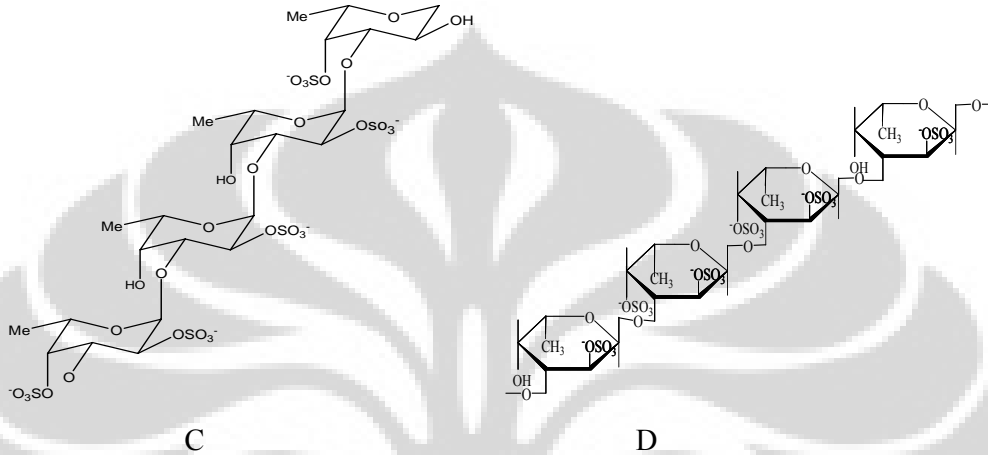
Conchie dan O'Neill (1954) mengungkapkan unit utama fukoidan terdiri dari unit α -(1,2)-fukosa dan sebagian besar gugus sulfat terikat pada posisi C-4 pada unit fukosa, penentuan struktur ini diperoleh melalui proses metilasi dan perlakuan alkali. Anno *et al* (1966) mengisolasi fukoidan dengan komposisi L-fukosa dengan sulfat terikat pada C-4, berdasarkan spektrum IR menunjukkan gugus sulfat tersubstitusi pada posisi C-4 aksial dari L-fukosapiranosida. Fukoidan dari beberapa spesies rumput laut coklat berbeda menurut spesiesnya. Pada tahun 1962 Schweiger mengisolasi polisakarida dari *Macrocytis pyrifera* dengan perbandingan fukosa dan galaktosa adalah 18:1, Schweiger pertama kali melaporkan bahwa fukoidan tidak hanya homopolimer tetapi heteropolimer dari fukosa, galaktosa dan sedikit xilosa (Li Bo, 2008).



Gambar 2.8. Fukoidan (rantai bercabang) dari rumput laut spesies : A. spesies *Chorda filum*. B. *Cladosiphon okamuranus*, dimana : R = H atau SO_3^- dimana H : SO_3^- = 2:3.

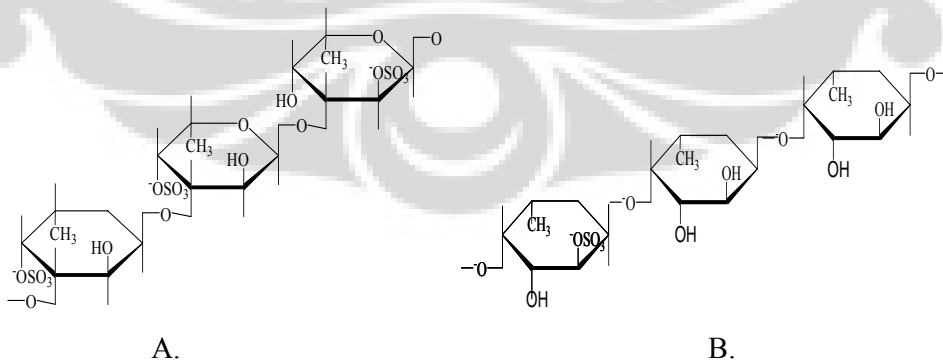
Fukoidan dari rumput laut (Gambar 2.8.A) adalah polimer linear, mempunyai ulangan unit tetrasakarida dalam empat residu yang berbeda, hanya pola spesifik dari sulfatasinya berada pada C-2 dan C-4. Struktur isolasi fukoidan dari rumput laut spesies *Chorda filum* menghasilkan komposisi yang sederhana

hanya mengandung fukosa, sulfat dan gugus asetil. Hasil interpretasi data NMRnya lengkap dengan turunannya dari hasil desulfatasi dan asetilasi. Pada spesies *Chorda filum* terdapat homofukan sulfat yang mengandung polimer fukopiranosida pada ikatan α -1,3 yang memiliki banyak cabang, kebanyakan cabang tersebut berupa satu unit monosakarida dengan ikatan α -1,2.



Gambar 2.8. Fukoidan (gugus samping berbeda) dari rumput laut spesies. C. *Strongylocentrotus pallidus*. D. *L- variegates*.

Fukoidan dari *Cladosiphon okamuranus*, mengandung kerangka persambungan di C-3, tetapi dengan rantai samping mengandung α -D-glukopiranosiluronat di posisi C-2 pada rantai utama, bagian makromolekul dari karbohidrat dapat dilihat pada Gambar 2.8.C. Fukoidan dari echinodermata umumnya memiliki kerangka linear dengan gugus sulfat yang berulang secara teratur dalam setiap satu unit oligosakarida (Usov dan Bilan (2009)).



Gambar 2.9. Fukoidan dari timun laut spesies : A. *L. grisea*. H. B. *lixula*

Metode ekstraksi yang berbeda dapat menghasilkan fukoidan yang berbeda. Ponce *et al* (2003) melaporkan bahwa rumput laut coklat *Adenocytis utricularis* diekstrak pada suhu ruang, menghasilkan fukoidan dengan komposisi utamanya fukosa, galaktosa dan ester sulfat (galaktofukan). Kemudian dari spesies rumput laut coklat yang sama, diekstrak pada suhu 70 °C, menghasilkan fukoidan dengan komposisi utamanya fukosa dan monosakarida lain (manosa, glukosa, xylosa, rhamnosa dan galaktosa) serta sejumlah asam uronat.

Beberapa struktur fukoidan yang sudah dipublikasikan secara umum perbedaannya berada pada pola spesifik sulfatasi, posisi persambungan glikosida dan konstituen monosakarida dari spesies yang berbeda. Beberapa komposisi kimia fukoidan dari beberapa spesies rumput laut coklat penghasil fukoidan seperti tercantum dalam Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Komposisi fukoidan dari beberapa spesies rumput laut

Rumput laut coklat	Komposisi kimia
<i>F. vesiculosus</i>	Fukosa, sulfat
<i>F. distichus</i>	Fukosa / sulfat / asetat (1/1.21/0.08)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	Fukosa (49%), xylosa(10%), GlcA(11%), sulfat
<i>Ecklonia kurome</i>	Fukosa, galaktosa, mannososa, xylosa, GlcA, sulfat
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Fukosa, galaktosa (18/1)
<i>Padina pavonia</i>	Fukosa, galaktosa, mannososa, xylosa, glukosa, sulfat
<i>F. serratus L</i>	Fukosa / sulfat / asetat (1/1/0.1)
<i>Sargassum stenophyllum</i>	Fukosa, galaktosa, mannososa, xylosa, glukosa, GlcA, sulfat
<i>Hizikia fusiforme</i>	Fukosa, galaktosa, mannososa, xylosa, GlcA, sulfat
<i>Lessonia vadosa</i>	Fukosa / sulfat (1/1.12)
<i>Undaria pinnatifida</i>	Fukosa / sulfat (1/1.1), sulfat
<i>Dictyota menstrualis</i>	Fukosa/ xylosa/asam uronat/galaktosa/sulfat (1/0.8/0.7/0.8/0.4)

Komposisi kimia dan struktur fukoidan dari rumput laut coklat adalah bervariasi dari spesies ke spesies. Komposisi fukoidan bergantung pada spesies, prosedur ekstraksi, musim panen dan kondisi iklim. Selanjutnya tiap fukoidan

memiliki keunikan dan bentuk struktur yang berbeda, masing-masing variasi struktur ini mempunyai potensi untuk digunakan sebagai obat baru (Silva, 2005).

Fukoidan lain dengan kandungan asam glukoronat yang tinggi ditemukan pada rumput laut coklat *Chordaria flagelliformis*. Hasil analisis monosakarida dari salah satu fraksi mengandung L-fukosa, asam glukoronat dan sedikit gugus sulfat (perbandingan molar 1:1:0,25). Selanjutnya untuk penentuan struktur polisakarida ini, telah dilakukan beberapa modifikasi kimia dari molekul ini melalui desulfatasi, reduksi golongan karboksi dan hidrolisis parsial. Fukoidan murni dan produk modifikasi dipelajari melalui hasil metilasi dengan menggunakan spektroskopi NMR 2D.

Posisi dan jumlah gugus sulfat sangat penting dalam bioaktivitas fukoidan. Metode dalam menentukan posisi sulfat dilakukan dengan spektroskopi infra merah, desulfatasi dan analisa sulfat menggunakan turbidimeter (Usov dan Bilan, 2009).

2.4. Bioaktivitas Fukoidan sebagai Antikoagulan

2.4.1. Antikoagulan

Antikoagulan adalah pencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat pembentukan atau menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah. Pemeriksaan waktu pembekuan darah yang umum dilakukan adalah dilihat dari nilai APTT (*activated partial thromboplastin time*), TT (*thrombin time*) dan PT (*prothrombin time*). Pemeriksaan APTT digunakan untuk menguji pembekuan darah melalui jalur intrinsik dan jalur bersama yaitu faktor pembekuan XII, prekalkren, kininogen, XI, IX, VII, X, V, protrombin dan fibrinogen. Prinsip pemeriksaan APTT adalah mengukur lamanya waktu yang dibutuhkan dalam detik untuk pembentukan fibrin bila ke dalam plasma ditambahkan reagens tromboplastin parsial dan aktivator serta ion kalsium pada suhu 37 °C. Reagen tromboplastin parsial adalah fosfolipid sebagai pengganti *platelet factor 3*. Bila hasil APTT memanjang menunjukkan terdapat inhibitor atau kekurangan faktor pembekuan (Shanmugam & Mody, 2000; Rahayu, 2009).

Senyawa-senyawa antikoagulan seperti : warfarin yang mengandung senyawa coumarin (dalam bentuk oral), heparin dalam bentuk injeksi, dermatan sulfat,

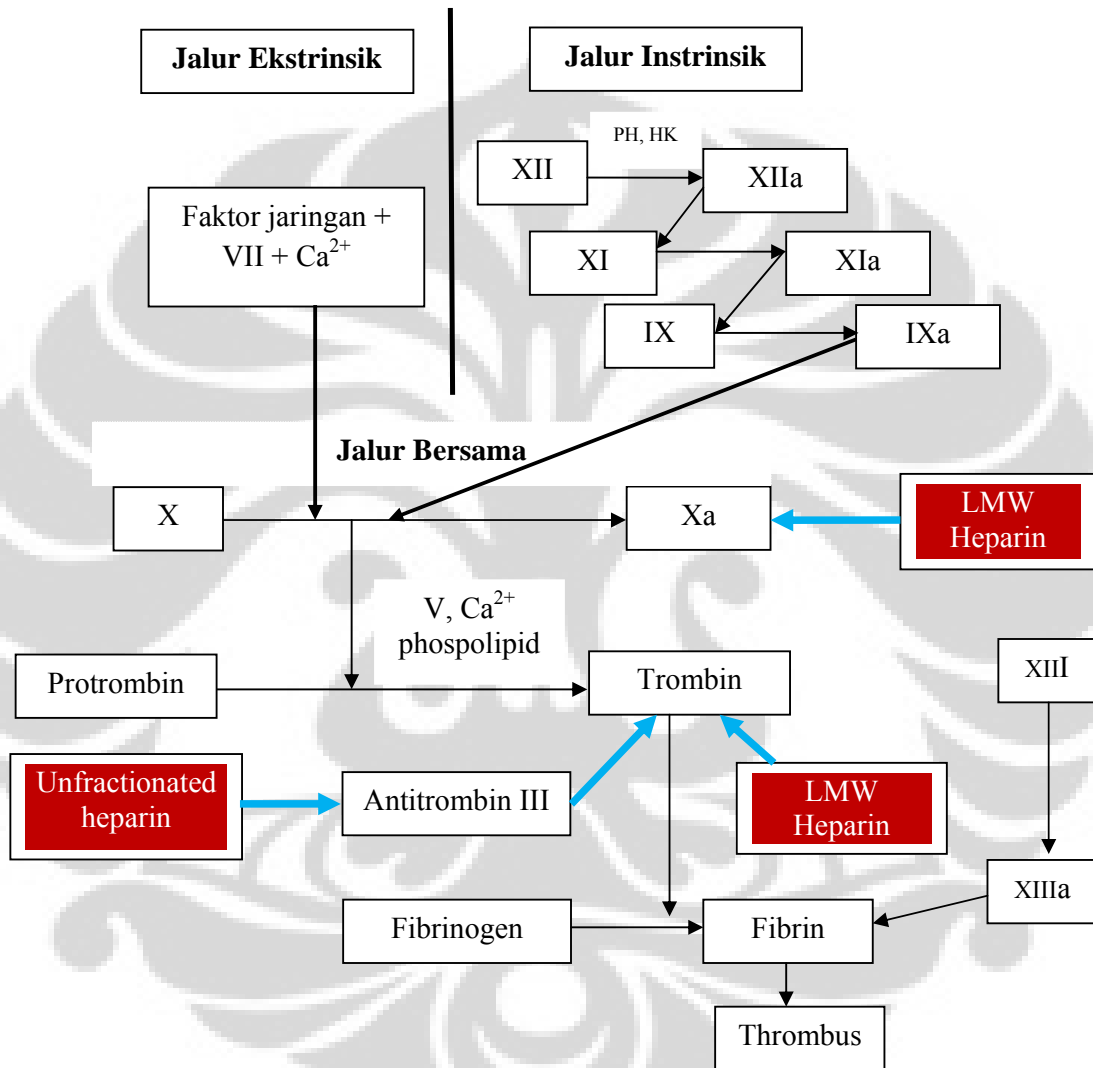
condroitin sulfat, dekstran sulfat, tetapi yang paling sering digunakan adalah warfarin dan heparin. Mekanisme kerja antikoagulan oral adalah menekan sintesa faktor pembekuan yang dipengaruhi oleh vitamin K yaitu prototrombin, VII, IX dan X. Menurut Deykin & Verstraete dalam Rahayu (2009) kerja utama obat antikoagulan menghambat kerja enzim epoksid reduktase sehingga perubahan epoksid vitamin K menjadi vitamin K terganggu. Mekanisme kerja heparin bekerja melalui interaksinya dengan antitrombin. Antitrombin secara alami ada di dalam darah yang berfungsi menginaktifkan thrombin dan Xa. Dengan reaksi yang agak lambat antitrombin menginaktifkan faktor-faktor XIIa, Xa, XIa, IXa. Ketika heparin berinteraksi dengan antitrombin akan mempercepat kerja antitrombin dalam menghambat atau menginaktifkan enzim-enzim koagulasi tersebut. Pengaruh heparin terhadap faktor VII sangat rendah karena aktivasi faktor VII memerlukan fosfolipid yang bermuatan negatif sedangkan heparin juga bermuatan negatif. Secara keseluruhan sifat antikoagulannya diperoleh melalui interaksi dengan antithrombin III (AT-III). Berdasarkan regulasi mayor penggumpalan darah, antitrombin dapat menghambat semua proteinase dari aliran penggumpalan termasuk thrombin dan FXa (Rahayu, 2009; Jung *et al*, 2007).

2.4.2. Sistem Pembekuan darah

Proses pembekuan darah terdiri dari rangkaian reaksi enzimatik yang melibatkan protein plasma yang disebut faktor pembekuan darah, fosfolipid dan ion kalsium. Untuk menerangkan proses pembekuan darah adalah teori *cascade* atau *waterfall* yang dikemukakan oleh Farlene, Davie dan Ratnoff. Menurut teori ini tiap faktor pembekuan darah diubah menjadi bentuk aktif oleh faktor sebelumnya dalam rangkaian reaksi enzimatik.

Proses pembekuan darah dimulai melalui dua jalur yaitu : jalur intrinsik dan jalur ekstrinsik (faktor jaringan). Jalur intrinsik diawali dengan adanya pembentukan pembekuan darah (thrombus) merah pada daerah aliran darah yang terhambat atau sebagai respons terhadap dinding pembuluh darah yang abnormal tanpa adanya jaringan yang melibatkan F.XII, F.XI, F.IX, F.VIII, HWMK, PK, *platelet factor 3* (PF.3). Sedangkan jalur ekstrinsik diawali adanya kerusakan jaringan (luka) sehingga terbentuk pembekuan (fibrin). Kedua jaringan ini akan

menyatu dalam *final common pathway* (jalur bersama) yang melibatkan aktivasi protrombin menjadi trombin dan proses pemecahan fibrinogen dengan katalis trombin untuk membentuk fibrin.



Gambar 2.10. Jalur pembekuan darah.
 (Murray *et al.*, 2003)

Jalur intrinsik, ekstrinsik dan jalur bersama banyak melibatkan bermacam-macam protein, yang dibagi ke dalam 4 tipe yaitu : (1) zimogen protease yang bergantung pada serin dan menjadi bentuk aktif pada proses koagulasi; (2)

kofaktor; (3) fibrinogen; (4) transglutaminase yang menstabilkan bekuan fibrin. Lebih jelas skema pembekuan darah dapat dilihat pada Gambar 2.10.

Faktor pembekuan darah dinyatakan dalam angka Romawi (lihat Tabel 2.2). Sistem penomoran angka pembekuan darah bukan merupakan urutan terjadinya proses pembentukan pembekuan darah, tetapi merupakan urutan penemuan faktor-faktor tersebut (Murray, 2003).

Tabel 2.2. Nomenklatur faktor pembekuan darah

Faktor	Nama
I	Fibrinogen
II	Prototrombin
III	Tromboplastin jaringan
IV	Ca ²⁺
V	Proakselerin
VI	-
VII	Proconvertin
VIII	Antihemophilic factor (AHF)
IX	Plasma Thromboplastin Component (PTC)
X	Stuart factor
XI	Plasma Thromboplastin Antecedent (PTA)
XII	Hagement factor
XIII	Fibrin Stabilizing factor (FSF)
-	High Moleculer Weight
-	Kininogen (HMWK)
-	Pre kalikrein (PK)

2.4.3. Potensi Fukoidan sebagai Antikoagulan

Fukoidan telah dilaporkan mempunyai bioaktivitas dan memiliki nilai potensial medis untuk digunakan sebagai antikoagulan. Antikoagulan secara luas digunakan untuk mencegah pembekuan darah selama dialisis, bedah, mencegah pembekuan pembuluh darah jantung, thrombosis pada jenis-jenis penyakit dan pengujian darah *in vitro* (Wang et al, 2010).

Aktivitas antikoagulan bekerja melalui kofaktor plasma spesifik yaitu antitrombin dan kofaktor heparin. Struktur spesifik dalam molekul heparin, mengandung sekuens pentasakarida dengan komposisi gula dan sulfat yang digunakan untuk menginduksi aktivasi antitrombin (Thunberg *et al.*, 1982; Lindahl *et al.*, 1983). Kemampuan antikoagulan heparin ditentukan dari ukuran dan strukturnya (Peirera *et al.*, 2002).

Aktivitas fukoidan sebagai pencegah pembeku darah pertama kali ditemukan pada tahun 1957. Penelitian ini dilakukan dengan harapan untuk mensubstitusi antikoagulan alami heparin. Hal ini disebabkan karena diketahui bahwa pemberian heparin sebagai antikoagulan memberikan efek negatif antara lain : resistansi heparin, reaksi sistemik akut, *heparin –induced skin lesion*, *heparin –induced thrombocytopenia* (HIT) dan osteoporosis (Rahayu, 2009).

