

AKTIVITAS KOAGULASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*) DENGAN PENAMBAHAN FUKOIDAN DAN UJI AGLUTINASI SERTA EKSPRESI GEN UNTUK DETEKSI ENDOTOKSIN PENYAKIT BAKTERI PATOGEN PADA IKAN

SKRIPSI

Oleh

**PETRA TAMARA SIMAMORA
NPM 2054111004**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRACT

COAGULATION ACTIVITY OF SPINY LOBSTER (*Panulirus homarus*) HEMOLYMPH WITH THE ADDITION OF FUCOIDAN, AGGLUTINATION TESTS AND GENE EXPRESSION FOR DETECTING ENDOTOXINS OF PATHOGENIC BACTERIAL DISEASES IN FISH

By

PETRA TAMARA SIMAMORA

Lobster hemolymph is explored as an endotoxin detector and an alternative antibacterial test due to its sensitivity to lipopolysaccharides (LPS), similar to horseshoe crabs. Lobster hemolymph clots quickly, requiring an alternative anticoagulant like fucoidan. This study aimed to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan from brown algae using the Lee-White coagulation test, agglutination test, and gene expression analysis in lobster hemolymph for detecting endotoxins from bacteria that cause diseases in fish. This study employs an exploratory method by screening different types and doses of anticoagulants using six treatments: control, addition of 10% aspirin, 10% EDTA, 10% sodium citrate, heparin, and fucoidan to lobster hemolymph. The coagulation time of the lobster hemolymph was measured, and an agglutination test was observed after the addition of fish pathogenic bacteria. The results of the Lee-White test showed that the hemolymph-to-fucoidan ratios of 2:3, 2:4, and 2:5 influenced coagulation. The agglutination test results indicated agglutination formation in all samples. The cycle threshold (CT) values for gene expression analysis were as follows: β -Actin 1 at 34.9226, β -Actin 2 at 29.8296, GPO at 42.042, Lectin 1 at 41.937, Lectin 2 at 42.1846, LGBP 1 at 39.9524, and LGBP 2 at 35.8335. In conclusion, fucoidan can be used as an anticoagulant at a 2:3 ratio, and lobster hemolymph has the potential to be utilized as an antibacterial agent against fish pathogens. Additionally, the genes β -Actin, LGBP, Lectin, and GPO were successfully expressed in the hemolymph of the sand lobster (*Panulirus homarus*).

Keywords: Agglutination Test, Coagulation Test, Endotoxins, Fucoidan, Gene Expression, Spiny Lobster

ABSTRAK

AKTIVITAS KOAGULASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*) DENGAN PENAMBAHAN FUKOIDAN DAN UJI AGLUTINASI SERTA EKSPRESI GEN UNTUK DETEKSI ENDOTOKSIN PENYAKIT BAKTERI PATOGEN PADA IKAN

Oleh

PETRA TAMARA SIMAMORA

Hemolim lobster dieksplorasi sebagai detektor endotoksin dan alternatif uji antibakteri karena sensitif terhadap lipopolisakarida (LPS), mirip dengan keping tapal kuda. Hemolim lobster cepat menggumpal, sehingga dibutuhkan alternatif antikoagulan seperti fukoidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antikoagulan senyawa fukoidan dari alga coklat menggunakan uji koagulasi, uji aglutinasi serta ekspresi gen pada hemolim lobster sebagai deteksi endotoksin bakteri penyebab penyakit ikan. Penelitian ini menggunakan metode eksploratif yaitu dengan skrining jenis dan dosis antikoagulan menggunakan 6 perlakuan yaitu kontrol, penambahan aspirin 10%, EDTA 10%, natrium sitrat 10%, heparin dan fukoidan ke hemolim lobster pasir (*Panulirus homarus*) lalu dilakukan perhitungan lama hemolim lobster menggumpal dan diamati uji aglutinasi yang ditambah bakteri penyebab penyakit ikan. Hasil penelitian uji koagulasi menunjukkan bahwa perbandingan hemolim dengan fukoidan adalah 2:3, 2:4 dan 2:5, untuk hasil uji aglutinasi menunjukkan semuanya mengalami pembentukan aglutinasi, dan nilai C_T ekspresi gen sampel β -Actin 1 adalah 34.9226 dan β -Actin 2 adalah 29.8296, GPO adalah 42.042, Lectin 1 adalah 41.937, Lectin 2 adalah 42.1846, LGBP 1 adalah 39.9524, dan LGBP 2 adalah 35.8335. Kesimpulannya adalah fukoidan dapat digunakan sebagai antikoagulan dengan dosis 2:3, dan hemolim lobster dapat digunakan sebagai antibakteri penyebab penyakit ikan serta gen β -Actin, LGBP, Lectin, dan GPO terbukti terekspresi dalam hemolim lobster pasir.

Kata Kunci: Ekspresi Gen, Endotoksin, Fukoidan, Lobster Pasir, Uji Aglutinasi, Uji Koagulasi

AKTIVITAS KOAGULASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*) DENGAN PENAMBAHAN FUKOIDAN DAN UJI AGLUTINASI SERTA EKSPRESI GEN UNTUK DETEKSI ENDOTOKSIN PENYAKIT BAKTERI PATOGEN PADA IKAN

Oleh

PETRA TAMARA SIMAMORA

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA PERIKANAN / SAINS***

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDARLAMPUNG
2025**

Judul Skripsi

: AKTIVITAS KOAGULASI HEMOLIM
LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*)
DENGAN PENAMBAHAN FUKOIDAN DAN
UJI AGLUTINASI SERTA EKSPRESI GEN
UNTUK DETEKSI ENDOTOKSIN PENYAKIT
BAKTERI PATOGEN PADA IKAN

Nama Mahasiswa

: Petra Tamara Simamora

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2054111004

Program Studi

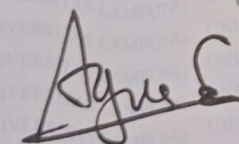
: Budidaya Perairan

Fakultas

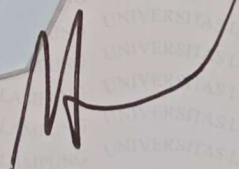
: Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

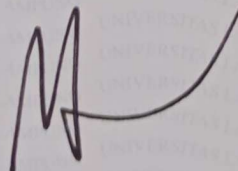


Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P.
NIP. 19840805 2009121 003



Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 19830923 2006042 001

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

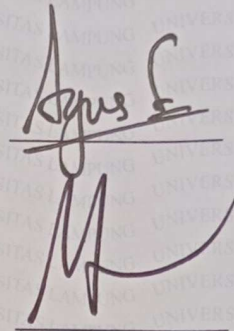


Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 19830923 2006042 001

MENGESAHKAN

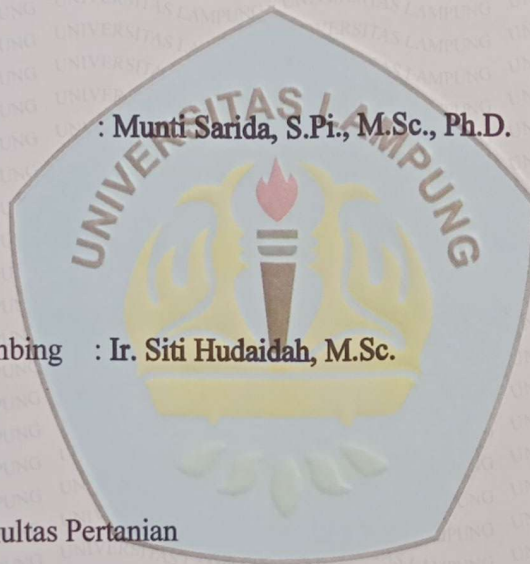
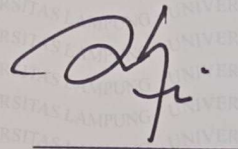
1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P.



Sekretaris : Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.

Penguji
Bukan Pembimbing : Ir. Siti Hudaidah, M.Sc.



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. H. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP. 196411181989021002

Tanggal lulus ujian skripsi : 3 Maret 2025

RIWAYAT HIDUP

Penulis memiliki nama lengkap Petra Tamara Simamora. Lahir pada 24 Agustus 2001 di Jambi, Provinsi Jambi. Penulis menempuh pendidikan dasar di SD Swasta Dwi Warna Bandar Lampung pada 2008 – 2014, kemudian melanjutkan pendidikan di SMP Swasta Gajah Mada Bandar Lampung pada 2014 – 2017, selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di SMAN 6 Bandar Lampung pada 2017 – 2020.