Antikoagulan alami yang menjanjikan seperti fukoidan dari rumput laut coklat telah diteliti untuk dapat digunakan sebagai bahan obat yang aman, karena dianggap tidak mempunyai efek samping (Kim *et al.*, 2007).

Hasil penelitian fukoidan sebagai antikoagulan yang dilengkapi dengan metode ekstraksi dan struktur kimianya pertama kali ditemukan oleh Nagumo dan Nishino (1991). Beberapa hasil penelitian yang sudah dipublikasikan menggunakan fukoidan sebagai antikoagulan dari beberapa spesies rumput laut coklat, antara lain : *Ecklonia cava* menunjukkan aktivitasnya sama dengan heparin, melalui interaksinya dengan aliran pembeku darah dengan menghambat bioaktivitas dari faktor pembeku darah FII, FX, dan FVII (Athukorala *et al.*, 2006). Fukoidan dari *Padina gymnospora* dilaporkan menunjukkan aktivitas antikoagulan hanya 2,5 kali lebih rendah dari LMW heparin yang diketahui melalui uji APTT (Silva, 2005). Secara *in vitro* aktivitas antithrombin dan anti-faktor X dari fukoidan lebih rendah dibandingkan heparin, namun secara *in vivo* dengan menggunakan model trombosit menciit menunjukkan aktivitas antitrombotik fukoidan lebih kuat 2,3 kali dibandingkan heparin, hal ini disebabkan karena ikatan fukoidan dengan kofaktor heparin lebih kuat dibandingkan dengan antithrombin. Sedangkan secara *in vitro* aktivitas antithrombin dan faktor X heparin meningkat karena affinitas ikatan heparin

dengan antitrombin meningkat. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme antitrombotik dari fukoidan berbeda dengan heparin (Kwak, 2010).

Heparin di isolasi dari jaringan hewan dalam bentuk polisakarida sulfat, dimana rantai karbohidrat berbeda dari fukoidan. Pada kedua senyawa tersebut mempunyai kandungan sulfat yang tinggi sehingga mampu sebagai antikoagulan. Diketahui bahwa adanya sulfatasi dalam fukoidan menghasilkan aktivitas antikoagulan lebih tinggi sebab ketika sulfat dihilangkan menyebabkan polisakarida tidak aktif (Qui, 2006). Dalam waktu yang sama dilakukan penelitian perbandingan aktivitas antikoagulan fukoidan dari spesies yang berbeda dan jumlah sulfat yang berbeda. Diperoleh bahwa bioaktivitas fukoidan yang memiliki sulfat lebih banyak lebih tinggi sifat antikoagulannya dibandingkan dengan fukoidan yang memiliki sulfat lebih rendah. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan sulfat yang tinggi adalah penting dalam fungsi sebagai antikoagulan, namun selain kandungan sulfat, struktur juga berperan (Usov dan Bilan, 2009).

Proses pembekuan darah dipengaruhi oleh banyak faktor diantaranya interaksi melalui antitrombin III (AT-III) dan kofaktor heparin II (HC-II), dimana thrombin menghambat terjadinya konversi fibrinogen ke fibrin. Fukoidan mampu berinteraksi dengan antitrombin III (AT-III) dan kofaktor heparin II (HC-II). Hal ini mengakibatkan aktivitas antikoagulan fukoidan meningkat dibandingkan dengan heparin yang mempunyai gugus aktif spesifik hanya mampu berinteraksi dengan AT-III. Meskipun telah diteliti dan dibuktikan bahwa interaksi fukoidan dengan AT-III, namun interaksi fukoidan sebenarnya lebih kuat berinteraksi dengan HC-II sehingga hal ini menambah bioaktivitasnya (Usov dan Bilan, 2009).

Fukoidan dapat juga langsung berinteraksi dengan thrombin dan protease lain untuk menginaktifkan enzim. Berat molekul fukoidan merupakan faktor penting dalam kemampuannya sebagai antikoagulan. Struktur fukoidan yang berbeda berpengaruh pada kemampuan sebagai antikoagulan, hal ini dibuktikan pada fukoidan yang mempunyai kerangka fukosa terikat 2,3 desulfasi mempunyai antikoagulan lebih tinggi dibandingkan dengan fukoidan yang mempunyai kerangka fukosa memiliki cabang asam α -D- glukoronat (Moura, 2004; Jung *et al*, 2007).

Banyak hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antikoagulan pada fukoidan mungkin berhubungan dengan kandungan dan posisi sulfat, berat molekul dan komposisi gula. Semakin tinggi jumlah gugus sulfat pada fukoidan menunjukkan semakin tingginya aktivitas antikoagulan (*E. kurome* dan *H. fusiforme*). Posisi gugus sulfat pada residu gula adalah sangat penting untuk bioaktivitasnya sebagai antikoagulan. Aktivitas tersebut berhubungan pada C-2 sulfat dan C-2,3 disulfat, selebihnya residu gula 2,3 disulfat adalah sifat struktur umum dalam fukoidan yang mempunyai aktivitas sebagai antikoagulan. Duerta *et al* (2001), melaporkan bahwa sifat antikoagulan fukoidan ditentukan sebagian besar oleh rantai fukosa sulfat, terutama oleh unit *disulfat fucosyl*. Silva *et al* (2005), melaporkan bahwa sulfatasi 3-O pada C-3 dari unit 4- α -L-fukosil mempengaruhi aktivitas antikoagulan fukoidan dari *Padina gymnospora*. Namun Pereira (2002) menyatakan aktivitas antikoagulan fukoidan dan galaktan sulfat tidak hanya pengaruh dari jumlah sulfat dan densitas muatannya tetapi juga struktur yang spesifik dari antikoagulan tersebut untuk mampu berinteraksi dengan kofaktor pembeku darah.

Melo *et al* (2003), melakukan penelitian tentang mekanisme aktivitas antikoagulan menggunakan galaktan sulfat. Aktivitas antikoagulan polisakarida sulfat dicapai terutama melalui potensi interaksinya dengan kofaktor plasma, yang merupakan penghambat alami protease pembekuan. Hasil yang diperoleh adalah sebagai berikut: 1) persyaratan struktural interaksi antara galaktan sulfat dengan penghambat pembeku darah dan protease tidak hanya pengaruh dari kerapatan muatan galaktan sulfat; 2) struktur dasar dari interaksi ini adalah kompleks karena biasanya melibatkan polisakarida heterogen namun tergantung pada distribusi gugus sulfat dan komposisi monosakaridanya; 3) galaktan sulfat membutuhkan rantai lebih panjang daripada heparin untuk mencapai aktivitasnya sebagai antikoagulan; 4) kemungkinan struktur galaktan sulfat adalah besar, bukan komponen kecil seperti dalam heparin, namun yang menentukan adalah interaksinya dengan antithrombin; 5) galaktan sulfat dengan berat molekul 15-45 kDa mengikat antithrombin namun tidak dapat mencapai penghambat plasma dan trombin. Efek terakhir ini mengharuskan ukuran molekul di atas 45 kDa; 6) galaktan sulfat dan heparin mengikat pada posisi ikatan yang berbeda di

antithrombin; 7) galaktan sulfat kurang efektif dibandingkan heparin saat mendorong aktivasi antithrombin melalui konformasi struktur.

Secara keseluruhan hasil pengamatan tersebut menunjukkan bahwa mekanisme yang berbeda mendominasi aktivasi antithrombin melalui konformasi struktur dalam memastikan aktivitas galaktan sulfat sebagai antikoagulan melalui interaksinya dengan antitrombin. Galaktan sulfat kemungkinan menghubungkan antithrombin dan thrombin dan membiarkan protease berada dalam bentuk yang tidak aktif. Aktivasi antithrombin melalui konformasi struktur dan pembentukan kompleks kovalen dengan trombin tampak kurang penting dalam aktivitas antikoagulan galaktan sulfat. Hasilnya menunjukkan bahwa paradigma interaksi antara heparin dengan antithrombin tidak dapat diterapkan pada polisakarida sulfat yang lain. Target setiap jenis polisakarida sulfat adalah mampu membentuk kompleks dengan plasma penghambat pembeku darah dan protease (Li Bo, 2008).

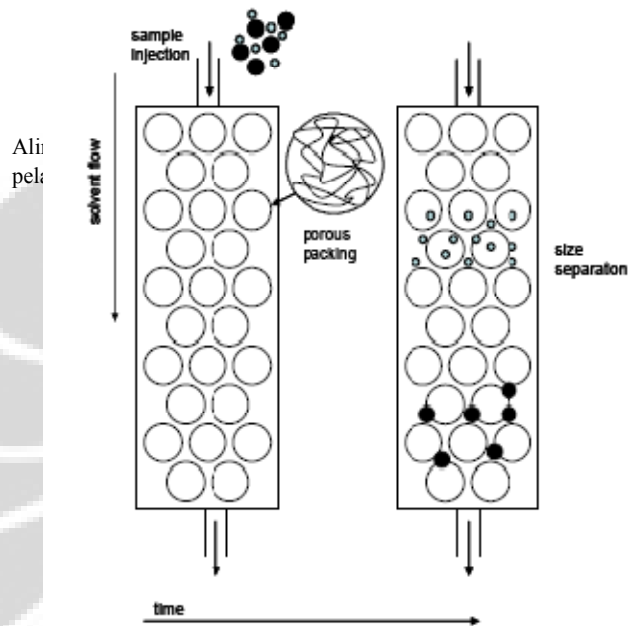
2.5. Metode Analisa untuk Fukoidan

2.5.1. Kromatografi Permeasi Gel atau Filtrasi Gel

Filtrasi gel adalah suatu teknik menguraikan campuran zat-zat sesuai dengan ukuran molekulnya. Teknik ini didasarkan atas inklusi dan eksklusi zat terlarut melalui suatu fase diam yang terbuat dari gel polimer yang berikat silang dan berpori heterogen. Kromatografi eksklusi adalah pemisahan menggunakan partikel berpori untuk memisahkan molekul-molekul berdasarkan perbedaan ukuran molekul.

Dalam kromatografi elusi cair-padat, pemisahan terjadi antara fase cair di dalam partikel gel dan di luar cairan yang mengelilingi gel. Akibat mekanisme perbedaan laju permeasi masing-masing molekul zat terlarut ke interior partikel gel sehingga pemisahan terjadi. Dengan aliran cairan, molekul akan berdifusi ke seluruh bagian gel, hanya molekul yang berukuran besar yang tidak dapat masuk ke daerah yang merupakan rongga-rongga gel. Akibatnya molekul dapat lewat dengan tanpa rintangan sepanjang kolom sehingga memiliki waktu retensi lebih cepat, sedangkan molekul kecil akan terpenetrasi secara dalam ke celah-celah kecil gel sehingga lebih lama keluar dan waktu retensi menjadi panjang. Sudah tentu molekul besar akan terelusi terlebih dahulu baru kemudian diikuti oleh

molekul – molekul kecil yang masuk dulu ke rongga-rongga gel. Pemisahan ini dimungkinkan akibat penahanan ukuran yang terjadi dalam partikel gel. (Khopkar, 1990).



Gambar 2.10. Mekanisme kerja kromatografi permeasi gel

Pemisahan suatu tipe gel tertentu sangat tergantung pada ukuran molekul dan sifat –sifat kimia dari zat yang akan dipisahkan. Misalnya pada biogel 0-10 digunakan untuk zat-zat yang mempunyai berat molekul yang berkisar antara 5000 – 17000 satuan. Molekul dengan berat molekul diatas batas ini, yaitu diatas limit eksklusi akan lewat saja tanpa rintangan dari gel. Dibawah limit eksklusi, zat tersebut akan terelusi pada volume elusi sesuai dengan volume gel total. Untuk bekerja di alam medium yang tidak berair, gel yang tepat digunakan adalah sephadex LH-20 (Khopkar, 1990). Prinsip pemisahan kromatografi permeasi gel adalah bentuk pemisahan berdasarkan ukuran molekul bukan berat molekul. Maksudnya bahwa berat molekul yang sama akan berbeda migrasi di dalam kolom bila ada cabang dan kelipatannya. Jadi hanya nilai berat molekul relatif yang bisa diperoleh dari sampel yang sama (Holtcam, 2009).

Kromatografi permeasi gel ini sangat berguna untuk pemisahan spesies dengan berat molekul tinggi ($BM > 20000$), terutama yang tidak terionkan, campuran sederhana dapat dipisahkan dengan mudah terutama jika penyusun campuran itu memiliki berat molekul yang berbeda. Kromatografi ini juga sangat cocok digunakan untuk kerja awal, pemisahan eksplorasi dari cuplikan yang belum diketahui, pemisahan ini memberikan gambaran isi cuplikan apakah cuplikan tersebut memiliki berat molekul rendah atau berat molekul tinggi.

Pemilihan pelarut pada kromatografi permeasi gel bertujuan untuk meminimumkan interaksi antara zat terlarut dengan permukaan zat penyangga, karena interaksi apapun dengan permukaan tidak diinginkan. Persyaratan pelarut pada kromatografi permeasi gel harus memiliki kemurnian tinggi, tidak bereaksi dengan fase diam, dapat bercampur dengan komponen sistem pelarutnya baik untuk cuplikan dan viskositas rendah. Jika kriteria tersebut terpenuhi, maka zat terlarut dapat masuk ke pori dengan proses difusi. Untuk gel lunak pelarut harus mengembangkan gel (*swelling*) karena porositas dipengaruhi jumlah pelarut, misalnya untuk dekstran, pelarut yang biasa digunakan adalah air (Johnson dan Stevenson, 1994).

2.5.2. Spektrofotometer Infra Merah

FT-IR adalah teknik yang digunakan untuk mempelajari perubahan komposisi kimia dalam tumbuhan tingkat tinggi dan rumput laut (Sheng et al. 2004). Spektrum Infra merah merupakan metode yang umum digunakan untuk menentukan posisi sulfat. Hasil spektrum IR memberikan informasi adanya sulfat ($S=O$) pada fukoidan diperoleh dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang $1260 - 1240 \text{ cm}^{-1}$. Selanjutnya gugus sulfat dalam posisi aksial atau posisi ekuatorial dilihat dari pita serapan pada bilangan gelombang $820 - 850 \text{ cm}^{-1}$, dimana posisi sulfat aksial ($C-O-S$) ditentukan adanya pita serapan di bilangan gelombang 842 cm^{-1} dan posisi ekuatorial ($C-O-S$) pada bilangan gelombang 820 cm^{-1} (Li Bo, 2004).

Serapan di wilayah bilangan gelombang 3000 sampai 3300 cm^{-1} adalah vibrasi ulur dari $C-C$, $C=C$ dan $Ar-H$, sedangkan serapan pada bilangan gelombang 2700 sampai 3000 cm^{-1} didominasi vibrasi ulur dari gugus fungsi $C-H$

untuk CH₃, CH₂, dan CHO (Miller, 2003). Daerah serapan pada bilangan gelombang 1200 sampai 900 cm⁻¹ adalah di dominasi ikatan vibrasi ulur dari C-O, C-C, C-O-C dan C-O-P dari polisakarida (Wolker, 2004).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juli 2010 sampai bulan April 2011 di Laboratorium Balai Besar Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan dan Laboratorium Patologi Klinik Kedokteran Universitas Indonesia.

3.2. Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: labu ukur, gelas ukur, pipet ukur, pipet tetes, beaker glass, batang pengaduk, corong gelas, tabung sentrifuge, botol semprot, pipet mikro, propipet (bulb), tabung reaksi, blower, blender, disk mill, alat *sentrifuge*, timbangan analitik, penyaring vakum, penangas air, syringe, hot plate, indikator pH stik, Coagulometer.

Instrumen yang digunakan adalah: HPLC Shimadzu prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101 C, dan Detektor Refraktif Indeks (RID-10 A), pompa LC-20AB, FT-IR, Elementer analyzer, HPLC TOSOH dengan kolom TSK Gel G5000 PW dan RID-10A, Turbidimeter, spektrofotometer UV-VIS.

3.3. Bahan Penelitian

- Rumput laut *Sargassum crassifolium* diperoleh dalam bentuk basah dari Binuangeun, Banten. Kemudian dikeringkan di laboratorium Pengolahan di Balai Besar Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta, kemudian di oven suhu 40-50°C dan ditepungin dengan mesin penggiling.
- Plasma darah manusia diperoleh dari 5 orang donor, yang tidak diketahui jumlah trombosit sebelumnya.
- Sephadex A-25 (Sigma), standar fukoidan (Sigma), standar Pullulan (Sigma) serta bahan kimia lainnya seperti : CaCl₂, TFA, CPC, etanol, methanol, aseton, CHCl₃, Pathrombin SL, HCl, NaOH, BaCl₂, H₂SO₄, phenol, diperoleh di Jakarta.

3.4. Prosedur kerja

3.4.1. Isolasi fukoidan

Daun rumput laut basah 2 kg dikeringkan pada suhu kamar atau dikeringkan dalam oven vacuum (60°C) lalu digiling dan disimpan dalam kemasan plastik dalam keadaan *vacuum* sebelum digunakan. Tepung alga direndam dengan campuran pelarut $\text{MeOH-CHCl}_3 - \text{H}_2\text{O}$ dengan perbandingan 4:2:1 pada suhu ruang selama 3 jam lalu dibilas dengan aseton, kemudian dikeringkan. Tepung alga direndam dengan HCl 0,1N (1:10) (b/v) lalu distirer selama 6 jam pada suhu ruang. Disaring menggunakan planktonet 500 mesh, filtrat ditampung. Filtrat dinetralisasi dengan menggunakan NaOH 0,5 M. Ke dalam filtrat ditambah larutan CaCl_2 4M (1:10) secara mekanik sambil diaduk selama waktu 30 menit pada suhu ruang lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, filtratnya diencerkan dengan penambahan air sampai konsentrasi CaCl_2 0,5 M lalu ditambah CPC 5% sampai terbentuk endapan. Ke dalam endapan ditambah CaCl_2 3 M lalu disentrifuse kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, ke dalam filtrat ditambah etanol (1:2). Hasil endapan yang diperoleh dilarutkan dengan air dan disentrifuse kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Larutan yang diperoleh di dialysis dengan 0,5 M NaCl dan aquabides sehingga diperoleh ekstrak fukoidan (F).

3.4.2. Pemurnian ekstrak fukoidan

1. Fraksinasi ini dilakukan dengan menggunakan kromatografi penukar anion dengan DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) dalam bentuk Cl^-
2. Esktrak fukoidan (1.1g dalam 50 mL) dimasukkan pada kolom ($30 \times 1,7$ cm) dan dielusi dengan air diikuti dengan larutan natrium klorida dengan peningkatan konsentrasi (0,5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.5 M NaCl) sampai tidak adanya reaksi positif dari elute dengan fenol dan H_2SO_4 (cairan bening) dalam metode Dubois (1956).

3.4.3. Karakterisasi fukoidan

3.4.3.1. Penentuan total karbohidrat dari fukoidan diukur dengan metode Dubois *et al* 1956 dalam Duarte *et al*, 2001

Sampel fukoidan kering (10 mg) dimasukkan ke tabung. Ditambahkan 1 mL aquades ke dalam sampel dan di aduk. Kandungan total karbohidrat diukur dengan menggunakan uji fenol-sulfat; dengan penambahan 5 mL fenol 0,5 % dan 2,5 ml H₂SO₄ pekat, ditambahkan ke sampel dan dibiarkan sampai dingin (direndam dalam air es) selama 30 menit. Sampel diaduk dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Blanko diperlakukan sama dengan sampel seperti di atas. Sebagai standar digunakan L-fukosa dengan variasi (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2) %.

3.4.3.2. Penentuan Estimasi Berat Molekul (Shiroma, 2008)

- Masing - masing sampel dan standar ditimbang (10 mg) lalu dilarutkan dalam aquabides 10 mL kemudian dibiarkan selama semalam sebelum dianalisa, sampai sampel benar-benar sudah mengembang atau minimal 6 jam dilarutkan sebelum digunakan
- Standar diinjek sebanyak 20 µL dengan lama pemisahan dimulai 30 menit (sampai peak kembali ke base line).
- Berat molekul standar pullulan yang digunakan dari (P5, P10, P20, P50, P100, P200, P400 dan P40010) x 10⁴ Dalton.
- Kemudian sampel diinjeksikan dengan volume yang sama dengan standar (20 µl), dengan harapan waktu retensi sampel berada diantara waktu retensi standar.
- Kolom yang digunakan TSK Gel G5000 PW dengan detektor RID-10A
- Untuk pengolahan data dilakukan dengan menggunakan garis regresi linear.

3.4.3.3. Analisa FT-IR

Sebanyak 1 mg sampel digerus dengan 200 mg kalium bromide sampai homogen. Selanjutnya serbuk sampel dibuat tablet tipis dan transparan pada

tekanan 7000 Pa, lalu dimasukkan ke dalam *simple pan* untuk dibuat rekaman spektrum infra merah pada bilangan gelombang 4000 – 500 cm^{-1} .

3.4.3.4. Penentuan sulfat dengan menggunakan metode BaCl_2 –gelatin (Kim *et al*, 2007)

a. Preparasi BaCl_2 –gelatin

Gelatin 2 g dilarutkan dalam 400 mL air panas (60 -70 °C) dan dibiarkan sampai suhu 4 °C selama 6 jam lebih diutamakan dibiarkan semalam. Selanjutnya BaCl_2 sebanyak 2 g dilarutkan dalam cairan gelatin. Larutan ini dapat disimpan pada suhu 4 °C selama 1 minggu sebelum digunakan.

b. Preparasi sampel

Sampel 2 mg dilarutkan dengan 2 mL aquadest dalam tabung tertutup. Kemudian ditambahkan TCA 4% sebanyak 5 mL lalu dipanaskan dalam waterbath 100 °C selama 4 jam. Kemudian didinginkan sampai suhu ruang, 5 menit sebelum dibuka tabung digoyang-goyang. Hasil hidrolisis diambil 1 ml dan ditambah larutan BaCl_2 . gelatin 1 mL serta TCA 1,4 mL lalu diaduk secara mekanik selama 60 detik, langsung diukur pada $\lambda = 420 \text{ nm}$.

3.4.3.5. Penentuan Kadar Protein menurut metode Lowry - Folin (Sudarmadji *at el*, 1984):

Ditambahkan 0,1 mL sampel dan 0,9 mL pewarna Lowry. Sementara itu, campuran blanko dibuat dari 0,1 mL akuades dan 0,9 ml pewarna Lowry pada tempat yang terpisah. Sampel dan blanko di diamkan selama 15 menit. Pada masing-masing sampel dan blanko ditambahkan 3 ml pewarna Folin kemudian di diamkan selama 45 menit. Sampel dan blanko diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Pengukuran kadar protein menggunakan standar BSA (bovine serum albumin) yang terdapat pada lampiran.

3.4.3.6. Hidrolisis fukoidan (Chandia & Matsuhira, 2008)

Sampel (5 mg) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan TFA 4M kemudian ditutup lalu dimasukkan ke dalam waterbath dipanaskan sampai suhu 100 °C selama 2 jam. Setelah itu hidrolisat dinetralisasi

dengan NaOH 2 M untuk menetralkan asam TFA nya. Setelah itu hidrolisat disaring menggunakan filter 0,45 mikron, lalu ditambah resin penukar kation anion. Untuk menentukan jenis monosakaridanya dilakukan dengan menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) shimadzu prominence-20 dengan kolom shimpack SCR-101C yang merupakan kolom penukar kation terdiri dari kalsium dengan kopolimer *stiren divinilbenzena*. Volume sampel setiap injek sebanyak 20 μ L dan waktu pemisahan selama 20 menit.

Pembuatan larutan standar

a. Larutan standar fukosa

Larutan induk fukosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg fukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat deret larutan standar fukosa berikutnya. Dengan variasi konsentrasi sebesar 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 dan 100 ppm. Deret larutan standar fukosa ini dianalisis menggunakan HPLC dengan kondisi kecepatan alir 1 mL/menit, suhu oven 80°C, dan fase gerak yang digunakan adalah aquabides.

b. Larutan standar glukosa

Larutan induk glukosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg glukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas.

c. Larutan standar galaktosa

Larutan induk glukosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg galaktosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas.

d. Larutan standar xilosa

Larutan induk glukosa 1000 ppm dibuat dengan menimbang 100 mg xilosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas.

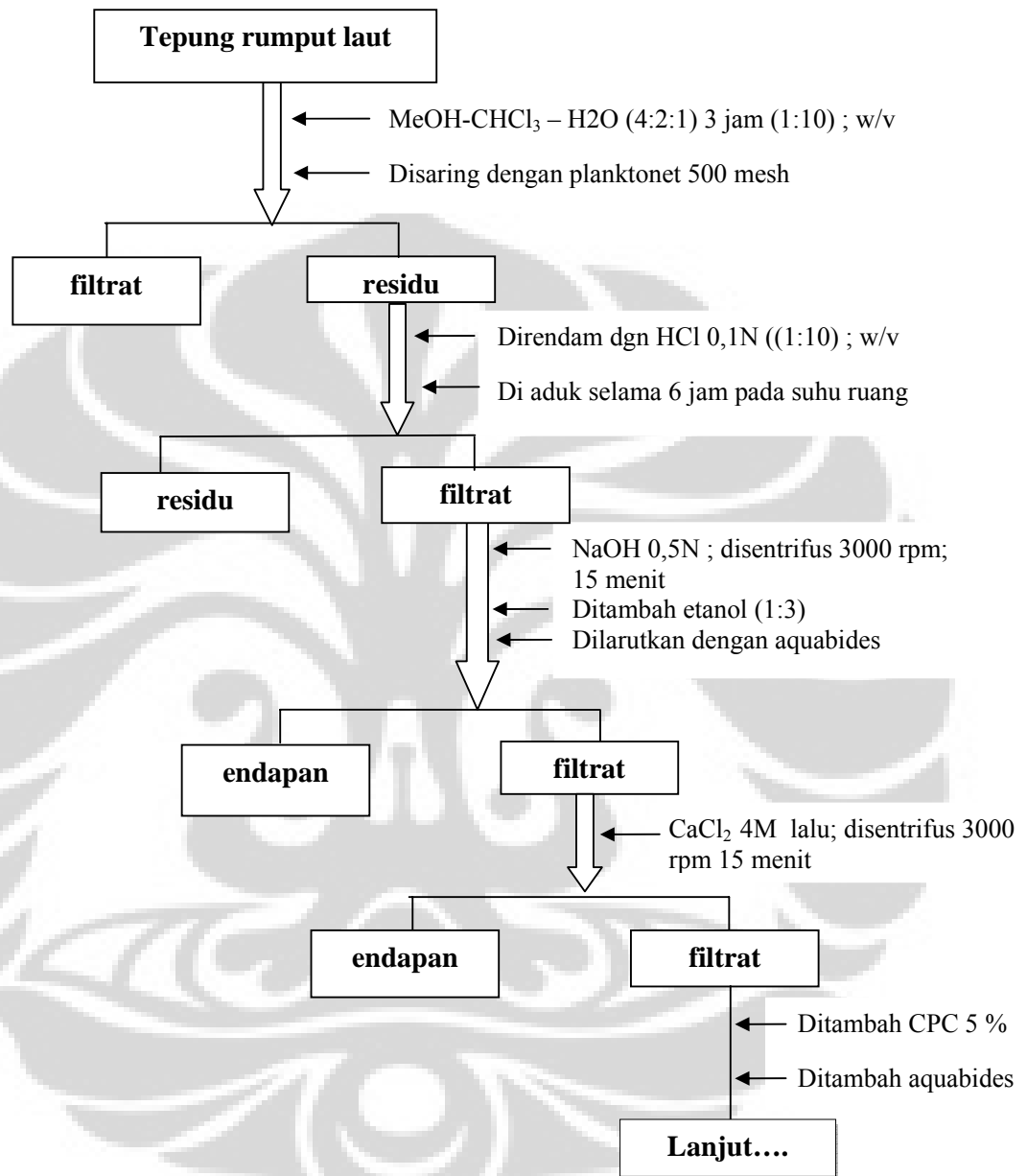
3.4.4. Uji aktivitas sebagai antikoagulan berdasarkan Uji APTT (*activated partial thromboplastin time*) menggunakan modifikasi metode (Zoysa *et al*, 2008)

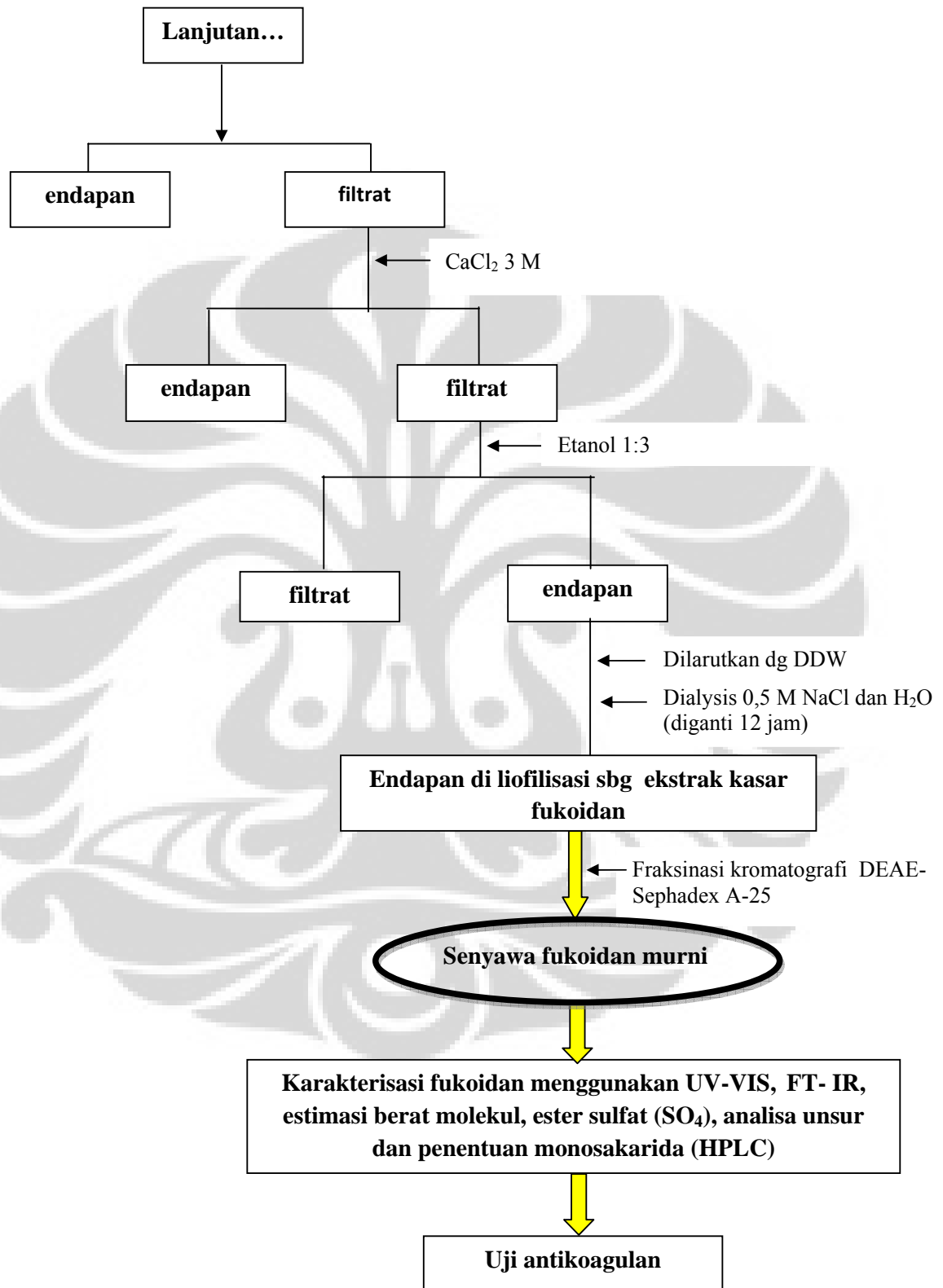
a. Uji optimasi inkubasi fukoidan

Plasma darah manusia (100 μL) diinkubasikan selama (1, 5, 15, 30, dan 60 menit pada suhu 37 ° C dengan 10 μL larutan fukoidan (konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Pathromtin SL (100 μL) ditambahkan ke campuran fukoidan dan diinkubasi selama 2 min pada 37 ° C. Kemudian ditambahkan CaCl_2 0,025 M sebanyak 100 μL dan dicatat waktu pembekuan darah.

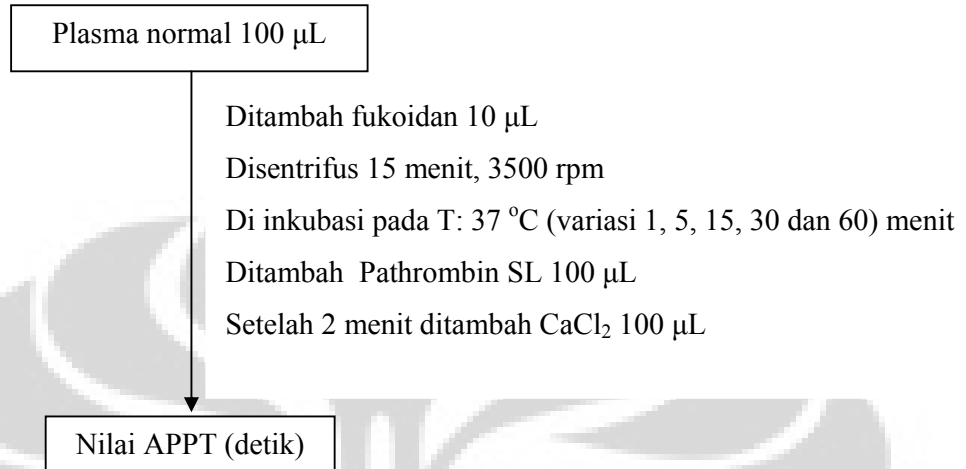
b. Uji APTT pembekuan (*APTT clotting*) dengan metode yang sama dan lama inkubasi dilakukan berdasarkan hasil uji optimasi dengan variasi konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menggunakan 5 donor plasma darah manusia sebagai ulangan, berbadan sehat tanpa diketahui jumlah trombositnya.

3.5. Diagram kerja





3.5.1. Uji antikoagulan

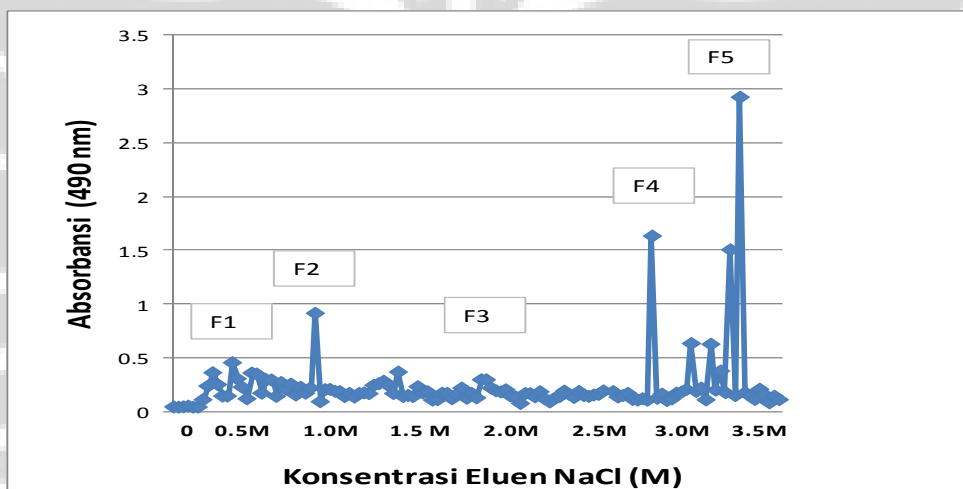


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Fukoidan

Hasil rendemen ekstrak fukoidan yang diperoleh sebesar 1,46% (4,38 g) dari berat kering tepung *Sargassum crassifolium* (300 g), setelah dimurnikan diperoleh rendemen fukoidan sebesar 0,87% dari berat kering (2,628 g). Hasil pengukuran absorbansi dari pemurnian fukoidan yang dilakukan dengan memasukkan fukoidan ke dalam kolom yang berisi resin penukar anion, eluen NaCl dengan konsentrasi meningkat (0,5 – 3,5 M) dengan interval 0,5 dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Profil fukoidan yang dimurnikan dengan eluen NaCl 0.5M – 3,5M menggunakan resin Sephadex A-25. Fraksi tiap 10 mL diuji menggunakan fenol- H_2SO_4 .

Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh, fukoidan yang dimurnikan dibagi ke dalam 5 fraksi. Penentuan fraksi ini berdasarkan nilai absorbansi dari yang absorbansi naik kemudian turun kembali mendekati absorbansi blanko secara fisik larutan (bening). Tiap hasil yang sudah dipisahkan melalui kolom berisi resin anion DEAE Sephadex A-25 ditampung tiap tabung 7 mL. Hasil penggabungan cairan yang ditampung ditambahkan etanol (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Hasil fraksinasi dari kolom kromatografi

Setelah ditambah etanol diperoleh endapan, kemudian di liofilisasi. Dari masing-masing fraksi diperoleh hasil rendemen seperti tertera pada Tabel 4.1.



Gambar 4.3. Produk fukoidan yang sudah diliofilisasi (ada 5 fraksi)

Berdasarkan hasil rendemen dan produk yang mendekati warna fukoidan komersil dari masing-masing fraksi serta rendemen tertinggi diperoleh pada fraksi F2.



Gambar 4.4. Produk fukoidan fraksi 2 (F2)

Tabel 4.1. Hasil rendemen fukoidan dari masing-masing fraksi melalui penambahan eluen NaCl

Fraksi	Konsentrasi NaCl (M)	Rendemen (%); w/v
F1	0,5-1	14
F2	1-1,5	32
F3	1,5-2,5	24
F4	2,5-3	16
F5	3-3,5	14

Total rendemen setelah dimurnikan adalah 60 % dari ekstrak fukoidan (2.628 g) atau 0,87% dari tepung rumput laut. Hasil rendemen dari penelitian ini masih rendah bila dibandingkan dengan hasil-hasil rendemen dari penelitian orang lain yang sudah dipublikasikan. Hasil -hasil rendemen fukoidan yang sudah diteliti antara lain dari spesies *Nemacystus decipiens* sebanyak 0,5% (w/w) berat basah rumput laut (Masakuni, 1999), rendemen dari spesies *Cladosiphon okamuranus* sebanyak 2,0% dari berat kering rumput laut (Takeshi, 2003), rendemen ekstrak fukoidan dari rumput laut coklat spesies *Hizikia fusiformis* sebesar 1,3% dari berat kering rumput laut (Shiroma, 2008). Perbedaan hasil rendemen ini kemungkinan disebabkan karena metode ekstraksi dan jenis rumput laut yang berbeda. Selain itu faktor umur dan iklim setempat juga mempengaruhi rendemen dan struktur fukoidan (Franck *et al*, 2004).

Menurut Kitamaro *at el*, (1991) kehilangan rendemen fukoidan yang paling banyak terjadi adalah pada saat dialisis, karena lolosnya fukoidan melalui membran dialisis yang digunakan. Oleh karena itu perlu dilakukan penggunaan membran dialisis yang tepat sesuai dengan target fukoidan yang diinginkan.

Prosedur ekstraksi fukoidan harus disesuaikan dengan jenis spesies bahan baku rumput laut coklat yang digunakan. Hal ini bertujuan untuk memperoleh rendemen yang banyak dan aplikasi bioaktivitas fukoidan. Untuk itu diperlukan modifikasi prosedur ekstraksi fukoidan dari rumput laut yang berbeda (Mori & Nisizawa, 1982).