Penulis melanjutkan pendidikan strata-1 (S1) pada Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur Mandiri pada 2020. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjalani magang/PKL di Balai Benih Ikan Metro (2022). Penulis juga aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (Himapik) Bidang Kerohanian periode 2022 dan 2023. Selama menjadi mahasiswa penulis pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah Biokimia (2021), Kimia Dasar (2022), Manajemen Kesehatan Ikan (2023), Fisiologi Perkembangan Larva Ikan (2023), dan Immunologi Ikan (2024).

Penulis melakukan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Januari-Februari tahun 2023 di Desa Banyu Urip, Kecamatan Wonosobo. Pada Juni-Juli 2023,

penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara, Jawa Tengah. Pada Februari-Agustus 2024 penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium Produktivitas Perairan, Gedung K, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah dan Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung.

Kedua orang tua tercinta, Ibu M. Simanjuntak dan Bapak R. Simamora serta adik-adik yang selalu memberikan doa, dukungan, dan nasihat kepada saya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Tuhan yang Maha Esa, karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul “*Antikoagulasi dan Uji Aglutinasi Senyawa Fukoidan Serta Ekspresi Gen Terhadap Hemolim Lobster Pasir (Panulirus Homarus) Untuk Deteksi Endotoksin Penyakit Bakterial Pada Ikan*” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P. selaku Dekan FP Unila;
2. Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan serta Dosen Pembimbing Pembantu/Sekretaris;
3. Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P. selaku Dosen Pembimbing Utama;
4. Ir. Siti Hudaidah, M.Sc. selaku Penguji Utama;
5. Yeni Elisdiana S.Pi., M.Pi. selaku Dosen Pembimbing Akademik;
6. Kedua orang tua, Ibu M. Simanjuntak dan Bapak R. Simamora.

Bandar Lampung, Maret 2025

Petra Tamara Simamora

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
1.4 Kerangka Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Lobster Pasir (<i>Panulirus homarus</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat	7
2.2 Biologi <i>Sargassum</i> sp.....	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	8
2.2.2 Habitat	9
2.3 Kandungan Senyawa Bioaktif <i>Sargassum</i> sp.....	10
2.3.1 Florotanin	10
2.3.2 Meroditerpenoid	11
2.3.3 Fukosantin	12
2.3.4 Fukoidan.....	12
2.3.5 Alginat.....	13
2.3.6 Asam fenolat	14
2.4 Jenis-jenis Antikoagulan	15
2.4.1 <i>Ethylene Diamine Tetra Acetate</i> (EDTA).....	15
2.4.2 Natrium Sitrat	16
2.4.3 Heparin.....	16
2.4.4 Aspirin.....	17
2.5 Endotoksin Bakteri	18
2.5.1 LAL (<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>)	19
2.5.2 <i>Rabbit Pyrogen Test</i>	20

2.5.3	MAT (<i>Monocyte Activation Test</i>)	21
2.5.4	rFC (<i>recombinant Factor C</i>).....	21
2.6	Metode Penelitian	22
2.6.1	Uji Aglutinasi	22
2.6.2	Uji Koagulasi.....	23
2.6.3	Ekpresi Gen	23
2.6.4	FTIR (<i>Fourier Transform Infra Red</i>).....	24
2.7	Struktur Dinding Sel Bakteri	25
2.8	Proses Koagulasi Hemolim Krustasea.....	26
III.	METODE PENELITIAN	30
3.1	Waktu dan Tempat.....	30
3.1.1	Waktu Penelitian	30
3.1.2	Tempat Penelitian.....	30
3.2	Bahan dan Alat.....	30
3.2.1	Bahan	30
3.2.2	Alat.....	31
3.3	Rancangan Penelitian	33
3.4	Prosedur Penelitian	34
3.4.1	Persiapan Media Pemeliharaan	34
3.4.2	Persiapan Hewan Uji	34
3.4.3	Persiapan <i>Sargassum</i> sp.....	34
3.4.4	Ekstraksi Fukoidan	34
3.4.5	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	35
3.4.6	Pembuatan Media.....	35
3.4.6.1	Media TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>).....	35
3.4.6.2	Media TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>).....	36
3.4.7	Penanaman Bakteri.....	36
3.4.7.1	Penanaman Bakteri pada Media TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>).....	36
3.4.7.2	Penanaman Bakteri pada Media TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>).....	36
3.4.8	Pengambilan Hemolim Lobster	37
3.4.9	Pengamatan	37
3.4.9.1	Uji Waktu Koagulasi	37
3.4.9.2	Uji Aglutinasi Endotoksin Bakteri.....	38
3.4.9.3	Ekspresi Gen	40
3.5	Analisis FTIR.....	42
3.6	Analisis Data	43
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1	Hasil	44
4.1.1	Ekstraksi Fukoidan.....	44
4.1.2	Uji Koagulasi.....	45
4.1.3	Uji Aglutinasi Endotoksin Bakteri.....	46
4.1.4	Ekspresi Gen	48
4.2	Pembahasan.....	49
V.	SIMPULAN DAN SARAN	55

5.1 Simpulan.....	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perbedaan susunan dinding bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif	25
2. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini	30
3. Alat yang digunakan dalam penelitian ini.....	31
4. Primer gen imun lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>).....	40
5. Komposisi bahan untuk sintesis cDNA.....	41
6. Bahan qPCR-Mix	42
7. Kondisi qPCR.....	42
8. Waktu koagulasi.....	45
9. Uji aglutinasi hemolim lobster pasir	46
10. Uji aglutinasi hemolim lobster pasir yang ditambah antikoagulan	47
11. Ekspresi gen target hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>).....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka penelitian	4
2. Lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>)	5
3. Rumput laut coklat (<i>Sargassum</i> sp.).....	8
4. Struktur senyawa fukoidan.....	13
5. Perbedaan dinding (a) sel bakteri Gram positif dan (b) sel bakteri.....	26
6. Kaskade koagulasi kepiting tapal kuda	27
7. Pengambilan hemolim lobster pasir	37
8. Pengamatan uji aglutinasi hemolim lobster	38
9. Pengamatan uji aglutinasi hemolim lobster ditambah antikoagulan.....	39
10. Spektra IR fukoidan	44
11. Hemolim lobster pasir yang menggumpal.	46
12. Uji aglutinasi hemolim lobster. (A) positif dan (B) negatif.....	48
13. Nilai C_T dan jumlah salinan gen untuk berbagai gen target.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Nilai CT ekspresi gen hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>)	69
2. Uji FTIR fukoidan.....	69
3. Uji aglutinasi hemolim lobster. (A) positif dan (B) positif.....	70

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Akuakultur merupakan bagian sektor pangan yang berkembang pesat. Permasalahan yang biasa terjadi disebabkan oleh penyakit ikan. Penyakit pada ikan dibedakan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri, virus, parasit, jamur, dan penyakit non-infeksi yang disebabkan oleh stress, tumor, gangguan gizi pakan, dan traumatik (Putra et al., 2016). Serangan penyakit bakterial dapat mengakibatkan kematian hingga 50-100%, bahkan dapat menurunkan mutu daging ikan yang terinfeksi karena adanya borok atau luka (Pramudita et al., 2013). Persentase penyakit ikan yang diakibatkan oleh bakteri mencapai 33,9%, sementara 20,7% diakibatkan oleh protozoa, sisanya akibat dari virus, jamur, cacing dan krustasea (Kamelia et al., 2018).

Bakteri Gram negatif dikenal dengan nama *lipopolysaccharide* (LPS) dan diketahui memiliki endotoksin yang terletak pada dinding selnya. Endotoksin memiliki sifat hidrofobik karena bagian lipida dalam strukturnya yang ketika dilepaskan dapat menarik ke lingkungan hidrofobik seperti membran sel dan jaringan tubuh. Proses ini dapat memicu respons imun dan peradangan dalam tubuh, yang pada akhirnya dapat menyebabkan gejala penyakit terkait infeksi bakteri Gram negatif (Dullah & Ongkudon, 2017). Dalam mekanisme pertahanan terhadap patogen, hemolimf kepiting tapal kuda mengandung amebosit, yang berperan serupa dengan sel darah putih vertebrata dalam mempertahankan organisme melawan patogen.

Amebosit dari hemolim *L. polyphemus* digunakan untuk membuat *Limulus amoebocyte lysate* (LAL), yang digunakan untuk deteksi endotoksin bakteri dalam pengobatan di negara maju seperti Amerika, Jepang, dan Eropa. Negara maju tersebut memanfaatkan hemolim kepiting tapal kuda sebagai pendeteksi alat-alat kedokteran agar bebas dari bakteri dan jamur. Hemolim kepiting tapal kuda juga dapat digunakan sebagai LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) test (Funkhouser, 2011). Spesies kepiting tapal kuda seperti *Tachypleus tridentatus* tergolong terancam punah, sehingga diperlukan alternatif lain yang dapat digunakan untuk pengujian antibakteri.

Hemolim lobster saat ini sedang dieksplorasi sebagai detektor endotoksin yang merupakan bakteri penyebab penyakit pada ikan. Hemolim lobster pasir memiliki kesamaan dengan kepiting tapal kuda yaitu memiliki hemolimfa yang sensitif terhadap lipopolisakarida (LPS) yang terdapat di membran luar bakteri Gram negatif sehingga dapat digunakan sebagai pendeteksi bakteri. Hemolim lobster yang sangat cepat mengalami penggumpalan. Oleh karena itu, diperlukan penambahan zat untuk mencegah pembekuan hemolim yang dikenal sebagai antikoagulan. Antikoagulan yang sering dipakai meliputi *Ethylen Diamin Tetra Acetate* (EDTA) 10%, heparin, natrium sitrat 10%, ammonium oksalat, natrium flourida (NaF), dan kalsium oksalat (Subiyono et al., 2016). Beberapa antikoagulan komersil sulit untuk didapatkan dan memiliki harga yang mahal. Salah satu bahan alami yang bisa digunakan sebagai alternatif anti-koagulan adalah rumput laut coklat (*Sargassum* sp.).

Sargassum sp. mengandung senyawa fukoidan, polisakarida kompleks yang terdapat pada dinding sel alga coklat (Rustikawati, 2012). Fukoidan memiliki berbagai aktivitas, termasuk sebagai antikoagulan, menurunkan lemak dalam hemolim, dan antioksidan (Prabu et al, 2013). Fukoidan juga memiliki sifat sebagai antibakteri yang memiliki struktur kimia serta komposisi bervariasi yang berguna untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Berdasarkan penelitian Bo et al. (2008), fukoidan *F. vesiculosus* memiliki aktivitas antikoagulan lebih besar dari heparin. Potensi fukoidan dari *Sargassum* sp. dapat menjadi terobosan terbaru dalam pengembangan antikoagulan dan dengan meningkatnya insiden penyakit ikan yang disebabkan oleh bakteri yang dapat

mengancam keberlanjutan industri akuakultur. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut mengenai fukoidan dari *Sargassum* sp. diperlukan untuk menambah pemahaman tentang perannya.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antikoagulan senyawa fukoidan dari alga coklat menggunakan uji koagulasi, uji aglutinasi serta ekspresi gen pada hemolim lobster sebagai deteksi endotoksin bakteri penyebab penyakit pada ikan.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memperoleh antikoagulan berbahan alami sehingga dapat mengurangi penggunaan antikoagulan komersil sehingga dapat meminimalisir efek samping yang akan terjadi dan memperoleh alternatif pengujian antibakteri.

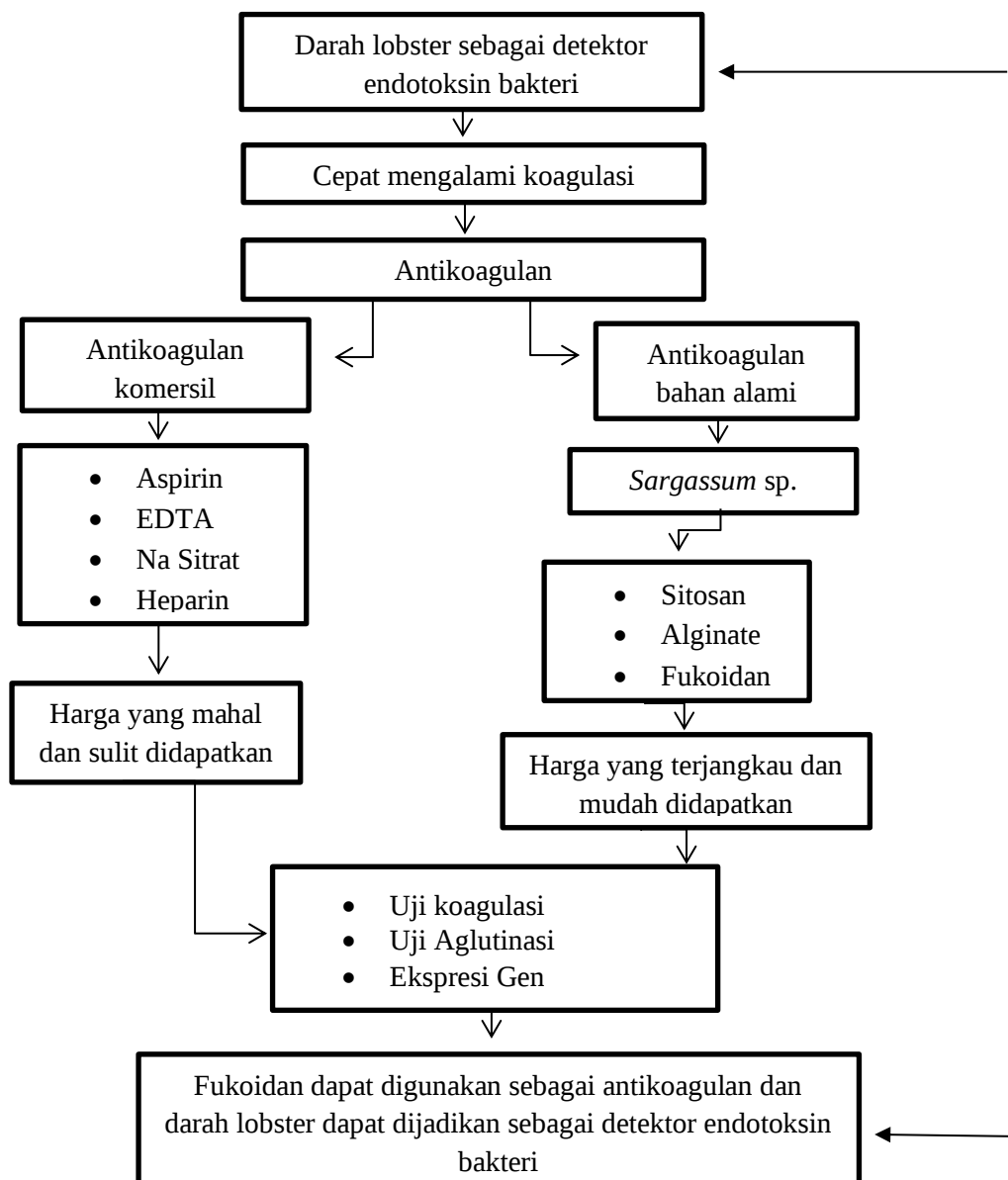
1.4 Kerangka Penelitian

Endotoksin adalah toksin yang merupakan bagian integral dari dinding sel bakteri Gram negatif. Aktivitas biologis dari endotoksin dihubungkan dengan keberadaan lipopolisakarida (LPS). LPS merupakan komponen penyusun permukaan dari membran terluar (*outer membrane*) bakteri Gram negatif. Saat ini hemolim lobster sedang dikembangkan sebagai detektor endotoksin bakteri penyebab penyakit ikan. Hemolim lobster sangat cepat mengalami koagulasi. Oleh karena itu diperlukan penambahan zat untuk mencegah koagulasi hemolim yang dikenal sebagai antikoagulan.

Antikoagulan yang sering digunakan adalah *Ethylen Diamin Tetra Acetate* (EDTA), heparin, natrium sitrat, ammonium oksalat, natrium flourida (NaF), kalsium oksalat dan aspirin. Antikogulan komersil tersebut sulit untuk didapatkan dan memiliki harga yang mahal. Oleh sebab itu, diperlukan pengobatan alternatif

sebagai antikoagulan dari bahan alami dalam menghambat waktu pembekuan darah. Bahan alami yang bisa digunakan sebagai antikoagulan adalah rumput laut coklat (*Sargassum* sp.). Kandungan zat aktif fukoidan dalam *Sargassum* sp. memiliki bioaktivitas sebagai antikanker, antiatherosklerosis, antiinflamasi, antikoagulan, imunomodulator dan antioksidan.