4.2. Karakterisasi Fukoidan

4.2.1. Total Karbohidrat

Hasil total polisakarida diperoleh dengan pengukuran absorbansi sampel fukoidan yang sudah dimurnikan. Hasil pengukuran total polisakarida dihitung dengan menggunakan fukosa sebagai standar. Dari hasil pengukuran absorbansi diperoleh pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Hasil analisis total karbohidrat dari masing-masing fraksi

Fraksi	Konsentrasi NaCl (M)	Karbohidrat (%)
F1	0.5 – 1.0	65.3
F2	1.0 - 1.5	78.3
F3	1.5 - 2.5	68.2
F4	2.5 – 3.0	71.1
F5	3.0 - 3.5	61.0

Semua fraksi menunjukkan karbohidrat yang dihasilkan masih dibawah 100%. Hal ini menunjukkan bahwa rumput laut mengandung senyawa lain disamping karbohidrat, seperti : protein, lemak, pigmen dan unsur logam berat yang masih tertinggal dalam fukoidan, walaupun dalam tahap ekstraksi sudah berusaha dihilangkan dengan menggunakan pelarut (Yunizal, 2004).

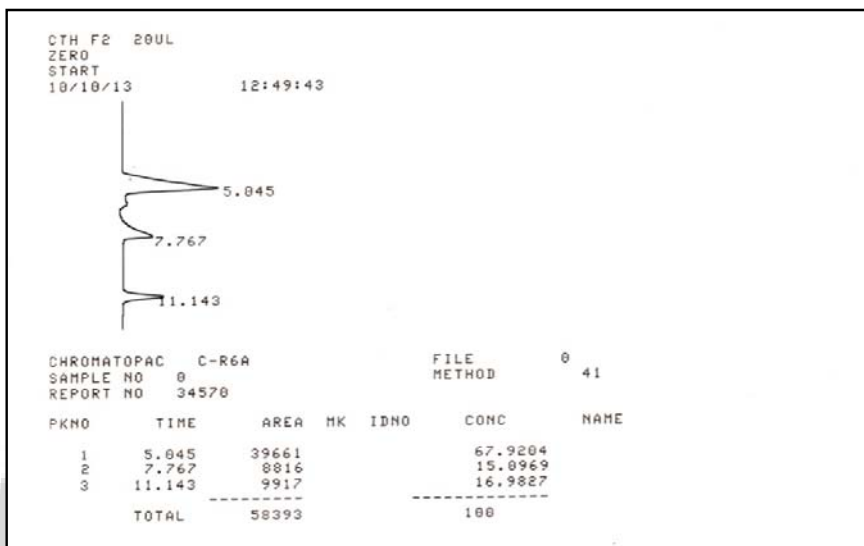
4.2.2. Penentuan estimasi Berat Molekul

Hasil produk dari masing-masing fraksi dilanjutkan dengan penentuan estimasi berat molekul menggunakan kromatografi permeasi gel dengan kolom TSK gel G5000 PW. Standar polisakarida yang digunakan adalah Pullulan yang memiliki berat molekul dari (0,59; 0,96; 2,11; 4,71; 10,71; 20; 34,4; 70,8) x 10⁴ dengan masing-masing kode (P5, P10, P20, P50, P100, P400, P800). Berdasarkan hasil uji perhitungan regresi linear (ada di Lampiran), maka berat molekul fukoidan hasil penelitian dapat ditentukan. Hasil berat molekul fukoidan dari masing-masing fraksi diperoleh yaitu pada Tabel 4.3. Berat molekul mempengaruhi mutu produk fukoidan terutama pada kemampuan bioaktivitasnya. Salah satu yang menentukan tinggi rendahnya berat molekul dipengaruhi oleh senyawa monosakarida penyusun fukoidan (Usov dan Bilan, 2009).

Tabel 4.3. Hasil analisis estimasi berat molekul dari 5 fraksi fukoidan yang sudah dimurnikan

Fraksi	Berat molekul x10 ⁴ Dalton
F1	5.8
F2	7.71
F3	5.47
F4	5.44
F5	5.25
FK	7.64

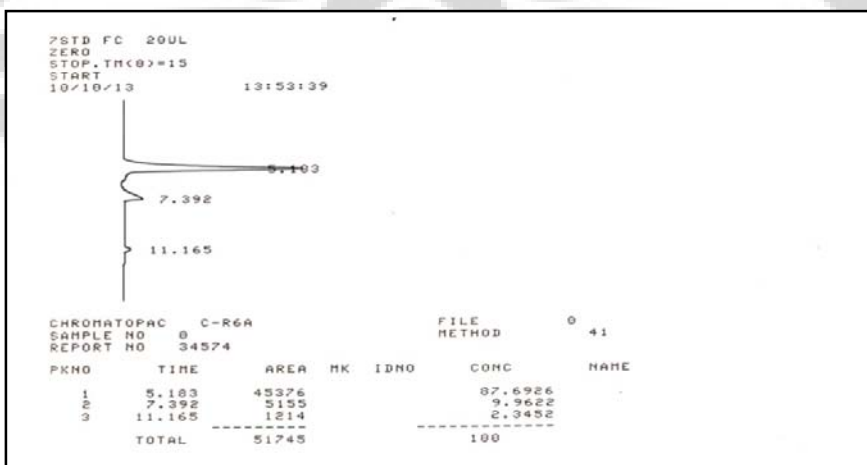
Fukoidan dari masing-masing spesies rumput laut coklat berbeda-beda jumlah berat molekulnya. Pada penelitian ini untuk menentukan berat molekul fukoidan *Sargassum crassifolium* (diperoleh dari hasil penelitian) digunakan fukoidan komersil (FK) sebagai pembanding yaitu *Fucus vesiculosus*.



Gambar 4.5. Kromatogram fukoidan Fraksi 2 (F2)

Dari hasil yang diperoleh besarnya estimasi berat molekul fukoidan dari *Sargassum crassifolium* berkisar pada $(5,44 - 7,71) \times 10^4$ berdekatan dengan estimasi berat molekul fukoidan komersil ($7,64 \times 10^4$). Bentuk profil kromatogram yang dihasilkan dari F2 mirip dengan fukoidan komersil (FK), sebagaimana ditampilkan pada Gambar 4.5.

Sedangkan untuk profil kromatogram dari fraksi-fraksi lain (F1, F3, F4 dan F5) dapat dilihat pada Lampiran.



Gambar 4.6. Kromatogram fukoidan komersil (FK)

4.2.3. Analisis FT-IR fukoidan

Data spektrum infra merah bermanfaat untuk mengetahui jenis gugus fungsi spesifik yang ada dalam molekul suatu senyawa. Pada penelitian ini data spektrum infra merah untuk mengetahui adanya gugus ester sulfat dan posisi ester sulfat yang ada (aksial atau ekuatorial). Dengan diketahui adanya gugus spesifik ini akan menunjang data lainnya.

Untuk karakterisasi pendahuluan fukoidan salah satu metode fisikokimia yang digunakan adalah spektroskopi IR. Hasil analisis posisi sulfat pada polisakarida dianalisis menggunakan Pellet KBr dengan scanning antara 4000 dan 400 cm^{-1} (Duarte, 2001). Spektrum IR memberikan kemungkinan untuk membedakan sulfat di atom O (4) dari sulfat di atom O(2) dan O(3) pada residu fukopyranosa. Hasil intensitas absorbansi dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4. Hasil intensitas absorbansi infra merah fukoidan yang sudah dimurnikan.

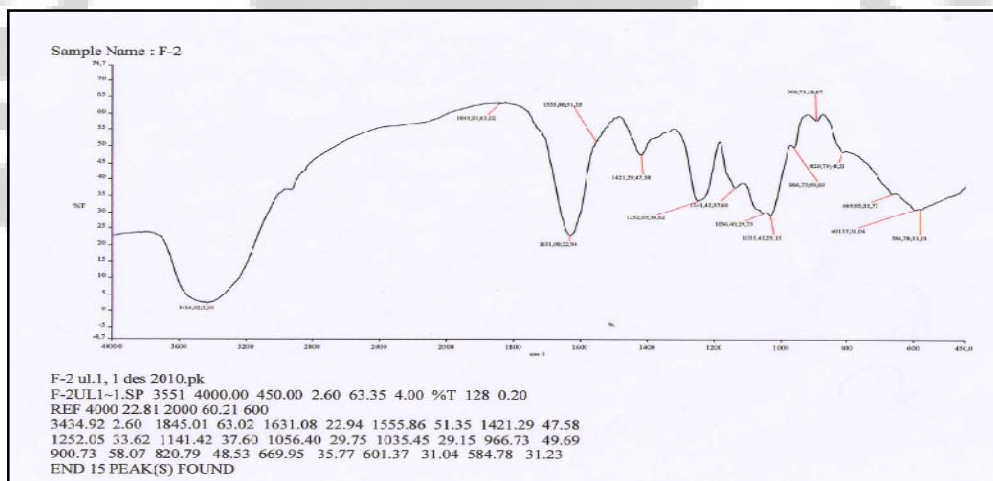
Kode Sampel	Absorbansi spesifik (cm^{-1})	Absorbansi Umum (cm^{-1})	Indikasi gugus/struktur
F1	816	1240-1272	Adanya ester sulfat
F2	1252; 820		
F3	1255 ;822		
F4	1255; 821		
F5	1243;838		
FK	1259		
	1730	1700-an	Ester carbonil, menunjukkan adanya asetat di fukoidan

Catatan : FK = produk komersil fukoidan spesies *Fucus vesiculosus*

Pada serapan absorbansi 1240 – 1260 cm^{-1} merupakan daerah pita serapan untuk menunjukkan adanya ester sulfat. Namun berapa jumlah sulfat yang di dalamnya

belum bisa dipastikan, harus ditambah dengan data dukung lain, seperti analisa total sulfat atau analisis unsur S. Untuk mengetahui perbandingan sulfat dengan unsur lain penyusun senyawa organik lain (C,H,O), maka dilakukan pengujian unsur (C,H,N, S). Dari tiap fraksi diperoleh serapan absorbansi yang menunjukkan bahwa tiap fraksi mengandung ester sulfat. Adanya serapan absorbansi di daerah bilangan gelombang 840 cm^{-1} menyatakan sulfat pada posisi aksial dan serapan absorbansi pada bilangan gelombang 820 cm^{-1} menyatakan sulfat di posisi ekuatorial. Posisi ini akan menunjukkan kereaktifan senyawa fukoidan bila dilakukan uji bioaktivitasnya (Usov & Bilan, 2009).

Berdasarkan hasil pengukuran FT-IR menunjukkan bahwa fraksi (F2- F5), mengandung gugus sulfat, hal ini dibuktikan adanya pita serapan pada panjang gelombang pada 1250-an. Posisi sulfat pada fukoidan yang diperoleh berada pada ekuatorial dengan adanya serapan absorbansi di bilangan gelombang 821 cm^{-1} . Pita serapan pada 3330 cm^{-1} dan 1648 cm^{-1} masing-masing menunjukkan adanya korespondensi ke hidroksil dari golongan karboksil. Pita serapan di sekitar 1610 sampai 1620 cm^{-1} indikasi eksistensi asam uronat. Selanjutnya pada hasil spektra yang diperoleh tidak ditemukan pita serapan disekitar 1720 cm^{-1} yang mengindikasikan tidak ada gugus O-asetil. Bentuk serapan dari FT-IR pada fraksi F2 dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7. Spektrum hasil analisis FT-IR pada fraksi 2 (F2)

4.2.4. Analisis uji sulfat

Hasil analisis ester sulfat menggunakan metode metode BaCl₂ gelatin setelah dimurnikan diperoleh seperti dalam Tabel 4.5. Hasil uji sulfat ini sangat penting untuk mengetahui penyusun fukoidan dan sifat aktifnya. Salah satu penentu sifat aktif fukoidan adalah jumlah sulfat dan posisi sulfat. Analisis sulfat yang diperoleh adalah bentuk BaSO₄ (larutan keruh). Larutan keruh ini sangat mudah diganggu stabilitasnya, sehingga dalam analisisnya dilakukan secara cepat dan diperlakukan sama untuk semua sampel, untuk mengurangi faktor kesalahan dalam analisa. Sulfat dalam fukoidan membuatnya menjadi aktif. Hasil yang diperoleh kadar sulfat tertinggi diperoleh pada fraksi kedua dengan eluen NaCl pada konsentrasi 1-1,5M.

Tabel 4.5. Hasil analisis ester sulfat dari fukoidan yang sudah dimurnikan

Kode sampel	Hasil (ppm)	Ester sulfat (SO ₄ ²⁻) (%) (w/w)
F1	0.962	2.02
F2	4.071	8.55
F3	1.147	2.40
F4	1.255	2.63
F5	1.280	2.69
FK	1.294	2.71

4.2.5. Analisis protein fukoidan

Hasil analisis protein menggunakan metode Lowry-Folin diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 546 nm, dapat dilihat pada Tabel 4.6. Hasil analisis protein ini menunjukkan bahwa fukoidan berasal dari rumput laut coklat masih kontaminan dengan protein hal ini menunjukkan bahwa fukoidan mempunyai ikatan yang kuat dengan protein, walaupun pada prosedur ekstraksi sudah dihilangkan dengan penambahan cetyl piridium

klorida. Tetapi protein yang diperoleh termasuk rendah, hal ini dilakukan untuk mendapatkan fukoidan murni (polisakarida).

Tabel 4.6. Hasil analisis protein dari kelima fraksi fukoidan

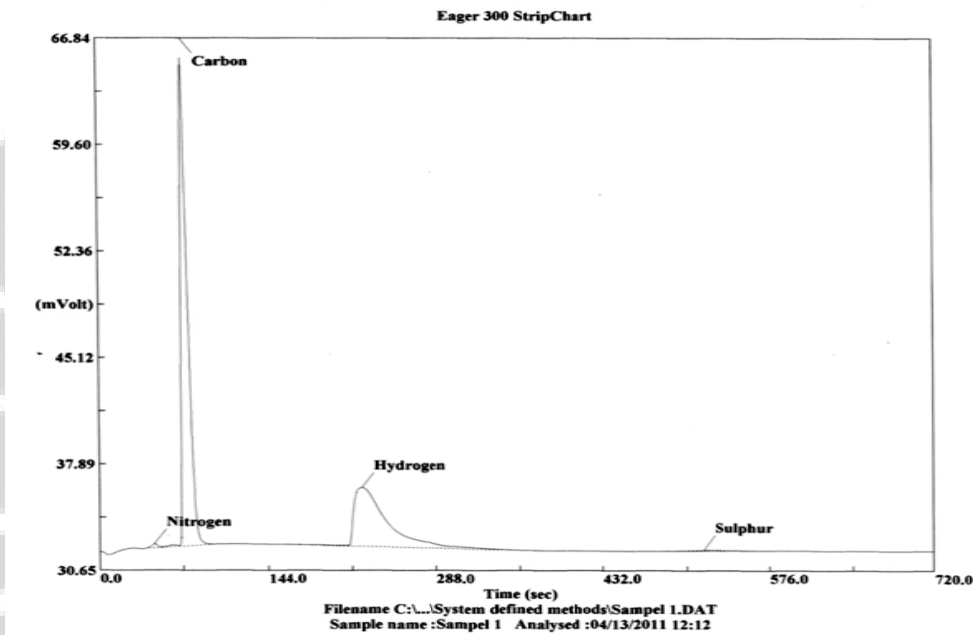
Kode sampel	Protein (ppm)
F1	0.04
F2	0.10
F3	0.02
F4	0.05
F5	0.06
FK	0.06

4.2.6. Analisis unsur organik (C, H, N, S) fukoidan

Hasil analisis unsur C,H,N,S dari fukoidan yang dimurnikan dapat dilihat pada Gambar 4.8. Pada analisa unsur organik dari fukoidan (C,H,N,S) digunakan standar BBOT dengan (2,5-Bis (5-*tert-butyl*-2-*benzo-oxazol*-2-yl) thiophene dengan formula $C_{26}H_{26}N_2O_2S$, bahan ini adalah standar analisa mikro yang biasa digunakan. Berdasarkan hasil puncak kromatogram diperoleh persentasi sebagai berikut : karbon (22,98%), hidrogen (4,40%), nitrogen (0,18 %) dan sulfur (0,78%).

Dari hasil persentasi analisa unsur C, H, N, S diatas bila dibuat dalam bentuk perbandingan mol antara karbon dengan sulfur maka diperoleh perbandingan yaitu 78:1. Bila dianggap satu monomer 6 karbon maka tiap 13 monosakarida terdapat 1 sulfur. Hasil analisis unsur dilakukan untuk memperkuat hasil sulfat yang sudah dilakukan dengan metode turbidimeter. Pengujian unsur hanya dilakukan pada fraksi kedua, karena hasil analisa sulfat yang tertinggi diperoleh pada fraksi kedua. Hasil analisa unsur sulfur yang diperoleh mempunyai korelasi dengan hasil sulfat yang diperoleh pada penentuan uji sulfat dengan

turbidimeter. Sulfat yang terikat pada polisakarida mampu membuat polisakarida tersebut menjadi aktif. Sifat aktif pada polisakarida ini memberikan fungsi seperti antikoagulan (mampu mempercepat interaksi sulfat dengan antitrombin III atau AT-III) dalam Jung *et al*, 2007. Selain unsur sulfat ditemukan, diperoleh juga unsur nitrogen (N) yang merupakan identifikasi adanya protein. Kemungkinan adanya protein dalam bentuk glikoprotein Hal ini ada korelasi dengan diperolehnya protein yang dilakukan dengan metode Lowry-Folin.



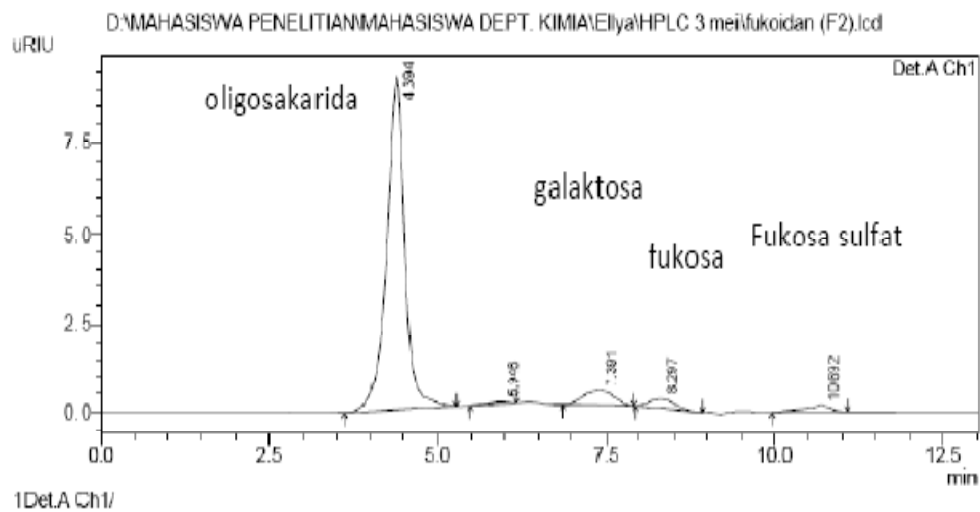
Gambar 4.8. Hasil analisis unsur organik (C,H,N,S) fukoidan

4.2.7. Hidrolisis Fukoidan

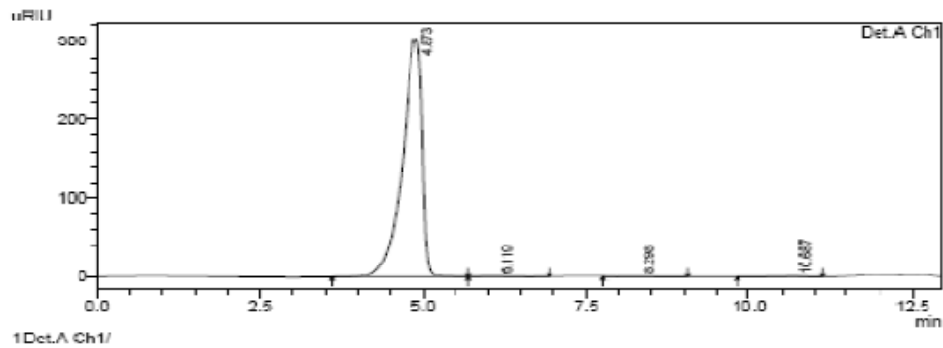
Standar karbohidrat yang digunakan adalah larutan standar fukosa, galaktosa, glukosa, dan xilosa murni. Masing-masing larutan standar tersebut diukur dengan menggunakan HPLC Shimadzu Prominence-020 dengan kolom SCR-101 C Shimadzu Shim-pack untuk karbohidrat dengan detektor refraktif indeks (RID-10A). Larutan standar ini digunakan untuk mengukur hasil hidrolisis dan hasil hidrolisis secara kualitatif dan kuantitatif. Pengukuran secara kualitatif diketahui

dengan melihat waktu retensi yang muncul dari setiap larutan standar, sedangkan pengukuran secara kuantitatif diketahui dengan adanya luas puncak area setelah dibandingkan dengan larutan standar.

Penentuan waktu retensi dari tiap puncak ini berdasarkan pada interaksi gugus hidroksil pada masing-masing gula karbohidrat dengan kolom kalsium. Waktu retensi fukosa 8,299 menit, galaktosa 7,291 menit, glukosa sekitar 7,192 menit dan xilosa 7,186 menit (Gambar 4.9). Berdasarkan hasil hidrolisis yang diperoleh dari fukoidan ada 2 jenis monosakarida yang ditemukan yaitu fukosa dan galaktosa, dan pada waktu retensi 10,692 menit diduga fukosa sulfat. Berdasarkan perbandingan molaritas fukosa, diperoleh bahwa perbandingan fukosa dan galaktosa yaitu 1 : 1,5. Berdasarkan hasil uji literatur bahwa jenis monosakarida penyusun fukoidan dari masing-masing spesies rumput laut coklat berbeda-beda (Bo li, 2008).



Gambar 4.9. Hasil hidrolisis fukoidan yang dimurnikan (F2)



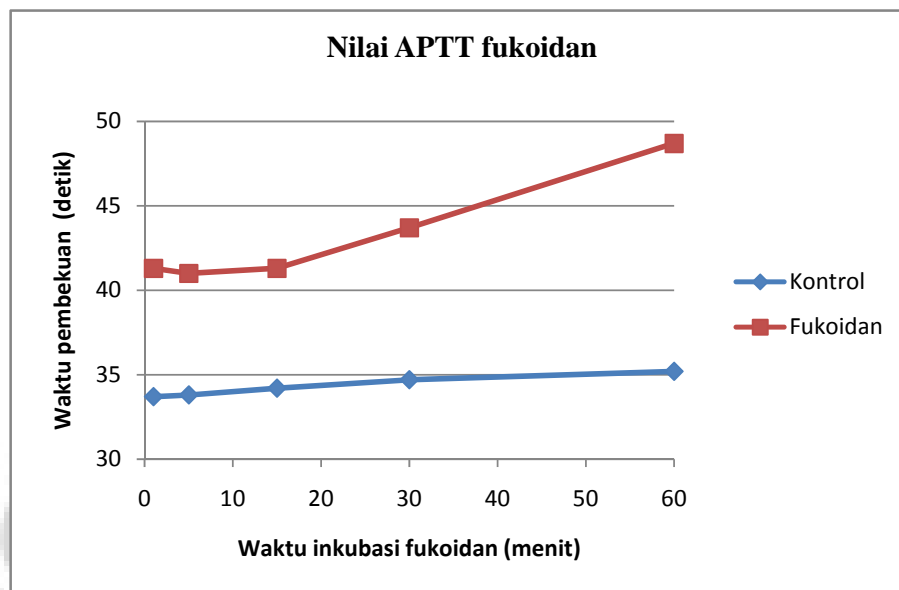
Gambar 4.10. Hasil hidrolisis fukoidan komersil

Berdasarkan hasil hidrolisis fukoidan yang diperoleh terdapat tiga puncak hasil hidrolisis asam yang dilakukan dan ada satu puncak yang mendekati standar yaitu fukosa pada waktu retensi 8,298 dan kemungkinan fukosa sulfat pada waktu retensi 10.687 sedangkan puncak pada waktu retensi 6.110 tidak diketahui.

Berdasarkan literatur di dalam fukoidan komersil diperoleh hanya satu monosakarida yaitu fukosa dan fukosa yang mengandung sulfat (Rez *et al*, 2002). Berdasarkan informasi tersebut ada korelasi antara literatur dengan hasil hidrolisis yang diperoleh.

4.3. Bioaktivitas Fukoidan sebagai Antikoagulan

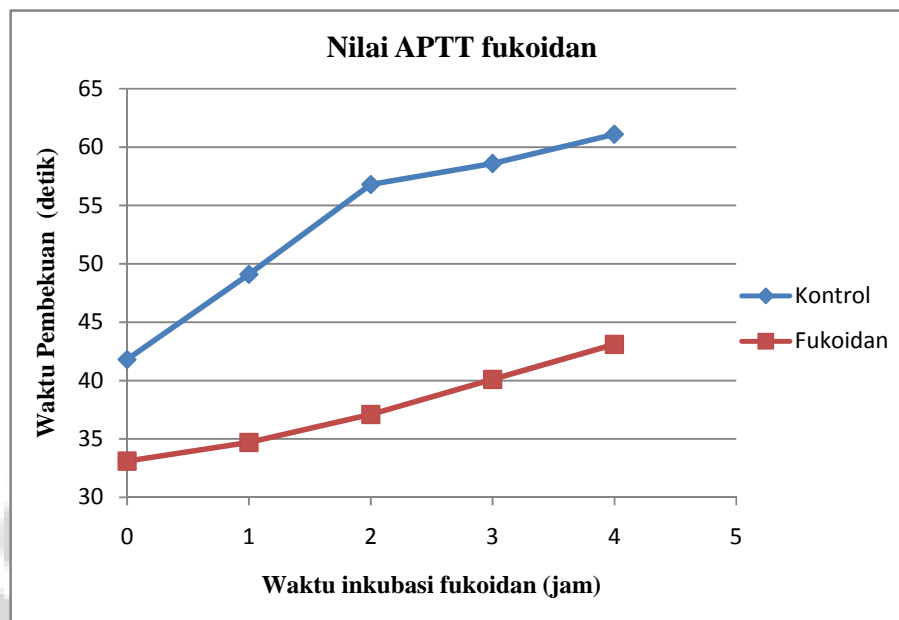
Hasil uji analisis bioaktivitas fukoidan sebagai antikoagulan dilakukan menggunakan metode modifikasi Zoysa *et al* (2008). Untuk mendapatkan waktu optimum inkubasi fukoidan dilakukan dengan memvariasi waktu inkubasi (1, 5, 15, 30, dan 60) menit pada suhu 37 ° C dengan konsentrasi fukoidan 100 µg/mL. Hal ini dilakukan karena pengujian inkubasi bahan antikoagulan secara normal dari beberapa metode pengujian adalah 1 atau 2 menit (Kwak, 2010). Hasil APTT yang diperoleh dari variasi inkubasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Nilai APTT dari variasi inkubasi fukoidan (1, 5, 15, 30, dan 60) menit.

Keterangan : kontrol adalah pengujian APTT plasma darah tanpa fukoidan

Berdasarkan hasil nilai APTT yang diperoleh terjadi kenaikan APTT setelah di inkubasi dari variasi waktu inkubasi yang dilakukan. Kenaikan yang signifikan mulai terjadi setelah 30 menit, sedangkan sebelum 30 menit belum ada kenaikan yang signifikan. Untuk melihat profile nilai APTT maka dilakukan uji optimasi berikutnya dengan menaikkan waktu inkubasi yaitu (1, 2, 3, dan 4) jam pada suhu 37°C dengan konsentrasi fukoidan $100\ \mu\text{g/mL}$. Hasil yang diperoleh dari variasi waktu inkubasi fukoidan diperoleh perpanjangan nilai APTT yang signifikan pada waktu inkubasi 2 dan 4 jam. Hasil nilai APTT ini diperoleh dari satu donor plasma darah manusia tanpa mengetahui jumlah trombositnya sebelumnya, namun berbadan sehat.



Gambar 4.12. Nilai APTT dari variasi inkubasi fukoidan (0, 1,2, 3, dan 4) jam.
Keterangan : kontrol adalah pengujian APTT plasma darah tanpa fukoidan

Waktu optimasi inkubasi perlu diketahui untuk mengetahui waktu kerja fukoidan dalam tubuh, jika fukoidan akan digunakan sebagai terapi antikoagulan. Sehingga diketahui jarak waktu pemberian (konsumsi) bahan antikoagulan (fukoidan) tersebut (Rahayu, 2009).

Tabel 4.7. Hasil uji antikoagulan fukoidan dari *Sargassum classifolium*

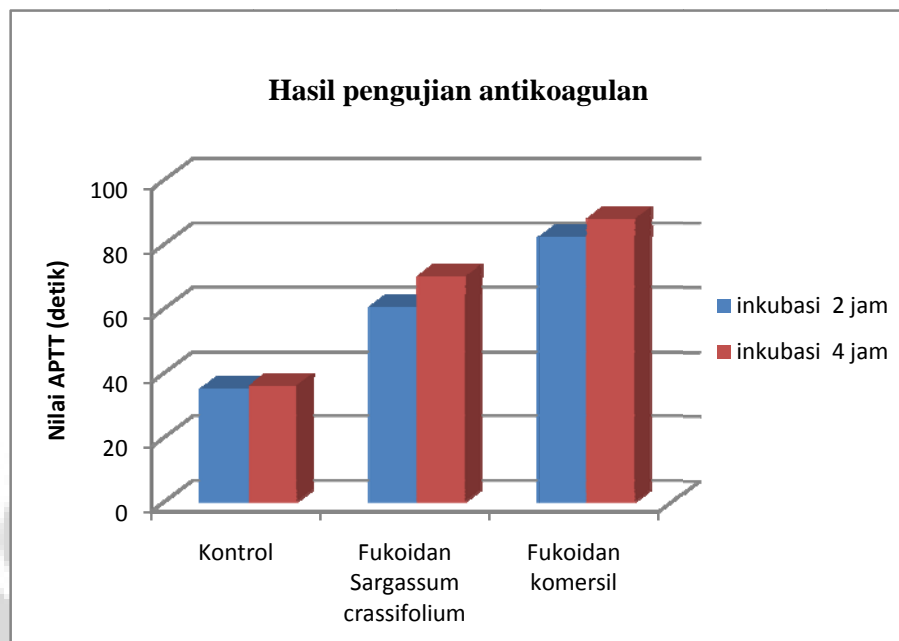
Konsentrasi fukoidan (µg/mL)	Nilai APTT (detik)	
	2 jam	4 jam
100	46.1 ± 5.0	48.2 ± 4.5
200	48.3 ± 5.4	54.9 ± 5.8
300	53.3 ± 7.5	61.8 ± 6.6
400	56.9 ± 7.7	64.7 ± 8.6
Kontrol	35.1 ± 4.5	36.1 ± 4.5

Keterangan : kontrol adalah pengujian APTT plasma darah tanpa fukoidan

Berdasarkan hasil uji optimasi waktu inkubasi fukoidan diperoleh perpanjangan nilai APTT pada jam ke 2 dan 4 secara signifikan. Selanjutnya dilakukan uji variasi konsentrasi fukoidan dari (100, 200, 300 dan 400) µg/mL dengan menggunakan plasma darah dari 5 orang donor dengan tanpa mengetahui jumlah trombositnya sebelum diambil plasmanya namun berbadan sehat. Hasil rata-rata nilai APTT dari 5 orang donor tersebut untuk uji variasi konsentrasi fukoidan dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Berdasarkan uji statistik metode Duncan's diperoleh bahwa antara perlakuan variasi konsentrasi fukoidan dengan kontrol mempunyai perbedaan yang signifikan. Sedangkan antar perlakuan variasi konsentrasi fukoidan yang dilakukan tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap nilai APTT. Hal ini menunjukkan bahwa pemakaian fukoidan sebagai antikoagulan memberikan pengaruh pada nilai APTT nya tetapi variasi konsentrasi fukoidan (100 – 400) µg/mL menunjukkan tidak ada perbedaan pada perpanjangan nilai APTT . Semakin panjang nilai APTT dari sesuatu produk maka semakin tinggi peluang produk tersebut sebagai antikoagulan (Usov dan Bilan, 2009). Kemampuan produk ini (fukoidan) berpotensi sebagai antikoagulan bila nilai APTTnya minimal 1,5 kali dari nilai APTT kontrol (Rahayu, 2009).

Bila dibandingkan antara fukoidan dari rumput laut *Sargassum crassifolium* dengan fukoidan komersil, waktu pembekuan darah yang dihasilkan fukoidan komersil masih lebih tinggi dibandingkan dengan fukoidan dari rumput laut *Sargassum crassifolium*. Hal ini disebabkan kemungkinan karena fukoidan dari rumput laut *Sargassum crassifolium* masih belum murni, hal ini dibuktikan adanya unsur nitrogen dari hasil analisis elementer, selain itu kemungkinan perbedaan kelarutan fukoidan, serta kandungan sulfat yang masih rendah (0,78%) sedangkan pada fukoidan komersil memiliki jumlah sulfat lebih tinggi (berdasarkan penelitian Nishino (2004) bahwa jumlah sulfat pada *Fucus vesiculosus* sebesar 26,3%) faktor-faktor tersebut mengakibatkan aktivitas fukoidan yang diperoleh dari hasil penelitian lebih rendah dari fukoidan komersil.



Gambar 4.13. Perbandingan aktivitas antikoagulan dengan konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$
 Keterangan : kontrol pengujian APTT plasma darah tanpa fukoidan

Penelitian fukoidan komersil ini (*Fucus vesiculosus*) sebagai antikoagulan sudah pernah dipublikasikan oleh Springer *et al.*, (1957) dengan menggunakan heparin sebagai pembanding. Springer *et al.*, menyatakan bahwa aktivitas antikoagulan dari *Fucus vesiculosus* lebih besar dari aktivitas heparin. Sementara Adams dan Thorpe pada 1957 menyatakan bahwa aktivitas *Fucus vesiculosus* sebagai antikoagulan bernilai 8,9 dan heparin 9 units/mg (Shanmugan dan Mody, 2000).

Pemakaian konsentrasi fukoidan (100 – 400) $\mu\text{g/mL}$ dihitung berdasarkan volume darah manusia yaitu untuk laki – laki 4,5 L dan perempuan mencapai 3,6 L. Sekitar 66-85% dari darah tersebut berbentuk plasma (fase cair darah) yang berfungsi untuk sebagai system imun humoral, mempertahankan tekanan koloid osmotik yang menjaga agar volume darah selalu konstan, mentranspor zat yang tidak larut dalam air. Ikatan hormon, obat dan racun dengan protein plasma darah akan mempengaruhi kinerjanya. Secara umum kadar bahan aktif untuk obat herbal sekitar 500 $\mu\text{g/mL}$. Pemakaian jumlah bahan aktif ini harus melalui uji toksisitas dan uji *in vivo* terlebih dahulu sebelum digunakan ke manusia (Wahyono, 2009; Silbernagl, 2006), sehingga dalam penelitian ini pemakaian variasi konsentrasi

fukoidan digunakan mendekati nilai maksimal pemakaian senyawa bioaktif (500 $\mu\text{g/mL}$).

Faktor yang mempengaruhi fukoidan mampu bertindak sebagai antikoagulan karena mempunyai gugus sulfat sebagai gugus aktif dari fukoidan. Gugus sulfat ini akan berinteraksi dengan antitrombin III (AT-III) dan heparin ko-faktor (HC – II). Trombin dapat menghambat konversi fibrinogen ke fibrin. Antitrombin juga menghambat koagulasi serine protease (Usov dan Bilan, 2009). Interaksi langsung fukoidan dengan antitrombin dan serine-protease akan mengakibatkan enzim menjadi tidak aktif. Efek antikoagulan ini disebabkan oleh 2,3 disulfat dari fukosa yang dimiliki oleh fukoidan (Chevolot, 1999). Sehingga semakin banyak gugus sulfatnya maka semakin tinggi sifat antikoagulannya. Namun berat molekul yang semakin tinggi tidak menjadi jaminan semakin tinggi sifat antikoagulannya. Jika fukoidan memiliki kerangka α -D- asam glukoronat dapat menurunkan sifat antikoagulannya (Ushakova *et al*, 2008).

Pembekuan darah adalah serangkaian reaksi enzimatik dimana proenzim yang belum aktif diubah ke bentuk enzim yang aktif; kebalikannya, merubah enzim yang aktif ke bentuk tidak aktif, pada tahap selanjutnya adalah konversi fibrinogen ke fibrin dan polimerisasi ini ke bentuk ikatan silang dan selanjutnya terjadi pembekuan (Isassi,*et al* 2004).

Jalur eksternal dari pembekuan terjadi ketika faktor plasma berinteraksi dengan jaringan protrombin dan jalur internal terjadi ketika faktor plasma berinteraksi dengan fosfolipid, pertemuan kedua jalur ini akan mengubah fibrinogen ke fibrin melalui trombin. Melalui kejadian ini fukoidan dapat bekerja pada kedua jalur ini, pengaruh aliran pembekuan dari titik pertemuan kedua jalur tersebut mentransformasi fibrinogen ke fibrin. Selain itu kemungkinan fukoidan dapat berinteraksi pada banyak enzim atau substrat penghambat transformasi protrombin ke trombin atau proses aktivasi fibrinogen ke fibrin (Girard & Broze, 1993).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Total rendemen fukoidan yang diperoleh sebesar 0,87% dari berat kering (2,628 g).
2. Berat molekul fukoidan yang diperoleh berada di sekitar $(5,8 - 7,71) \times 10^4$ Dalton, sementara mendekati berat molekul fukoidan komersil $7,64 \times 10^4$ Dalton
3. Hasil analisis FT-IR menunjukkan adanya gugus sulfat pada fukoidan dengan adanya pita serapan pada panjang gelombang $820 - 837 \text{ cm}^{-1}$.
4. Perbandingan molar antara karbon dengan sulfur 78:1. Bila dianggap satu monomer 6 karbon maka tiap 13 monomer terdapat 1 sulfur.
5. Monosakarida penyusun fukoidan yang berhasil ditemukan adalah fukosa dan galaktosa dengan rasio 1:1,5.
6. Hasil nilai APTT fukoidan terhadap plasma darah menunjukkan fukoidan berpotensi sebagai antikoagulan, minimal konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$ setelah inkubasi 2 atau 4 jam.

5.2. Saran

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan validasi dari berbagai metode ekstraksi dan pemurnian fukoidan disertai variasi resin penukar ion untuk mendapatkan fukoidan yang lebih murni dari hasil penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Albuquerque, I.R.L.; Queiroz, K.C.S.; Alves, L.G.; Santos, E.A.; Leite, E.L.; Rocha, H.A.O. 2004. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37, 167-171.
- Anno, K.; Terahata, H.; Hayashi, Y. 1966, Isolation and purification of fucoidin from brown seaweed *Pelvetia wrightii*. *Agri. Biol. Chem.* 30, 495-499.
- Athukorala Yasantha, Lee Ki-Wan, Kim Se-Kwon, Jeon You-Jin., 2006. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea., *J. Bioresource Technology*, Elsevier. Pp.1-6
- Bakunina, I. Y., Nedashkovskaya, O. I., Alekseeva, S. A., Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Gorshkova, N. M., Isakov, V. V., Zvyagintseva, T. N., and Mikhailov, V. V. (2002). Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*. *Microbiology (Moscow, Russian Federation) (Translation of Mikrobiologiya)* 71, 41-47.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., and Usov, A. I. 2004. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydrate Research* 339, 511-517.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., and Usov, A. I. (2006). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydr Res* 341, 238-45.
- Berteau, O., and Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* 13, 29R-40R.
- Chandía, N.P.; Matsuhiro, B. 2008. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 42, 235-240.
- Chevolot, L.; Foucault, A.; Chauber, F. 1999, Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* 319, 154-165.
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N.E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., and Nifantiev, N. E. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* 17, 541-552.
- Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., Barbeyron, T., Yvin, J.-C., and Kloareg, B. (2006). Isolation and Culture of a Marine Bacterium Degrading the Sulfated Fucans from Marine Brown Algae. *Marine Biotechnology* 8, 27-39.