Ada tiga parameter yang diamati dalam penelitian ini, yaitu uji koagulasi, uji aglutinasi dan ekspresi gen. Dari ketiga parameter tersebut kemudian dilakukan analisis data secara deskriptif yang disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Kerangka penelitian dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka penelitian

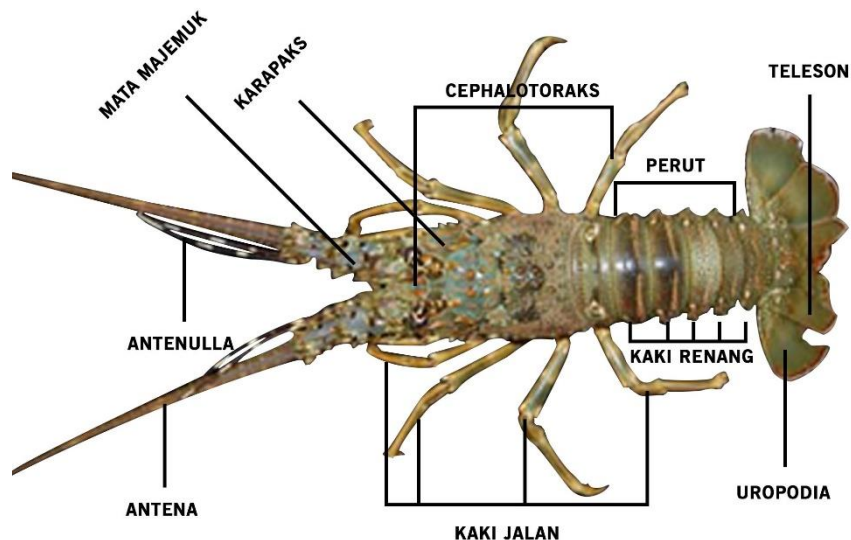
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Lobster Pasir (*Panulirus homarus*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi lobster pasir menurut Linnaeus (1758) dalam Carpenter dan Niem (1998) sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Phylum : Arthropoda
Kelas : Crustacea
Ordo : Decapoda
Famili : Palinuridae
Genus : *Panulirus*
Spesies : *Panulirus homarus*



Gambar 2. Lobster pasir (*Panulirus homarus*)
Sumber (Baharawi et al., 2015)

Morfologi lobster pasir dapat dilihat pada gambar 2. Lobster pasir memiliki bentuk tubuh yang memanjang dengan panjang berkisar 16-25 cm. Bagian-bagian tubuh lobster pasir terdiri dari kepala, karapas, abdomen, kaki jalan, kaki renang, ekor, mata majemuk, antena, dan antenula. Bentuk karapas membulat dan memiliki duri. Lobster pasir memiliki lima pasang kaki jalan dan lima pasang kaki renang, serta ekor yang dimodifikasi menjadi seperti dayung yang disebut uro-poda. Perutnya bersegmen melintang dan bagian depan anterior dilengkapi dengan empat duri besar selain tanduk depan. Warna tubuh lobster pasir cenderung hijau kecoklatan dengan mata berwarna coklat tua. Bagian antenula berwarna pita putih-coklat, dan abdomen (perut) tertutupi oleh bintik-bintik putih. Alat reproduksi yang dikenal sebagai gonopore, terdapat pada kaki jalan ketiga pada individu betina dan kaki jalan kelima pada individu jantan (Pratiwi, 2018).

Secara morfologi, bagian kepala lobster terdiri dari 13 ruas, sementara bagian dada terdiri dari enam ruas (BBL, 2012). Secara eksternal, lobster dapat dibedakan berdasarkan jenis kelaminnya dengan melihat tanda-tanda seperti berikut: (1) Lobster betina memiliki tonjolan berwarna putih bening di pangkal kaki jalan ke-3. (2) Pada lobster betina, di bagian sisi dalam kaki renang terdapat dua lembaran berpasangan, sementara lobster jantan hanya memiliki satu lembar. (3) Pada ruas kaki jalan ke-5, terjadi percabangan tiga pada lobster betina. (4) Pada tangkai kaki jalan ke-5, terdapat tonjolan yang terkait dengan testis pada lobster jantan (Yusnaini et al., 2009).

Secara morfologi, lobster pasir memiliki permukaan bagian atas ruas abdomen yang memiliki alur melintang lurus dan tepinya bergerigi. Permukaan bagian atas ruas abdomen umumnya tidak berambut kecuali pada alur melintang, tepi belakang abdomen, dan lekuk di bagian sisi. Warna dasarnya cenderung kehijauan atau kecoklatan dengan bintik-bintik terang yang tersebar di seluruh permukaan segmen abdomen. Lobster pasir memiliki ciri lain berupa kaki yang memiliki bercak-bercak putih. Lobster ini biasanya hidup di perairan terumbu karang hingga kedalaman beberapa meter, dan mereka sering terlindung di antara batu-batu karang serta jarang hidup berkelompok. Kerangka kulit lobster pasir lebih kaku, keras, dan mengandung zat kapur. Hampir seluruh tubuh lobster ini

memiliki duri-duri besar maupun kecil yang kokoh dan tajam, mulai dari ujung sungut kedua, kepala, bagian belakang badan, hingga lembaran (Sukamto et al., 2017).

2.1.2 Habitat

Lobster laut biasanya hidup di daerah perairan yang memiliki batu, karang, dan pasir. Kehadiran banyak batu karang membantu lobster untuk bersembunyi, dan mereka cenderung memilih tempat tinggal yang strategis di antara batu karang yang memiliki lubang-lubang di mana mereka dapat bersembunyi. Habitat umum lobster adalah di perairan pantai yang berbatu atau memiliki terumbu karang. Terumbu karang ini penting sebagai perlindungan dari ombak, tempat bersembunyi dari predator, dan area mencari makanan (Setyanto et al., 2018). Secara umum, habitat lobster memiliki karakteristik yang serupa, baik itu untuk jenis lobster yang berada di pantai utara Jawa maupun yang tersebar di seluruh dunia.

Kelimpahan lobster dalam suatu perairan dipengaruhi oleh faktor biotik, seperti pola siklus hidup, penyebaran, dan toleransi terhadap faktor lingkungan, serta faktor abiotik, seperti kondisi fisika dan kimia perairan, jenis substrat, dan ke-tersediaan makanan (Wandira et al., 2020). Kondisi optimal untuk budidaya lobster berkisar 29,8-31,6°C (Jones, 2009), salinitas berkisar 28-33 ppt (Verghese et al., 2007), kadar pH berkisar 7,8-8,2 (Damis et al., 2021), *Dissolved Oxygen* (DO) >5 mg/L (Mojjada et al., 2012). Menurut Moosa dan Aswandy (1984), lobster mendiami suatu perairan tertentu menurut jenisnya. Jenis lobster tersebut yaitu *Panulirus homarus* (lobster hijau pasir), *Panulirus longipes* (lobster merah/bintik seribu), *Panulirus longipes* (lobster merah/bintik seribu), *Panulirus versicolor* (lobster hijau), dan *Panulirus poliphagus* (lobster bambu).

2.2 Biologi *Sargassum* sp.

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Sargassum merupakan bagian dari kelompok rumput laut coklat (*Phaeophyceae*) dan genus terbesar dari famili *Sargassaceae*. Klasifikasi *Sargassum* menurut Blankenhorn (2007) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Divisi : Thallophyta
 Kelas : Phaeophyceae
 Ordo : Fucales
 Famili : Sargassaceae
 Genus : *Sargassum*
 Spesies : *Sargassum* sp.



Gambar 3. Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.)
 Sumber (Pakidi & Suwoyo, 2017)

Gambar rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) dapat dilihat pada Gambar 3. Guiry (2007) menjelaskan bahwa *Sargassum* sp. adalah jenis rumput laut yang termasuk dalam Divisi *Phaeophyta* atau ganggang coklat. Rumput laut ini dapat tumbuh hingga panjang 12 meter. Tubuhnya berwarna coklat kuning kehijauan, terdiri dari sebuah *holdfast* yang berfungsi sebagai struktur basal, stipe atau batang semu, dan *frond* yang berbentuk seperti daun. Warna coklat pada alga Divisi *Phaeophyta* disebabkan oleh dominasi pigmen fucoxanthin, klorofil a dan c, beta-karoten, serta xantofil lainnya. Karbohidrat yang disimpan terutama dalam bentuk laminaran (polisakarida glukosa, hasil dari proses fotosintesis), dan terdapat juga

pati dalam jumlah tertentu tergantung pada spesiesnya. Dinding selnya terdiri dari selulosa dan asam alginat.

Anggadiredja et al. (2008) menggambarkan bahwa *Sargassum* sp. memiliki thallus yang datar dan banyak bercabang, menyerupai pepohonan di darat. Daun-nya melebar dan berbentuk lonjong seperti pedang, dengan gelembung udara yang umumnya tunggal. Batang utamanya bulat agak kasar, dan bagian *holdfast* (bagian yang melekat) berbentuk cakram. Pinggir daunnya bergerigi jarang, berombak, dan ujungnya melengkung atau meruncing. *Sargassum* sp. sering kali memiliki tiga ciri khas, yaitu pigmen coklat yang menutupi warna hijau, hasil fotosintesis yang disimpan dalam bentuk laminaran dan algin, serta kehadiran flagel (Dawes, 1981).

2.2.2 Habitat

Boney (1965) menjelaskan bahwa *Sargassum* sp. tumbuh paling baik di perairan yang bersih dengan substrat dasar seperti batu karang, karang mati, batuan vulkanik, dan benda-benda padat lainnya di dasar laut. Alga *Sargassum* sp. dapat ditemukan mulai dari daerah intertidal hingga subtidal dengan ombak besar dan arus yang kuat, dan biasanya tumbuh pada kedalaman antara 0,5 hingga 10 meter. Kelompok alga ini termasuk dalam kelas *Phaeophyceae* dan tumbuh subur di daerah tropis dengan suhu perairan antara 27,25 hingga 29,30 °C dan salinitas 32 hingga 33,5 ‰. *Sargassum* sp. membutuhkan intensitas cahaya matahari yang tinggi, dengan kebutuhan intensitas cahaya sekitar 6500 hingga 7500 lux, lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok alga merah.

Alga *Sargassum* sp. tumbuh berkelompok dengan cabang-cabang yang menjuntai. Thallus utamanya dapat mencapai panjang 1-3 meter, dan setiap cabang memiliki gelembung udara bulat yang disebut "*bladder*" yang berfungsi untuk menjaga agar cabang-cabang thallus tetap mengapung ke arah permukaan air demi mendapatkan cahaya matahari yang optimal. Alga *Sargassum* sp. biasanya tumbuh di perairan pantai, terutama di zona paparan terumbu (*reef flats*), mulai dari garis pantai hingga ujung tubir, termasuk di perairan intertidal dan subtidal.

2.3 Kandungan Senyawa Bioaktif *Sargassum* sp.

Senyawa bioaktif adalah senyawa yang memiliki efek positif pada fisiologi tubuh selain memberikan nilai gizi dasar dari bahan makanan. Biasanya, senyawa bio-aktif diserap oleh saluran pencernaan dan masuk ke dalam aliran darah untuk mencapai organ targetnya (Skinner & Hunter, 2013). *Sargassum* mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti protein, lemak dan asam lemak, alginate, fukoidan, laminaran, fukosantin, dan senyawa fenolik (Biris-Dorhoi et al., 2020).

2.3.1 Florotanin

Florotanin adalah senyawa alami yang terbentuk dari unit-unit floroglucinol (1,3,5-trihidroksibenzena) yang saling terhubung melalui ikatan kimia, seperti ikatan aril, eter, kombinasi keduanya, atau ikatan dibenzodioxin. Berdasarkan cara unit-unit ini saling terikat dan jumlah gugus hidroksil yang dimiliki, florotanin dibagi menjadi enam jenis utama: floretol dan fuhalol (yang memiliki ikatan eter), fukol (dengan ikatan aril-aril), fukofloretol (gabungan ikatan aril dan eter), serta ekol dan karmalol (keduanya memiliki ikatan dibenzodioxin). Fuhalol berbeda dari floretol karena memiliki lebih banyak gugus hidroksil (Li et al., 2017). Dalam ekstrak etil asetat dari *Sargassum fusiforme*, para peneliti berhasil mengidentifikasi 42 senyawa florotanin dengan berat molekul yang bervariasi, termasuk fuhalol, floretol, fukofloretol, ekol, dan karmalol.

Jenis florotanin ekol untuk pertama kalinya berhasil ditemukan pada spesies *Sargassum*. Kemampuan florotanin dalam menghambat radikal bebas DPPH, yang ditunjukkan melalui nilai IC_{50} sebesar 14,61 ppm, terbukti secara signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan troloks (analogi vitamin E) yang memiliki nilai 15,62 ppm, serta polifenol dari teh komersial dengan kemurnian 90% yang tercatat sebesar 18,42 ppm. Kekuatan antioksidan florotanin berdasarkan uji *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) menunjukkan nilai sebesar 1,9 mg TE/mg, yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan troloks (1 mg TE/mg) dan polifenol dari teh komersial (0,91 mg TE/mg) (Li et al., 2017).

Florotanin dalam bentuk dimer memiliki struktur dasar berupa rantai fenil-furan-fenil, dengan empat gugus hidroksil dan satu gugus metil yang terletak pada dua cincin fenil. Sementara itu, florotanin trimer memiliki susunan struktur yang lebih kompleks, yaitu fenil-dioksin-fenil-furan-fenil, dengan jumlah gugus hidroksil dan metil yang sama namun tersebar pada tiga cincin fenil. Banyak turunan dari florotanin dimer dan trimer telah ditemukan pada *Sargassum pallidum*, yang menunjukkan aktivitas antioksidan tinggi, baik dalam menangkal radikal bebas DPPH, *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), dan *Ferrous Ion Chelating Activity* (FIC) yang tinggi (Ye et al., 2009).

2.3.2 Meroditerpenoid

Senyawa meroditerpenoid yang terdapat dalam *Sargassum* sp. terbentuk dari gabungan rantai poliprenil yang melekat pada inti p-benzoquinon atau hidrokuinon. Keragaman struktur meroditerpenoid terutama disebabkan oleh variasi pada rantai samping terpenanya, yang dapat meliputi penambahan ikatan rangkap eksosiklik, gugus asam karboksilat, alkohol, maupun aldehida (Brkljača & Urban, 2014). Beberapa contoh senyawa *mero-diterpenoid* seperti *sargaquinoic acid*, *sargahydroquinoic acid*, *fallaquinone*, *fallahydroquinone*, *paradoxquinone*, *paradoxhydroquinone*, *paradoxquinol*, *sargaquinal*, dan *sargaquinone* telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Streptococcus pyogenes*.

Sargahydroquinoic acid, *fallaquinone*, *sargaquinal*, dan *Sargaquinone* menunjukkan potensi yang lebih tinggi dalam menghambat atau membunuh *Pseudomonas aeruginosa* dibandingkan dengan ampicilin, yang merupakan antibiotik umum. Kehadiran gugus asam karboksilat pada posisi C-20 dalam struktur *sargaquinoic acid* dan *sargahydroquinoic acid* diketahui berperan penting dalam aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (Brkljača & Urban, 2014). *Sargahydroquinoic acid* dan *sargachromanol* mampu menurunkan tingkat ekspresi matrix metalloproteinase-2 dan -9, yang memiliki keterkaitan erat dengan penekanan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam sel fibrosarkoma manusia (HT1080). Selain itu, kedua senyawa ini juga dapat menghambat oksidasi lipid dan protein membran secara dosis-dependent, serta efektif dalam mencegah

kerusakan yang disebabkan oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Kim et al., 2010).

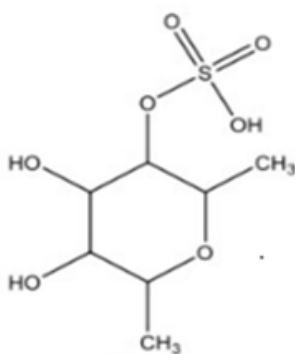
2.3.3 Fukosantin

Fukosantin memiliki struktur yang khas, ditandai dengan adanya ikatan allena serta berbagai gugus fungsional yang mengandung oksigen, seperti epoksi, hidroksil, karbonil, dan karboksil. Selain itu, molekul fukosantin juga mengandung gugus karbonil yang terkonjugasi dalam rantai polienanya. Keunikan ini membuat struktur fukosantin berbeda dari karotenoid pada tumbuhan darat, seperti β -karoten dan lutein (Mikami & Hosokawa, 2013). Fukosantin yang diisolasi dari *Sargassum siliquastrum* menunjukkan aktivitas sitoprotektif terhadap kerusakan DNA akibat stres oksidatif. Senyawa ini mampu menurunkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) di dalam sel dan meningkatkan kelangsungan hidup sel vero yang terpapar H_2O_2 . Efektivitas fukosantin dalam menghambat kerusakan DNA akibat induksi H_2O_2 telah dibuktikan melalui uji komet, yang ditunjukkan dengan penurunan persentase tail DNA (Heo et al., 2008).