- Dobashi, K.; Nishino, T.; Fujihara, M. 1989. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.*, 194, 315-320.
- Duarte, M.; Cardoso, M.; Nosedá, M. . 2001., Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.*, 333, 281-293.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-6.
- Franck henneguart, Elaine O'connell, John Spence and Maria G Tuohy Oilean, Glas teranta. 2004 Aqua feed: Formulation and Beyond, Vol I, Issue 4. Page 1-5
- Grachev, A.A.; Gerbst, A.G.; Ustyuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Usov, A.I.; Nifantiev, N.E. 2006, NMR investigation of the influence of sulfate groups at C-2 and C-4 on the conformational behavior of fucoidan fragments with homo-(1→3)-linked backbone. *J. Carbohydr. Chem.* 25, 315-330.
- Holtkamp, A., 2009., Isolation, Characterisation, Modification and Application of Fucoidan from *Fucus vesiculosus*., Wissenschaftliche Mitarbeiterin zum Zwecke der Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig, Abteilung Biotechnologie. Pp.28-40
- Johnson E.L. dan Stevenson K., 1994. Dasar Kromatografi Cair., ITB Press., Bandung. Pp:153-168.
- Khopkar ., S.M., 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik., UI Press. Jakarta. Pp:175-181
- Kim W.J et al. 2007. Purification and anticoagulant activity of fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophyll. *Journal Alga.* Vol.22 (3). Pp. 247-252.
- Kwak Kyu –Won. 2010. Biological effects of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* on thrombosis and vascular cells. *The Korean Journal of hematology.* Vol 45. No. 1. pp. 51-57
- Kylin, H. (1918). Biochemistry of seaweeds. *Z. physiol. Chem.* 101, 236-47.
- Lee, J.B.; Hayashi, K.; Hashimoto, M.; Nakano, T.; Hayashi, T. 2004. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 1091-1094.
- Li, Bo.; Rui, X.Z.; Xin, J.W. 2008. Anticoagulant activity of fucoidan from *Hizikia fusiforme*. *Agro Food Ind. Hi-tech.* 19, 22-24.
- Mori Hiroe and Nisizawa Kazutosi., 1982. Sugar Constituents of Sulfated Polysaccharides from the Fronds of *Sargassum ringgoldianum*., Buletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 48 (7), pp: 981-986.

- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., 2003., Biokimia Harper. Terjemahan. Penerbit Buku Kedokteran. Pp: 402-438.
- Mulloy, B., Ribeiro, A.-C., Alves, A.-P., Vieira, R. P., and Mourao, P. A. S. (1994). Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *Journal of Biological Chemistry* 269, 22113-23.
- Nishino, T., Aizu, Y., and Nagumo, T. (1991). The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 791-6.
- Nishino T.; Nishioka, C.; Ura, H. 1994, Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.* 255, 213-224.
- Pereira M S., Fábio R.Melo, and Paulo A.S.Mourão1. 2002. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology* vol. 12 no. 10 pp. 573–580, Page : 1-8
- Ponce, N.M.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.*,338, 153-165.
- Qiu, X.D.; Amarasekara, A.; Doctor, V. 2006. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydrate Polymers.* 63, 224-228.
- Rahayu D.S. 2009. Hemostasis dan Trombosis., Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Edisi keempat., pp: 1-5,113-122.
- Ribeiro, A. C., Vieira, R. P., Mourao, P. A. S., and Mulloy, B. (1994). A sulfated alpha-L-fucan from sea cucumber. *Carbohydrate Research* 255, 225-40.
- Rez P.R., Ahrazem O., and Leal J.A. 2002, Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus vesiculosus* *J. Agric. Food Chem.* 50, 840-845.
- Sakai, T., Kimura, H., and Kato, I. (2002). A marine strain of Flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan. *Marine Biotechnology* 4, 399-405.
- Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K., and Kato, I. (2003b). Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Marine Biotechnology* 5, 536-544.
- Shanmugam, M., and Mody, K. H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science* 79, 1672-1683.
- Shenchenko N.M., et al. 2007. Polysaccharide and lipid composition of the Brown seaweed *Laminaria gurganovae*. *Russian journal of Bioorganic chemistry.* ISSN 1068. Vol.33. No. 1. Pp. 96-107.

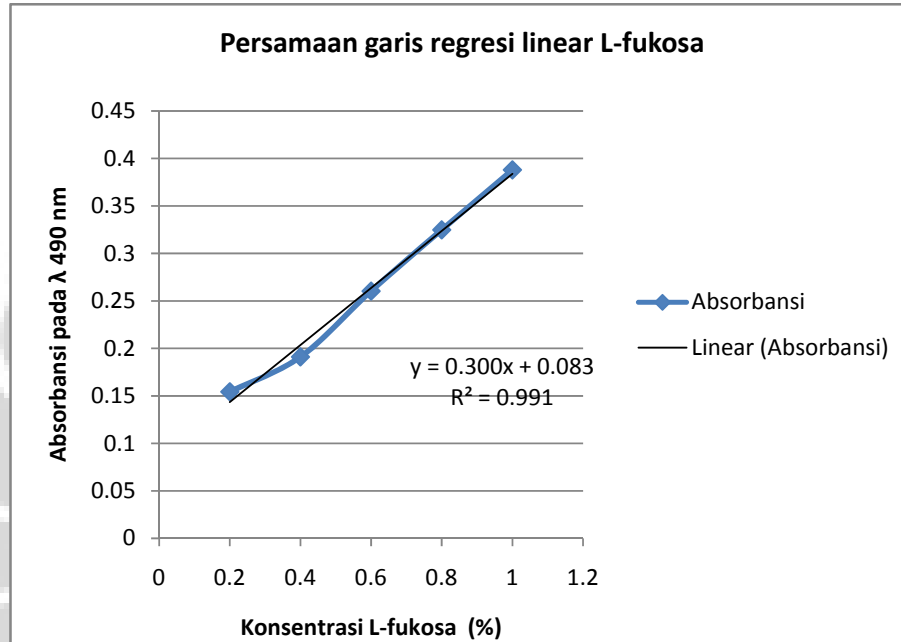
- Sheng, P.X., Ting, Y.P., Chen, J.P. and Hong, L. 2004. Sorption of lead, copper, cadmium, Zinc and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *J. Coll. Inter. Sci.*, 275:131–41.
- Silbernagl S and Florian L. 2006. Patofisiologi. Terjemahan . Penerbit Buku kedokteran. Cetakan pertama.pp.28, 60-61.
- Silva T.M.A. et al. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan the brown seaweed *Padina gymnospora* . Brazilian Journal of Medical and Biological Research. ISSN 0100-879X. 38. Pp.523-533.
- Springer, G. F., Wurzel, H. A., McNeal, G. M. J., Ansell, N. J., and Doughty, M. F. (1957).
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi.1984. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Takeshi Sakai, Ishizuka K, Kato I. 2003. Isolation and characterization of a fukoidan-degrading marine bacterium. *Marine Biotechnology*, 5, pp.409-416.
- Usov, A. I., Smirnova, G. P., Kamenarska, Z., Dimitrova-Konaklieva, S., Stefanov, K. L., and Popov, S. S. (2004). Polar constituents of brown seaweed *Colpomenia peregrina* (Sauv.) Hamel from the Black Sea. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry (Translation of Bioorganicheskaya Khimiya)* 30, 161-167.
- Usov A.I and Bilan M.I., 2009. Fucoidan – sulfated polysaccharides of brown algae., *Russian chemical reviews* 78 (8) 785-799.
- Voet, D., and Voet, J. G., 2004. Solutions Manual to Accompany Biochemistry (3rd ed.), John Wiley & Sons.
- Wang Jing, et al. 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan and fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Journal Biological macromolecules* 46. Elsevier . pp. 6-12.
- Wahyono J.S.U., 2009. Peran Farmakokinetika Klinik pada Terapi Kuantitatif Obat Herbal., UGM., pp: 1-26.
- Wolkers, W.F., Oliver, A.E., Tablin, F. and Crowe, J.H. 2004. A fourier transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. *Carb. Res.*,339:1077–85.
- Yunizal., 2004. Teknologi Pengolahan Alginat., Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan., Jakarta., ISBN 979-97355-9-9., pp: 6-12.
- Zheng, J.; Wang, Y.; Qian, J.J. 2002, Isolation, purification and the anticoagulant activities of fucoidan. *J. Mol. Sci.* 18, 109-112.

Zoysa, M.; Nikapitiya, C.; Jeon, Y.J.; Jee, Y.; Lee, J. 2008. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharide isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum*. *J. Appl. Phycol.*, 20, 67-74.



LAMPIRAN 1

Kurva kalibrasi standar fukosa



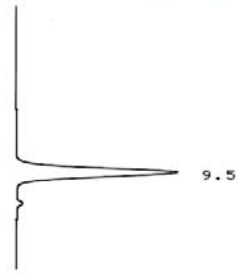
LAMPIRAN 2

Profil kromatogram penentuan berat molekul

1. Standar Pullulan

1.1. Kromatogram P10

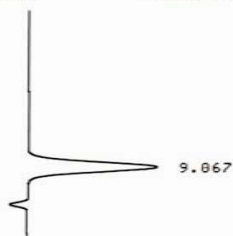
STOP.TM(0) 15
STD P 10
ZERO
START
10/10/13 11:06:28



CHROMATOPAC	C-R6A	FILE	0			
SAMPLE NO	0	METHOD	41			
REPORT NO	34564					
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	9.5	62805			100	
TOTAL		62805			100	
ZERO						

1.2. Kromatogram P20

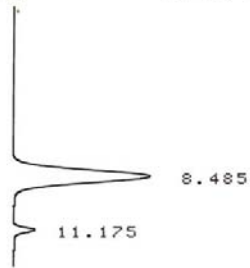
STD P20 20UL
ZERO
STOP.TM(0)=13
START
10/10/13 11:23:49



CHROMATOPAC	C-R6A	FILE	0			
SAMPLE NO	0	METHOD	41			
REPORT NO	34565					
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	9.067	61639			100	
TOTAL		61639			100	

1.3. Kromatogram P50

7STD P50 20UL
 ZERO
 START
 10/10/13 11:37:51

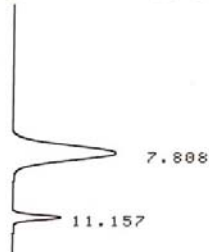


CHROMATOPAC C-R6A FILE METHOD 0 41
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34566

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.485	58077			94.1433	
2	11.175	3613			5.8567	
TOTAL		61690			100	

1.4. Kromatogram P100

STD P100 20UL
 ZERO
 START
 10/10/13 11:51:46

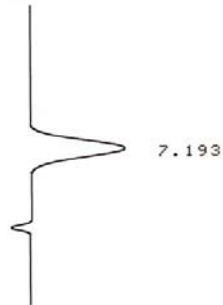


CHROMATOPAC C-R6A FILE METHOD 0 41
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34567

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.808	54307			84.8598	
2	11.157	9689			15.1402	
TOTAL		63996			100	

1.5. Kromatogram P200

STD P 200 20UL
ZERO
START
10/10/13 14:09:33

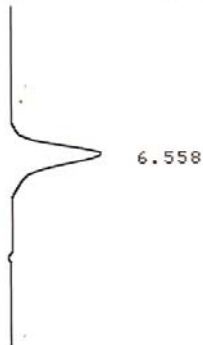


CHROMATOPAC	C-R6A	FILE	0
SAMPLE NO	0	METHOD	41
REPORT NO	34575		

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.193	52415			100	
TOTAL		52415			100	

1.6. Kromatogram P400

7STD 400 20UL
ZERO
START
10/10/13 14:26:08

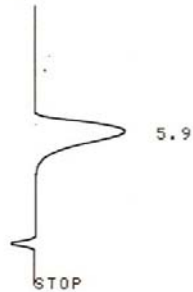


CHROMATOPAC	C-R6A	FILE	0
SAMPLE NO	0	METHOD	41
REPORT NO	34576		

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.558	44236			100	
TOTAL		44236			100	

1.7. Kromatogram P800

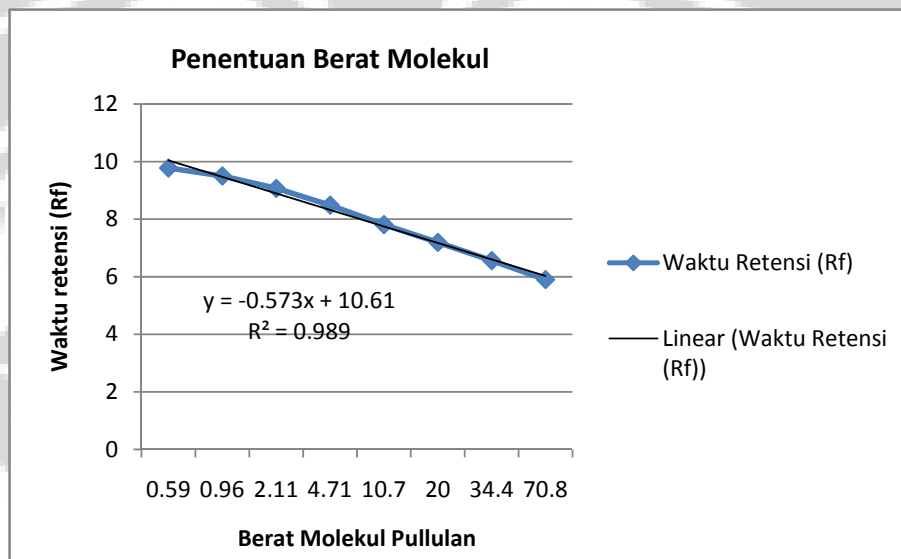
7STD P800 20UL
ZERO
START
10/10/13 14:42:12



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.9	64892			100	
TOTAL		64892			100	

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 34577
FILE METHOD 0 41

2. Kurva kalibrasi standar Pullulan



3. Fukoidan dari masing-masing fraksi

3.1. Kromatogram fraksi 1 (F1)

7CTH F1 20UL
 ZERO
 START
 10/10/13 12:35:52

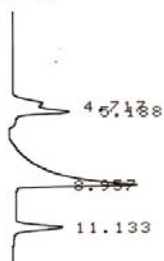


CHROMATOPAC C-R6A FILE METHOD 0 41
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34569

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	8.392	9026			59.2836	
2	11.14	6199			40.7164	
TOTAL		15224			100	

3.2. Kromatogram fraksi 3 (F3)

7CTH F3 20UL
 ZERO
 START
 10/10/13 13:04:39

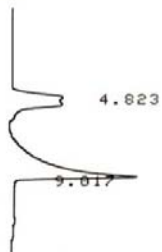


CHROMATOPAC C-R6A FILE METHOD 0 41
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34571

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.717	4775			11.1276	
2	5.188	9382	Y		21.6761	
3	8.957	19691			45.8838	
4	11.133	9146			21.3125	
TOTAL		42914			100	

3.3. Kromatogram fraksi 4 (F4)

CTH F4 20UL
 ZERO
 START
 10/10/13 13:19:32



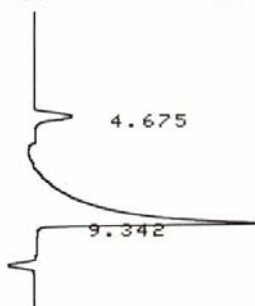
CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34572

FILE METHOD 0 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.823	2883			7.6817	
2	9.017	34650			92.3183	
TOTAL		37533			100	

3.4. Kromatogram fraksi 5 (F5)

CTH F5 20VUL
 ZERO
 START
 10/10/13 13:38:51



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 34573

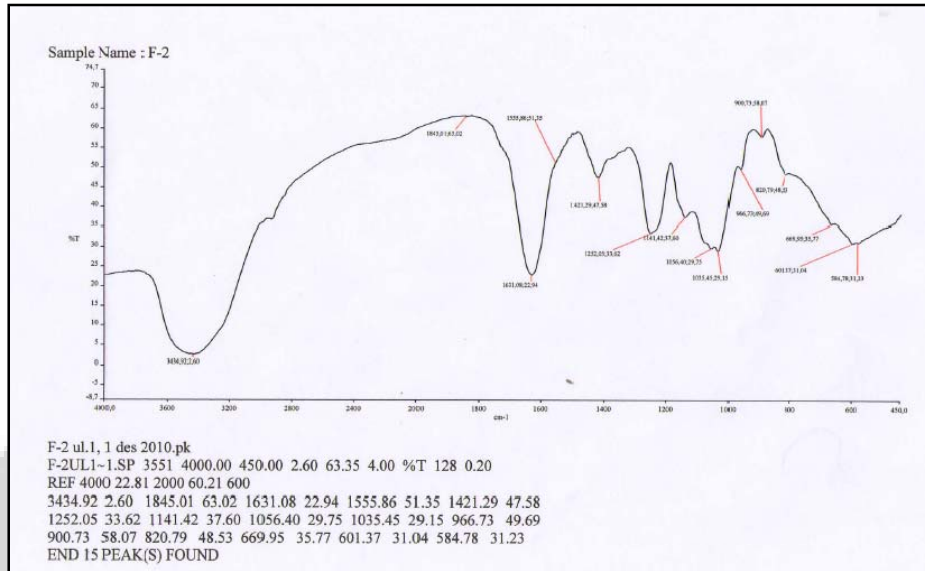
FILE METHOD 0 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.675	6582			10.6193	
2	9.342	55396			89.3807	
TOTAL		61977			100	