2.3.4 Fukoidan

Fukoidan adalah jenis polisakarida sulfat yang sering ditemukan dalam alga cokelat, terutama *Sargassum* sp. Komposisi utama fukoidan adalah residu α -L-fukosa sulfat, dengan sedikit gugus galaktosa, manosa, xilosa, ramnosa, glukosa, asam uronat, dan asetil (Balboa et al., 2013). Struktur fukoidan umumnya terdiri dari unit (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-galaktosa dan/atau (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-manosa, dengan cabang yang terbentuk oleh (1 $\rightarrow$ 3) dan/atau (1 $\rightarrow$ 4)- α -L-fukosa, (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-asam glukuronat, terminal β -D-xylosa, dan kadang-kadang (1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glukosa (Balboa et al., 2013). Aktivitas antioksidan fukoidan dapat diukur dengan kemampuannya untuk mereduksi radikal ABTS, yang setara dengan kurang dari 0,25 g trolox per gram fukoidan (Balboa et al., 2013).

Aktivitas fukoidan dalam mereduksi radikal DPPH diketahui sekitar 1,93 kali lipat lebih besar daripada fukoidan dalam bentuk kasar (Wang et al., 2015). Fukoidan murni yang diisolasi dari *Sargassum cristaefolium* memiliki aktivitas penghambatan sel kanker kolon manusia melalui mekanisme apoptosis, fragmentasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), dan antioksidatif (Wang et al., 2015). Potensi penghambatan enzim cyclooxygenase 1 dan 2 oleh fukoidan lebih baik dibandingkan aspirin (obat non-steroidal antiinflamasi) dan alginat, sehingga potensial sebagai antiinflamasi (Dewi, 2016).



Gambar 4. Struktur senyawa fukoidan

Sumber (Satyarsa, 2019)

2.3.5 Alginat

Secara molekuler, alginat merupakan kopolimer linier biner yang tersusun dari unit (1,4)- β -D-asam manuronat (M) dan α -L-asam guluronat (G). Struktur alginat terdiri dari blok-blok urutan M, G, serta campuran MG, di mana susunan dan rasio monomer M dan G dapat bervariasi antar spesies alga, bahkan dalam jaringan yang berbeda pada spesies yang sama. Rasio M/G serta pola blok ini sangat memengaruhi karakteristik fisikokimia alginat (Fertah et al., 2017). Enzim *cyclooxygenase* (COX) merupakan enzim yang berperan dalam sintesis prostaglandin, yaitu mediator utama dalam proses inflamasi. Alginat menunjukkan kemampuan yang menjanjikan sebagai inhibitor COX dalam studi *in silico*, dengan efektivitas penghambatan yang lebih tinggi terhadap COX-2 bila dibandingkan dengan aspirin (Dewi, 2016).

Alginat maupun fukoidan telah terbukti memiliki aktivitas antivirus yang lebih kuat terhadap herpes simpleks virus tipe-1 (HSV-1) dibandingkan *acyclovir* (obat antivirus yang umum digunakan) dengan konsentrasi yang tetap aman (non-sitotoksik) terhadap sel vero (Peng et al., 2011). Alginat telah dilaporkan memberikan dampak positif terhadap profil lipid plasma serta aktivitas antioksidan pada tikus yang mengalami hiperkolesterolemia. Dalam uji coba selama 8 minggu, alginat terbukti secara signifikan menurunkan kadar kolesterol plasma sebesar 37,52%, hasil yang lebih efektif dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang diberi atorvastatin, yang menunjukkan penurunan sebesar 20,27%.

Alginat juga menunjukkan kemampuan dalam menurunkan kadar *Low-Density Lipoprotein* (LDL) secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang diberi pakan tinggi kolesterol. Selain itu, alginat mampu meningkatkan kadar *High-Density Lipoprotein* (HDL) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yang menerima pakan normal (Dousip et al., 2014). Tikus yang diberi pakan mengandung ekstrak kasar alginat juga menunjukkan nilai indeks aterogenik yang lebih baik (indikator penting dalam menilai gangguan lipid terkait penyakit jantung koroner) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif maupun positif (Dousip et al., 2014).

2.3.6 Asam fenolat

Asam fenolat merupakan jenis senyawa fenolik yang memiliki setidaknya satu gugus asam karboksilat dalam strukturnya. Senyawa ini terbagi menjadi dua kelompok utama, yaitu asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinamat. Asam hidroksibenzoat merupakan turunan dari asam benzoat, seperti asam galat, sedangkan asam hidroksisinamat berasal dari asam sinamat, contohnya asam kumarat, asam *caffeic*, dan asam ferulat (Munne-bosch, 2012). Asam-asam fenolat seperti asam galat, *protocatechuic*, *gentisic*, *hydroxybenzoic*, *chlorogenic*, *vanilic*, dan *syringic* menunjukkan aktivitas antioksidan melalui kemampuannya dalam menetralkan radikal DPPH, mereduksi *iron(III) chloride*, serta melakukan aktivitas FIC. Dengan sifat-sifat tersebut, asam fenolat dianggap sebagai agen antioksidan alami yang memiliki potensi tinggi (Farvin & Jacobsen, 2013).

2.4 Jenis-jenis Antikoagulan

Antikoagulan merupakan zat yang ditambahkan untuk mencegah terjadinya pembekuan darah. Mekanisme kerja antikoagulan bervariasi, di antaranya ada yang menghambat pematangan protein faktor VII (prokonvertin), serta ada pula yang bekerja dengan cara mengikat ion Ca^{2+} (kalsium). Jenis antikoagulan yang bekerja dengan mengikat kalsium meliputi flourida, oksalat, dan sitrat. Sementara itu, heparin berfungsi sebagai antikoagulan dengan cara mengaktifkan antitrombin. Ada pula senyawa yang bersifat sebagai penchelator kation bivalen (*chelating agent*) yaitu EDTA (Sadikin, 2002).

2.4.1 Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA)

Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA) digunakan secara luas dalam berbagai pemeriksaan hematologi, seperti pengukuran kadar hemoglobin, perhitungan jumlah leukosit, eritrosit, trombosit, retikulosit, hematokrit, serta dalam penentuan Laju Endap Darah (Gandasoebrata, 2010). Namun, penggunaan EDTA dalam jumlah berlebih sebaiknya dihindari, karena konsentrasi lebih dari 2 mg per mL dapat menyebabkan pembacaan nilai hematokrit menjadi lebih rendah dari kondisi sebenarnya. Untuk mencegah terjadinya pengenceran darah, dapat digunakan EDTA dalam bentuk kering. Meski begitu, perlu dilakukan homogenisasi pada tabung berisi darah dan EDTA selama 1–2 menit, karena EDTA kering cenderung sulit larut (Gandasoebrata, 2010). Rumus kimia EDTA adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (Wirawan & Silman, 2000).

EDTA bekerja dengan cara mengikat ion kalsium, membentuk senyawa garam kalsium yang tidak larut. Dosis yang dianjurkan untuk penggunaan EDTA adalah sekitar 1–1,5 mg per mililiter darah. EDTA tidak memengaruhi ukuran maupun morfologi trombosit dan leukosit, serta mampu mencegah agregasi trombosit, sehingga sangat ideal digunakan sebagai antikoagulan dalam pemeriksaan jumlah trombosit. Setiap 1 mg EDTA dapat mencegah pembekuan 1 mL darah. EDTA yang umum digunakan adalah dalam bentuk larutan 10% sebanyak 0,01 mL per 1 mL darah, atau dalam bentuk kering sebanyak 1 mg per 1 mL darah (Pratini et al., 2019).

2.4.2 Natrium Sitrat

International Committee for Standardization in Hematology (ICSH) dan *International Society for Thrombosis and Haematology* telah merekomendasikan natrium sitrat sebagai antikoagulan untuk pemeriksaan koagulasi (Kiswari, 2014). Natrium sitrat merupakan antikoagulan yang aman dan tidak bersifat toksik, bekerja dengan cara mengikat ion kalsium untuk mencegah terjadinya pembekuan darah (Yayuningsih et al., 2018). Antikoagulan ini umum digunakan dalam pemeriksaan waktu protrombin (Protrombin Time). Mekanismenya melibatkan pembentukan kompleks kalsium sitrat melalui ikatan antara sitrat dan ion kalsium, yang kemudian menghentikan proses koagulasi. WHO dan NCCLS merekomendasikan penggunaan natrium sitrat dalam konsentrasi 3,2% (setara dengan 109 mmol/L).

Penggunaan konsentrasi natrium sitrat yang bervariasi dalam pemeriksaan dapat memengaruhi hasil uji koagulasi, termasuk waktu protrombin (Protrombin Time). Natrium sitrat dalam tabung reaksi berfungsi mengikat ion kalsium dalam sampel darah. Jika jumlah sitrat yang digunakan terlalu banyak, maka lebih banyak ion kalsium akan terikat, yang pada akhirnya menyebabkan waktu pembekuan darah menjadi lebih lama (Adcock, 1997).

2.4.3 Heparin

Heparin bekerja secara tidak langsung pada jalur koagulasi intrinsik maupun ekstrinsik dengan cara meningkatkan aktivitas antitrombin III dan menghambat kerja faktor koagulasi IX, X, XI, dan XII. Selain itu, heparin juga mendorong pembentukan kompleks antara antitrombin III dan trombin, yang berperan dalam mencegah perubahan fibrinogen menjadi fibrin. Dengan mekanisme ini, heparin menghambat pembentukan trombin dari protrombin, sehingga mencegah proses pembentukan fibrin (Nugraha, 2015). Plasma yang diperoleh dengan bantuan heparin sebagai antikoagulan umumnya digunakan dalam berbagai tes kimia, seperti pemeriksaan kadar elektrolit (Kiswari, 2014). Dalam praktik laboratorium, heparin tersedia dalam bentuk larutan maupun kering, dan tidak mengikat ion (Gandasoebrata, 2008).

Heparin menunjukkan aktivitas antikoagulannya dengan cara menghambat faktor Xa melalui interaksinya dengan antitrombin III, yang berujung pada terhambatnya konversi protrombin menjadi trombin. Proses ini tidak memengaruhi bentuk morfologis eritrosit maupun leukosit (Priyana, 2021). Namun demikian, penggunaan heparin juga dapat menyebabkan agregasi atau penggumpalan sel, yang dapat mengganggu keakuratan hasil perhitungan seluler (Stokol et al., 2014).

2.4.4 Aspirin

Aspirin, atau dikenal juga sebagai asam asetilsalisilat, merupakan senyawa turunan salisilat yang umum digunakan dalam penanganan penyakit kardiovaskular, nyeri, dan peradangan. Dosis penggunaan aspirin disesuaikan dengan tujuan terapinya, yaitu 75 mg sebagai antiplatelet, 325–600 mg untuk meredakan nyeri (analgesik), dan 1,2 gram bila digunakan sebagai antiinflamasi (Dovizio et al., 2013). Mekanisme kerja aspirin melibatkan penghambatan enzim *cyclooxygenase* (COX) dan *prostaglandin endoperoxidase synthase*. Aspirin bekerja dengan menghambat akses asam arakidonat ke situs enzim, sehingga terjadi inhibisi pada COX-1 dan COX-2 (Fuster et al., 2011). Sebagai obat antiinflamasi nonsteroid, aspirin menonaktifkan enzim COX secara ireversibel (Alfonso et al., 2014). Penggunaan aspirin juga terbukti menurunkan risiko serangan jantung dan stroke, melalui mekanisme pencegahan terbentuknya bekuan darah di atas plak aterosklerotik yang mengalami ruptur.

Plak aterosklerosis dapat berkembang secara bertahap di dalam pembuluh darah selama bertahun-tahun sebagai reaksi terhadap kerusakan yang disebabkan oleh tekanan darah tinggi, kadar gula darah yang tidak stabil, kolesterol tinggi, serta paparan zat beracun dari asap rokok. Aspirin berfungsi dengan mencegah agregasi platelet, sehingga menghambat pembentukan bekuan darah (Paikin & Eikelboom, 2012). Aspirin sendiri merupakan senyawa asam organik dengan nilai pKa sebesar 3,5. Setelah dikonsumsi, salisilat dalam plasma mencapai konsentrasi puncaknya dalam waktu 1 hingga 2 jam, karena penyerapannya yang cepat di lambung dan usus bagian atas. Di dalam serum, aspirin memiliki waktu paruh sekitar 15 menit sebelum dikonversi menjadi asam asetat dan salisilat oleh enzim

esterase dalam jaringan serta darah. Aspirin juga memiliki afinitas pengikatan yang tidak linear terhadap albumin. Salisilat bebas dan metabolit konjugasinya kemudian dikeluarkan dari tubuh melalui urin (Katzung et al., 2013).

2.5 Endotoksin Bakteri

Endotoksin merupakan molekul kecil yang bersifat hidrofobik dan merupakan bagian dari struktur kompleks lipopolisakarida yang membentuk sebagian besar membran luar bakteri Gram negatif. Ketika bakteri mengalami kematian dan membran luarnya rusak, endotoksin akan dilepaskan ke lingkungan sekitarnya (Dullah & Ongkudon, 2017). Secara struktural, endotoksin terdiri dari tiga bagian utama: lipid A, inti (core), dan rantai-O. Lipid A merupakan glikofosfolipid yang mengandung wilayah hidrofobik karena adanya residu asam lemak, serta memiliki muatan ionik akibat keberadaan gugus fosfat pada bagian gula (Ørving et al., 2020). Bagian inti tersusun dari berbagai jenis residu gula dan sangat bermuatan negatif karena mengandung gugus karboksil dan fosfat, yang memperkuat ikatan antar molekul endotoksin melalui pembentukan jembatan garam. Sementara itu, rantai-O terdiri dari unit-unit oligosakarida berulang yang bervariasi, dan terletak di bagian paling luar dari struktur endotoksin (Ørving et al., 2020).

Endotoksin memiliki sifat yang memungkinkan berinteraksi secara kuat dan stabil dengan biomolekul lain, sehingga menjadikannya sulit untuk dihilangkan, khususnya dalam proses produksi obat-obatan biofarmasi (Dullah & Ongkudon, 2017). Sejumlah biomolekul telah dilaporkan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan endotoksin, antara lain *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI), protein P amiloid, protein kationik, lisozim, dan laktoferin (Balakrishnan et al., 2013).

Endotoksin tidak dapat dihilangkan melalui proses sterilisasi karena LPS justru dilepaskan setelah sel bakteri mati. Meskipun suatu produk telah disterilkan, endotoksin dari bakteri Gram negatif tetap dapat ditemukan apabila bakteri tersebut sudah ada sebelum sterilisasi dilakukan (Ongkudon et al., 2012). Oleh karena itu, deteksi LPS dalam produk akhir menjadi sangat penting untuk memastikan keamanan produk yang telah disterilkan, khususnya dalam aplikasi

seperti produk biologis, alat kesehatan, obat-obatan parenteral, serta dalam pengawasan ketahanan pangan dan air (Ding et al., 2015). Ada beberapa metode yang biasa digunakan dalam mendeteksi endotoksin bakteri, seperti:

2.5.1 LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*)

Metode uji LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) memanfaatkan ekstrak hemolim dari sel amoebosit kepiting tapal kuda (*Limulus polyphemus*), yang diproses secara khusus menjadi reagen LAL (Iwana, 1993). Dalam metode ini, keberadaan endotoksin terdeteksi melalui terbentuknya koagulan pada sampel yang mengandung endotoksin. Setiap metode uji memiliki kelebihan dan keterbatasan tersendiri. Untuk memperoleh reagen LAL, kepiting tapal kuda berukuran besar ditangkap dan diperiksa kesehatannya, lalu hemolimnya diambil menggunakan jarum suntik. Hemolim yang diperoleh kemudian disentrifugasi untuk memisahkan sel amoebosit dari plasma. Selanjutnya, amoebosit dikeringkan secara beku (*freeze-dried*) dan diproses lebih lanjut sebagai bahan uji. Proses ekstraksi ini melibatkan tahap-tahap yang kompleks, sehingga menjadikan biaya LAL test cukup tinggi (Fricker, 2007).