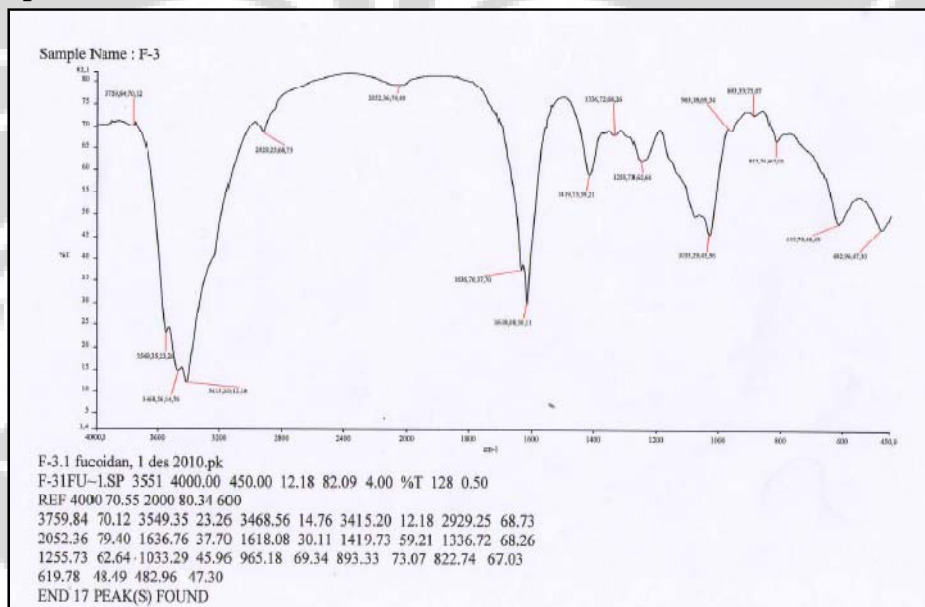
LAMPIRAN 3

Spektrum masing-masing fraksi dari analisis FT-IR

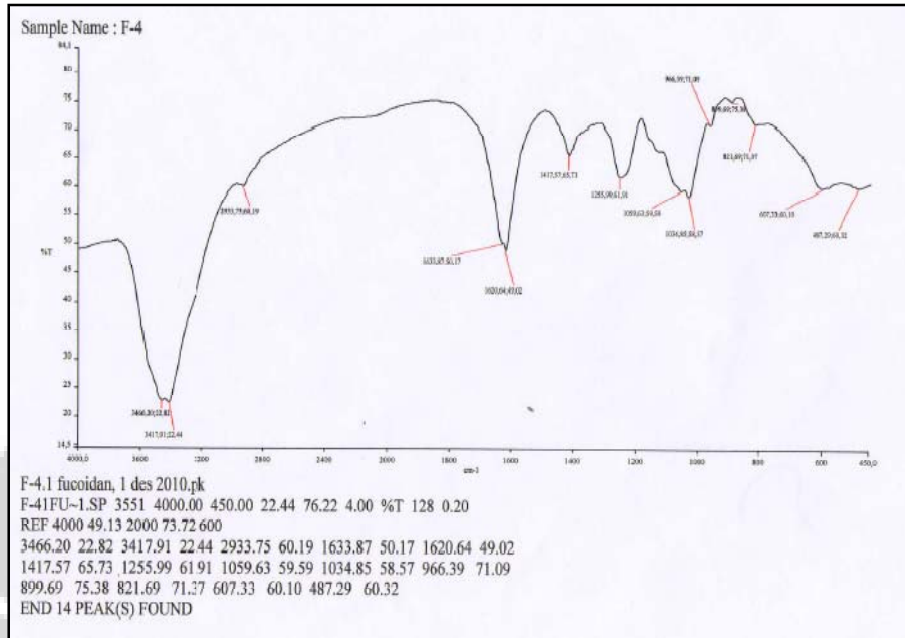
1. Spektrum Fraksi 1 (F1)



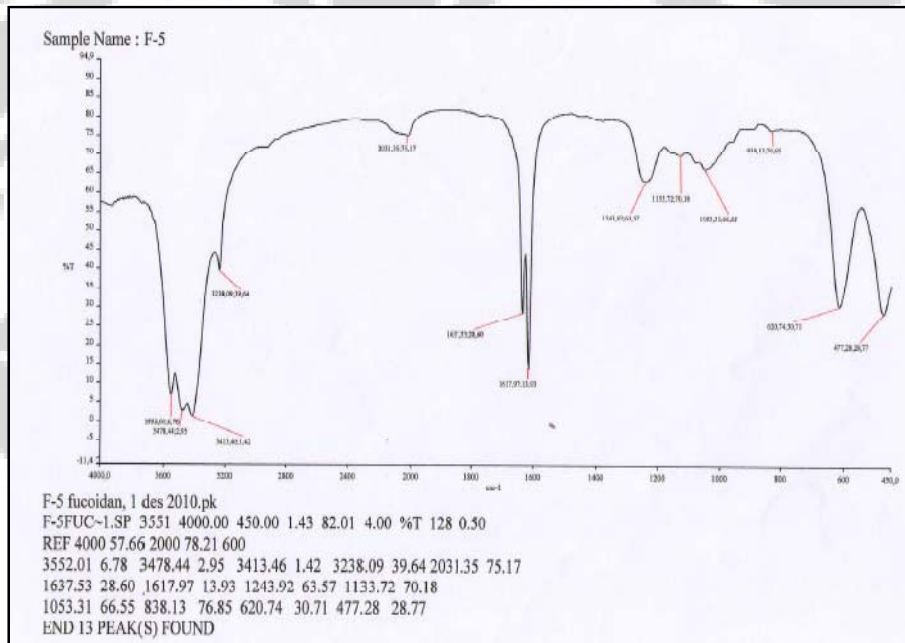
2. Spektrum Fraksi 3 (F3)



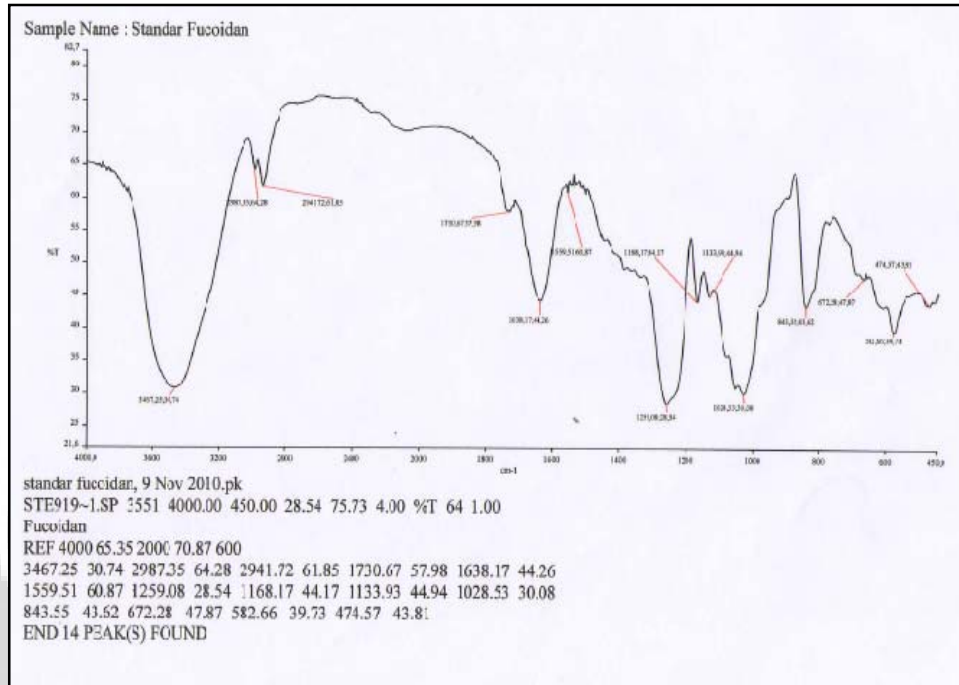
3. Spektrum Fraksi 4 (F4)



4. Spektrum Fraksi 5 (F5)



5. Spektrum Fukoidan komersil (FK)



LAMPIRAN 4

Penentuan kadar sulfat menggunakan turbidimeter

Preparasi sampel yang mau diukur:

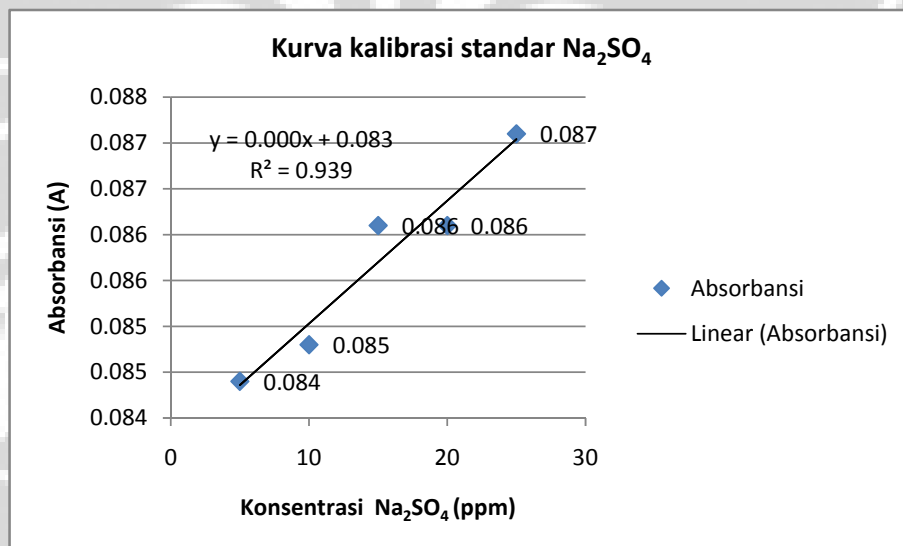
1 mL sampel + 1,4 mL TCA 4% + 1 mL BaCl₂ – gelatin, langsung diukur pada $\lambda = 420$ nm.

Blank : 1 mL aquabidest + 1,4 mL TCA 4% + 1 mL BaCl₂ – gelatin

Pembuatan larutan baku Na₂SO₄ 1000 ppm

Dilarutkan 0,1479 g natrium sulfat (Na₂SO₄) anhidrat dalam aquabidest dan diencerkan sampai 1000 mL.

Untuk pembuatan larutan standar diencerkan dengan variasi konsentrasi (5, 10, 15, 20, 25) ppm.



LAMPIRAN 5

Penentuan Kadar Protein menggunakan Uji Lowry – Folin

1. Pembuatan larutan Lowry – Folin

Pewarna Lowry :

Larutan A : Na_2CO_3 10 % dalam NaOH 0,5 M

Larutan B : Na K-tartrat 5 g dalam 25 ml H_2O

Larutan C : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g dalam 25 ml H_2O

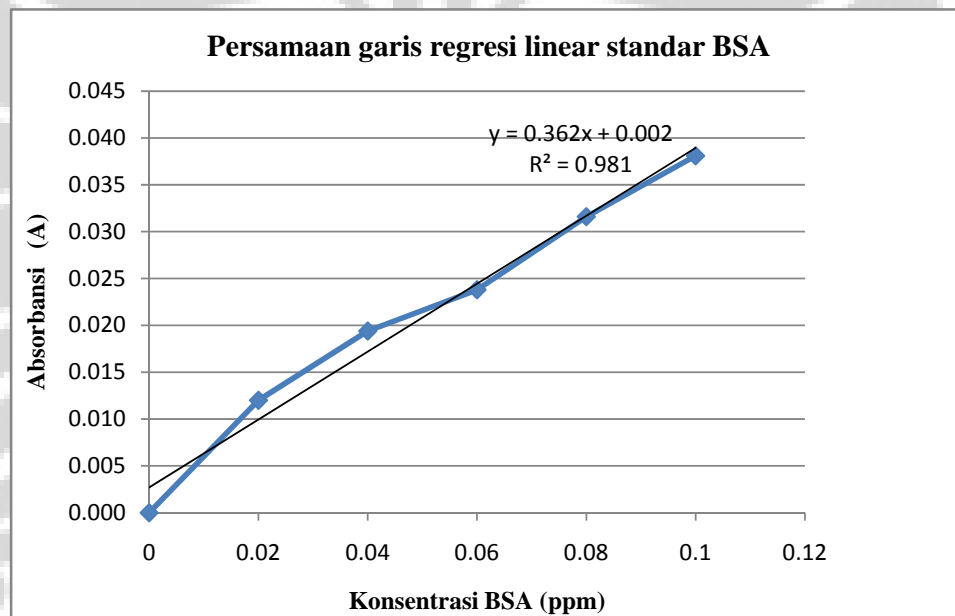
Pewarna Lowry : 15 ml larutan A + 0,75 ml larutan B + 0,75 ml larutan C (20:1:1)

Pewarna Folin : 5 ml pereaksi Folin komersil (E.Merck) + 50 ml H_2O

Perwarna Folin mengandung phenol 2N

Blanko : 0,1 ml H_2O + 0,9 ml Lowry

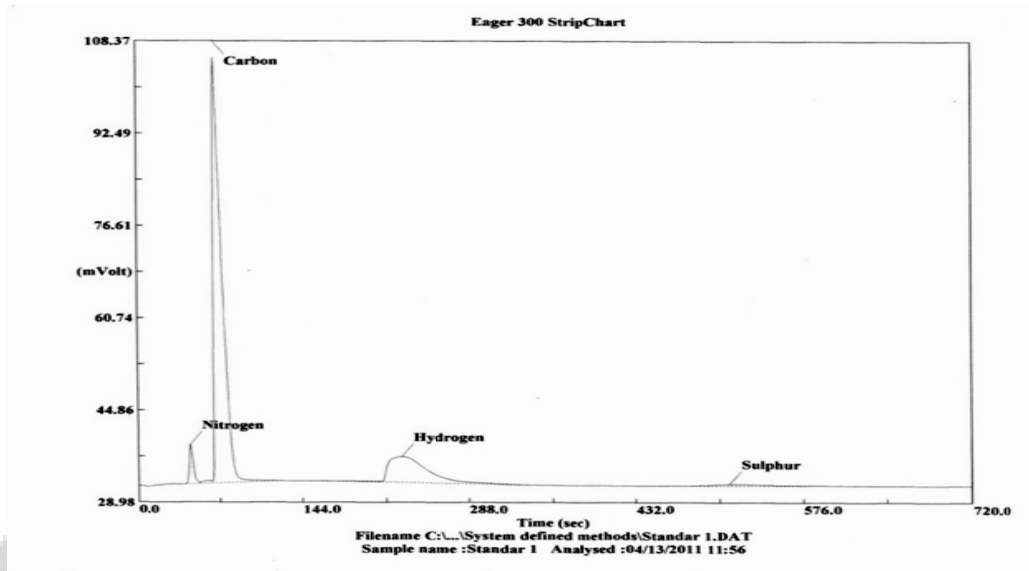
2. Kurva kalibrasi standar BSA (*bovine serum albumin*)



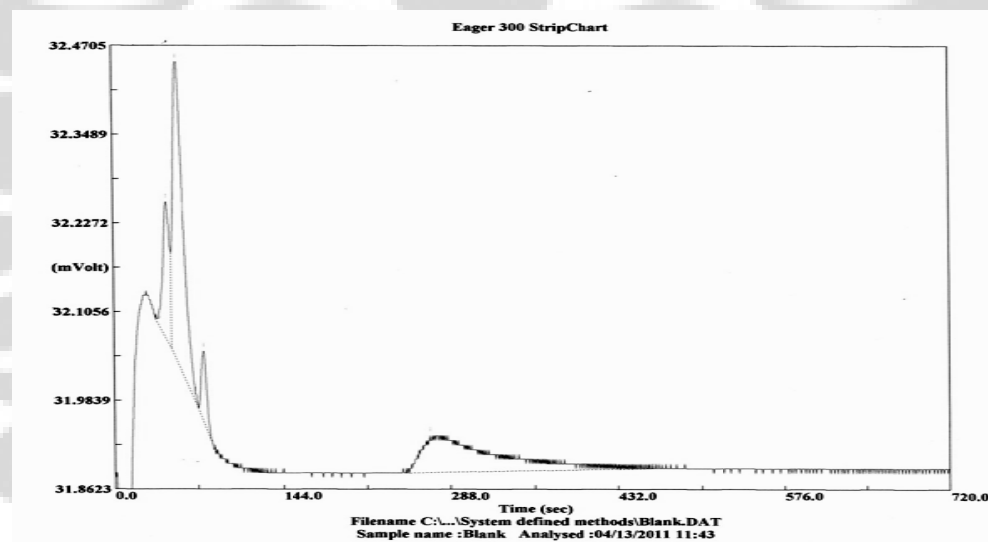
LAMPIRAN 6

Kromatogram dari Analisis Unsur Organik (C, H, N, S)

1. Gambar kromatogram blanko (tanpa sampel)



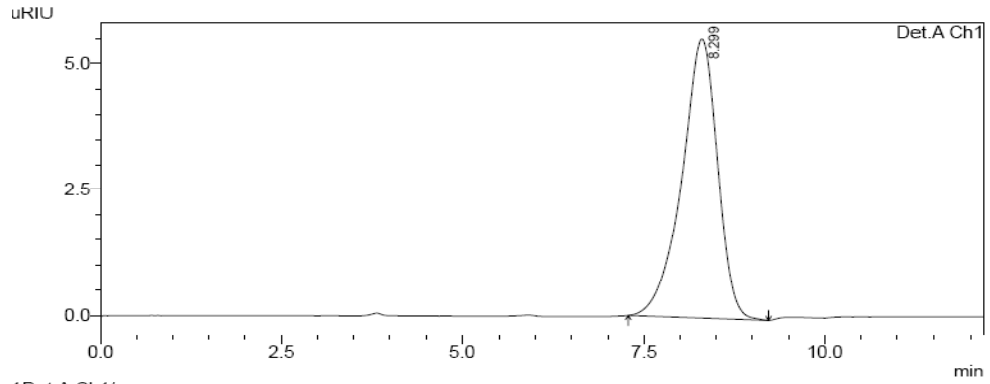
- Gambar kromatogram standar BBOT ((2,5-Bis(5-tert-butyl-2-benzoxazol-z-yl) thiophene dengan formula $C_{26}H_{26}N_2O_2S$



LAMPIRAN 7

Kromatogram larutan standar monosakarida

- Larutan standar fukosa 1000 ppm

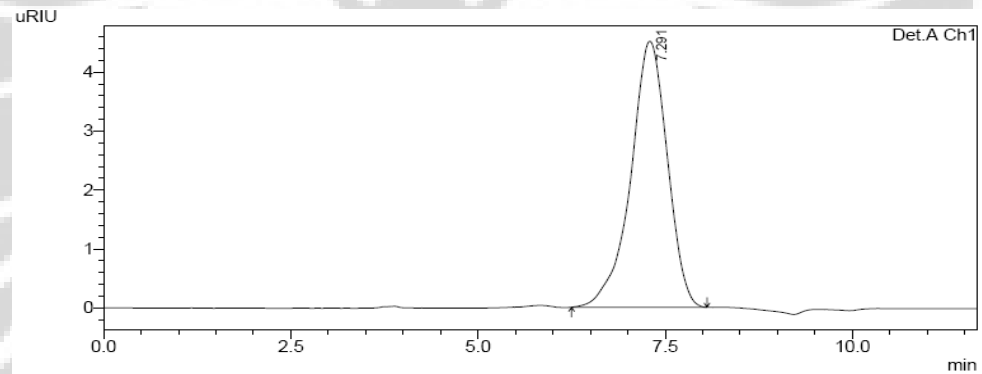


1Det.A Ch1/

Results>

PeakTable						
Detector A Ch1						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	
1	8.299	190515	5538	100.000	100.000	
Total		190515	5538	100.000	100.000	

2. Larutan standar galaktosa 1000 ppm

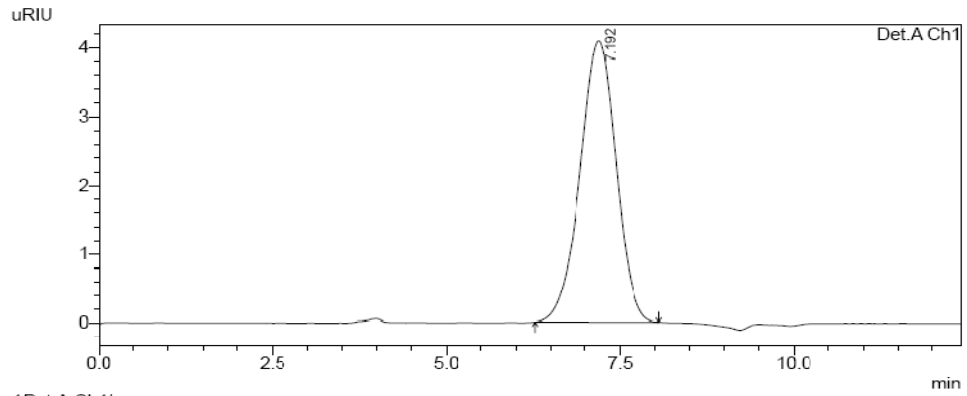


1Det.A Ch1/

Results>

PeakTable						
Detector A Ch1						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	
1	7.291	153752	4511	100.000	100.000	
Total		153752	4511	100.000	100.000	

3. Larutan standar glukosa 1000 ppm

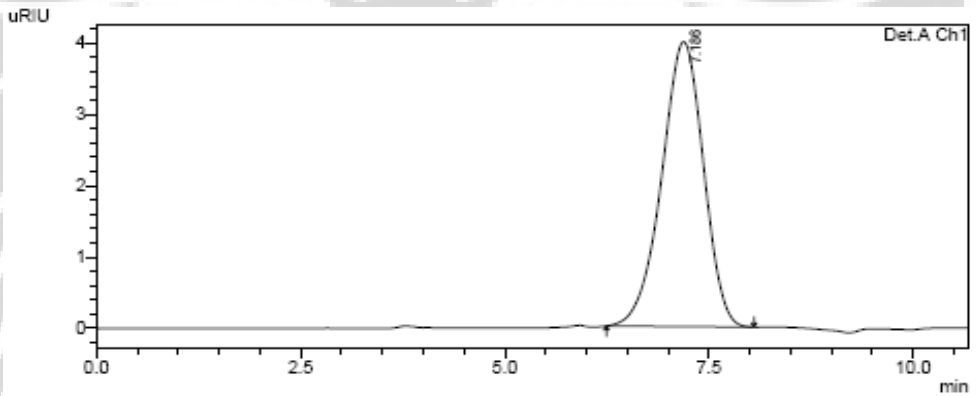


1Det.A Ch1/

<Results>

Detector A Ch1					
PeakTable					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.192	147672	4084	100.000	100.000
Total		147672	4084	100.000	100.000

4. Larutan standar xilosa 1000 ppm



1Det.A Ch1/

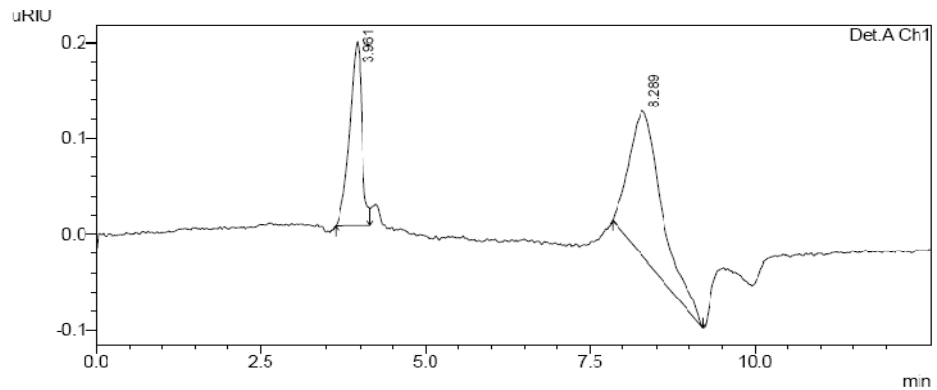
Results>

Detector A Ch1					
PeakTable					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	7.186	142496	3994	100.000	100.000
Total		142496	3994	100.000	100.000

LAMPIRAN 8

Kromatogram variasi larutan standar fukosa

1. Larutan fukosa 20 ppm

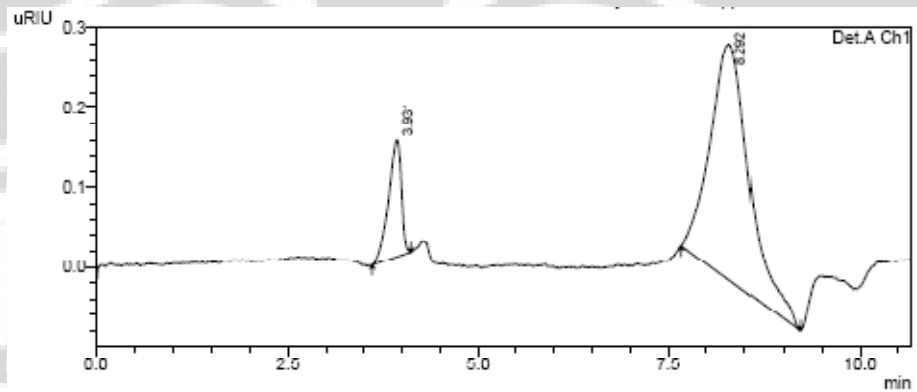


1Det.A Ch1/

Results>

PeakTable					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.961	2438	192	32.046	56.048
2	8.289	5171	150	67.954	43.952
Total		7609	342	100.000	100.000

2. Larutan fukosa 40 ppm

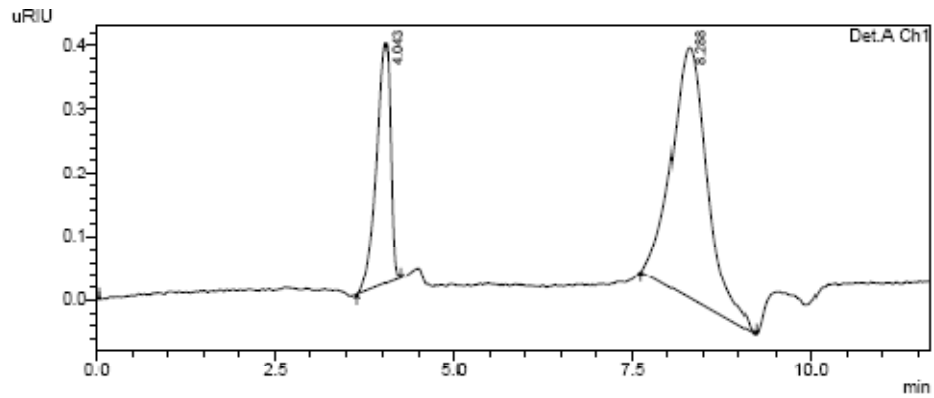


1Det.A Ch1/

Results>

PeakTable					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.931	1724	147	14.227	33.161
2	8.292	10395	296	85.773	66.839
Total		12120	443	100.000	100.000

3. Larutan fukosa 60 ppm

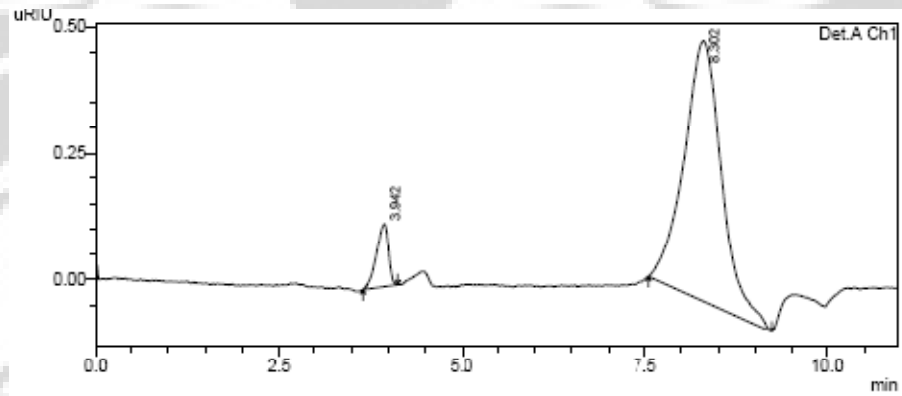


1Det.A Ch1/
Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.043	4788	378	25.817	49.033
2	8.288	13758	393	74.183	50.967
Total		18546	771	100.000	100.000

4. Larutan fukosa 80 ppm

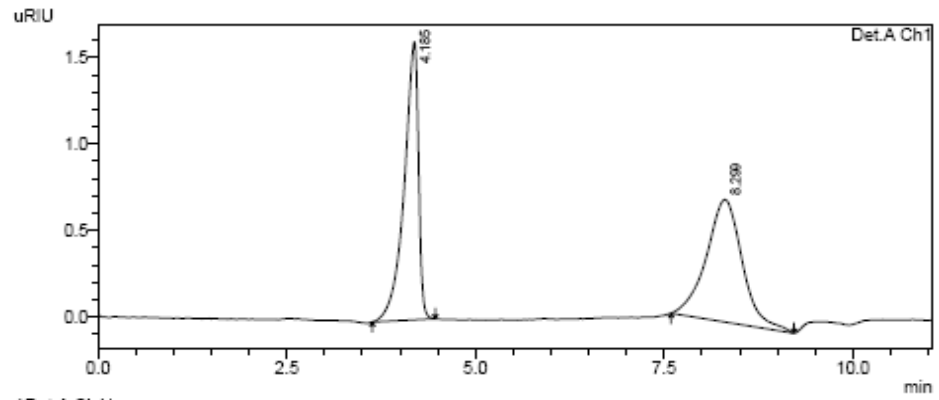


1Det.A Ch1/
Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.942	1405	125	7.157	19.553
2	8.302	18204	515	92.843	80.447
Total		19608	641	100.000	100.000

5. Larutan fukosa 100 ppm

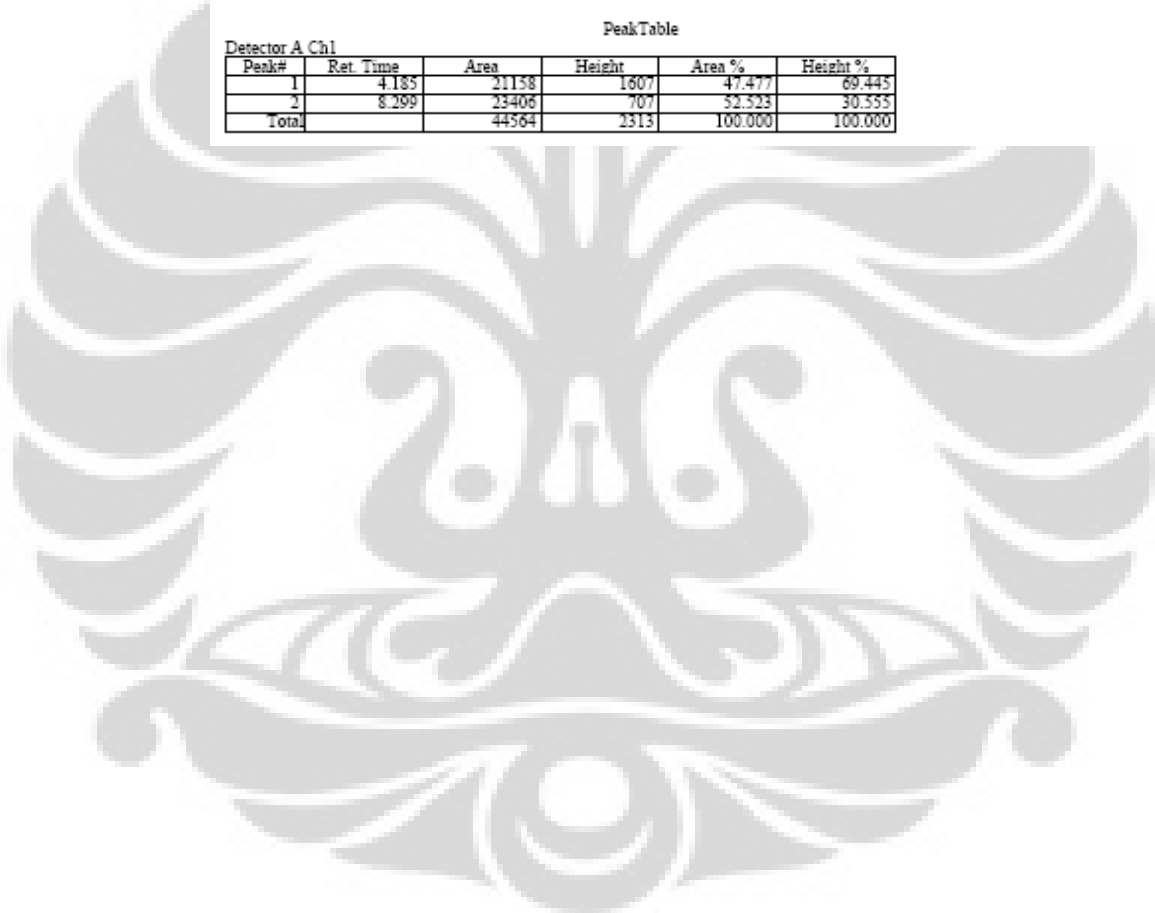


1Det.A Ch1/

<Results>

PeakTable

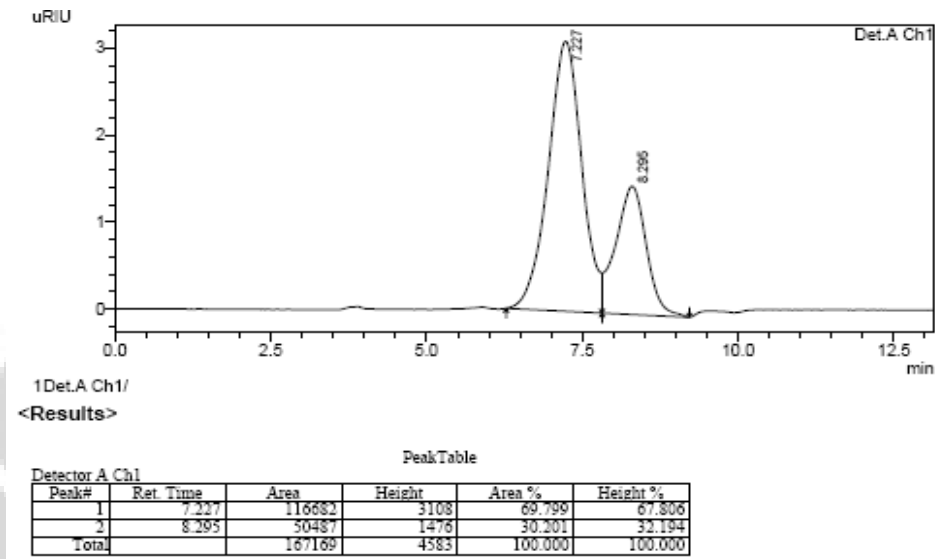
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	4.185	21158	1607	47.477	69.445
2	8.299	23406	707	52.523	30.555
Total		44564	2313	100.000	100.000



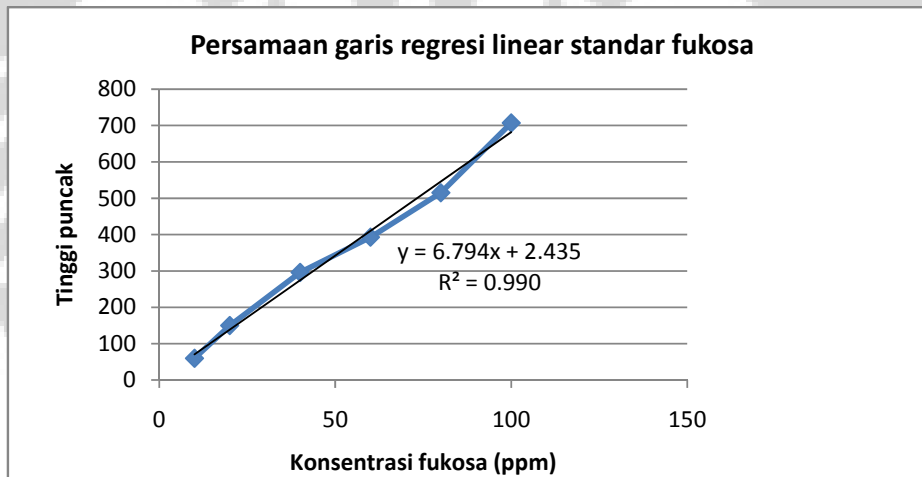
LAMPIRAN 9

Kromatogram gabungan standar monosakarida

- Perbandingan campuran larutan standar (fukosa-galaktosa-glukosa-xilosa) 1:1:1:1



- Kurva kalibrasi standar fukosa berdasarkan tinggi puncak



- Data hasil pengukuran tinggi puncak kromatogram

Konsentrasi fukosa (ppm)	Tinggi puncak	Waktu retensi
20	150	8,292
40	296	8,292
60	393	8,288
80	515	8,302
100	707	8,299
sampel F2	267	8,297

Fukoidan komersil	548	8,298
-------------------	-----	-------

LAMPIRAN 10

Rangkuman hasil analisis dari masing-masing fraksi

Kode sampel	Berat molekul $\times 10^4$ Dalton	Karbohidrat (%)	Ester sulfat (SO_4^{2-}) (%) (w/w)	Protein (ppm)
F1	5.8	65.3	2.02	0.04
F2	7.71	78.3	8.55	0.10
F3	5.47	68.2	2.40	0.02
F4	5.44	71.1	2.63	0.05
F5	5.25	61.0	2.69	0.06
FK	7.64	-	2.71	0.06

LAMPIRAN 11

Hasil Uji Statistik Antikoagulan Menggunakan Metode Duncan's

2 jam

Duncan^a

sampel	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
kontrol	5	35.520	
100 µg/mL	5		45.380
200 µg/mL	5		45.720
300 µg/mL	5		49.300
400 µg/mL	5		52.480
Sig.		1.000	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
2 jam kontrol	5	35.520	.3899	.1744	35.036	36.004	35.1	36.1
100 µg/mL	5	45.380	5.4177	2.4229	38.653	52.107	39.3	52.7
200 µg/mL	5	45.720	5.2175	2.3333	39.242	52.198	40.1	54.2
300 µg/mL	5	49.300	7.4883	3.3489	40.002	58.598	41.6	57.6
400 µg/mL	5	52.480	7.5596	3.3807	43.094	61.866	43.6	60.6
Total	25	45.680	7.8875	1.5775	42.424	48.936	35.1	60.6
4 jam kontrol	5	41.560	5.6345	2.5198	34.564	48.556	36.1	49.1
100 µg/mL	5	51.820	6.5903	2.9473	43.637	60.003	46.1	61.3
200 µg/mL	5	50.760	6.8427	3.0602	42.264	59.256	46.2	62.8
300 µg/mL	5	55.980	8.6004	3.8462	45.301	66.659	47.5	65.4
400 µg/mL	5	60.160	8.2667	3.6970	49.896	70.424	52.1	70.0
Total	25	52.056	9.1790	1.8358	48.267	55.845	36.1	70.0
ulangan kontrol	5	3.00	1.581	.707	1.04	4.96	1	5
100 µg/mL	5	3.00	1.581	.707	1.04	4.96	1	5
200 µg/mL	5	3.00	1.581	.707	1.04	4.96	1	5
300 µg/mL	5	3.00	1.581	.707	1.04	4.96	1	5
400 µg/mL	5	3.00	1.581	.707	1.04	4.96	1	5
Total	25	3.00	1.443	.289	2.40	3.60	1	5

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
2 jam	Between Groups	813.308	4	203.327	5.982	.002
	Within Groups	679.792	20	33.990		
	Total	1493.100	24			
4 jam	Between Groups	964.870	4	241.217	4.563	.009
	Within Groups	1057.232	20	52.862		
	Total	2022.102	24			
ulangan	Between Groups	.000	4	.000	.000	1.000
	Within Groups	50.000	20	2.500		
	Total	50.000	24			



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCE
PUSAT PENELITIAN OSEANOGRAFI
RESEARCH CENTRE FOR OCEANOGRAPHY
Jl. Pahlawan Ancol Timur, Jakarta 14430, PO. Box: 4801/JKTF Jakarta 11048
Telepon: (021) 64713850, Fax: (021) 64711948
Homepage: <http://www oseanografi.lipi.go.id>, E-mail: p2o@oseanografi.lipi.go.id

Surat: 3623/PPK-IP/VI/2011
Tempat: ---
Perihal: Permohonan Identifikasi

Jakarta, 17 Juni 2011

Kepada Yth

Ellya Sinurat, S-Si
Batal Besar Riset Pengolahan
Produk dan Bioteknologi
Keuaman dan Perikanan
BPPKLP
Kawasan Industri Kelautan dan Perikanan
Jl. S.S. Tubun Petamburan VI
Jakarta 10260

Dengan hormat,

Menjawab surat Saudara tanggal 20 Mei 2011 perihal pokok surat tersebut
diatas, pada prinsipnya kami dapat membantu, setelah dilakukan identifikasi oleh
Lah- Alga. Sampel yang dikirim pada kami bejenis seperti berikut ini:

A. - Bejenis : *Sargassum crassifolium* J.G. Agardh

Demikian kami sampaikan, atas perhatian dan kerjasama Saudara kami
mengucapkan terima kasih.

Plh. Kepala Pusat Oseanografi LIPI

Dr. Zulfal Arifin
NIP. 195909141985031002