Metode LAL dikenal sebagai salah satu prosedur paling akurat dan sensitif untuk mendeteksi kandungan endotoksin dalam produk farmasi, karena kemungkinannya yang rendah menghasilkan hasil negatif atau positif palsu. Kelebihan lainnya termasuk kebutuhan sampel yang relatif sedikit dan metode ini telah terstandarisasi dengan sensitivitas yang dapat diatur, sehingga biaya pengujiannya lebih rendah dibandingkan dengan metode *Rabbit Pyrogen Test* (RPT). Namun, kekurangan dari metode ini adalah waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan hasil relatif lebih lama, karena belum tersedia sistem otomatisasi. Selain itu, beberapa faktor eksternal juga dapat memengaruhi keakuratan hasil, seperti keberadaan inhibitor kimia seperti EDTA yang dapat mengganggu reaksi LAL, perubahan struktur protein, ketidakseimbangan pH, serta inhibitor fisik yang mampu menyerap endotoksin (Chen & Mozier, 2013).

2.5.2 *Rabbit Pyrogen Test*

Rabbit Pyrogen Test (RPT) pertama kali digunakan pada tahun 1942 dan terus dimanfaatkan selama kurang lebih empat dekade berikutnya. Prinsip dasar dari metode ini adalah dengan memantau perubahan suhu tubuh hewan uji, yaitu kelinci, setelah diberikan injeksi sampel produk (Park et al., 2005). Kelinci dipilih karena kemampuannya dalam mendeteksi berbagai jenis pirogen, termasuk endotoksin. Namun, RPT hanya memberikan hasil yang bersifat kualitatif dan memiliki tingkat sensitivitas yang relatif rendah. Pengujian dengan metode ini memiliki keterbatasan, antara lain karena kelinci dapat mengembangkan toleransi terhadap pirogen akibat injeksi berulang atau mengalami stres selama proses pengujian. Prosedur pengujiannya cukup sederhana, yaitu dengan menempatkan kelinci dalam kandang khusus agar tidak bergerak, lalu menyuntikkan produk uji ke dalam pembuluh darah pada telinga kelinci dan memantau perubahan suhu tubuhnya. Apabila terjadi peningkatan suhu (demam), maka produk dianggap mengandung jumlah pirogen yang signifikan. Sebaliknya, jika tidak terjadi demam, produk tersebut dinyatakan bebas dari pirogen dalam jumlah besar (untuk kelinci) dan dapat memperoleh sertifikasi bebas pirogen.

Metode RPT memiliki keunggulan karena prosedurnya cukup sederhana dan hasilnya bisa diperoleh dalam waktu relatif singkat. Namun, kelemahan utamanya adalah penggunaan hewan uji yang sangat besar, diperkirakan mencapai 400.000 ekor kelinci setiap tahunnya. Dalam satu kali pengujian, setidaknya dibutuhkan tiga ekor kelinci dan semuanya harus menunjukkan respons yang sama. Jika hanya satu kelinci mengalami demam sementara dua lainnya tidak, maka pengujian dianggap tidak valid dan harus diulang. Hal ini berdampak pada meningkatnya jumlah kelinci yang digunakan serta tingginya biaya pemeliharaan. Selain itu, hasil dari uji ini memiliki variabilitas yang tinggi, sehingga hasilnya tidak selalu konsisten atau dapat direproduksi. Respons demam pada kelinci juga tidak selalu mencerminkan reaksi yang akan terjadi pada manusia. Kelemahan lain dari metode ini adalah keterbatasannya dalam menguji beberapa jenis obat, seperti kemoterapi dan immunosupresif, serta kesulitan saat diaplikasikan pada alat kesehatan karena mekanisme pengujiannya yang tidak sesuai.

2.5.3 MAT (*Monocyte Activation Test*)

MAT (Monocyte Activation Test, EP 2.6.30) adalah metode pengujian berbasis sel yang digunakan untuk mendeteksi berbagai jenis pirogen, baik yang berasal dari endotoksin maupun non-endotoksin, dalam produk farmasi seperti vaksin, antibodi monoklonal, dan preparat hormon. Metode ini memiliki tingkat sensitivitas dan reproduisibilitas yang tinggi, sehingga hasilnya dapat diandalkan. Pada prosedur MAT, senyawa yang dapat mengaktifkan sel monosit manusia diukur secara *in vitro*, di mana sel tersebut akan melepaskan mediator endogen yang terlibat dalam respon demam pada manusia. Pelepasan mediator ini kemudian dianalisis menggunakan teknik ELISA (Poole dan Gaines, 2001). Dalam metode MAT, terdapat beberapa variasi yang memengaruhi hasil pengujian, termasuk sumber monosit darah manusia yang digunakan serta metode pembacaan menggunakan ELISA.

Sumber monosit yang digunakan dalam metode MAT dapat bervariasi, antara lain *whole blood cryopreserved*, *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), dan lini sel MonoMac 6 (MM6). Perbedaan jenis sumber monosit ini memengaruhi sensitivitas deteksi endotoksin. Saat ini, sel MM6 dianggap sebagai sumber terbaik untuk kit uji MAT karena mampu mencapai sensitivitas hingga 0,05 EU/mL (ICCVAM, 2008). Metode MAT dipilih karena memenuhi prinsip 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*), yaitu menggantikan metode LAL dengan kemampuan mendeteksi baik endotoksin maupun pirogen lainnya, mengurangi penggunaan hewan seperti kelinci dan keping tapal kuda, serta menghilangkan ketergantungan terhadap lisat hemolim keping. Dengan perkembangan metode MAT yang semakin maju, standar prosedurnya kini mampu mendeteksi minimal 50 pg/mL LPS dalam sampel.

2.5.4 rFC (*recombinant Factor C*)

Rekombinan Faktor C (rFC) adalah protein hasil rekayasa genetika yang dapat diaktifkan oleh endotoksin untuk menghasilkan produk berpendar yang dapat diukur. Dalam pengujian ini, protein Faktor C akan bereaksi dengan endotoksin dan menghasilkan sinyal fluoresensi melalui pasangan dengan

penanda tertentu. Prinsip kerja uji rFC serupa dengan uji LAL karena sama-sama memanfaatkan mekanisme biologis dari sistem pertahanan alami kepiting tapal kuda, namun tanpa menggunakan bahan hewani. rFC merupakan versi sintetis dari protein Faktor C yang biasanya diekstraksi dari hemolim kepiting tapal kuda, yang berperan sebagai komponen pertama dalam kaskade reaksi deteksi endotoksin pada uji LAL (Loverock, 2010).

Salah satu keunggulan dari metode rFC adalah kemampuannya untuk mendeteksi baik endotoksin maupun pirogen non-endotoksin (NEP). Selain itu, metode ini menjadi metode pertama yang diakui secara internasional dalam pengujian pirogen berdasarkan regulasi dan pedoman global (Park et al., 2005). Namun, metode rFC juga memiliki beberapa kekurangan, seperti sensitivitas yang masih dianggap rendah dalam konteks tertentu, bersifat kualitatif, tidak menyediakan kontrol positif, serta hasil uji yang dapat terpengaruh oleh respons fisiologis hewan uji. Selain itu, metode ini memerlukan jumlah hewan yang cukup banyak sebagai media uji, sehingga menyebabkan tingginya biaya pengujian (Park et al., 2005). Meski demikian, sensitivitas deteksi endotoksin pada metode rFC sebenarnya sangat tinggi, yakni berada pada kisaran 0,005 EU/mL hingga 0,001 EU/mL.

2.6 Metode Penelitian

Ada beberapa metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu:

2.6.1 Uji Aglutinasi

Pemeriksaan aglutinasi merupakan metode diagnostik yang sederhana, cepat, dan ekonomis, serta tidak memerlukan keterampilan teknis khusus. Salah satu bentuknya adalah uji aglutinasi lateks, yang didasarkan pada reaksi aglutinasi akibat interaksi antara antigen dan antibodi. Metode ini digunakan untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen melalui terjadinya aglutinasi partikel, seperti bakteri, sel darah merah, atau partikel lateks yang telah dilapisi dengan antigen atau antibodi. Prinsip dasar dari tes ini terletak pada sifat bivalen antibodi, yang mampu menghubungkan antigen partikulat secara silang sehingga membentuk agregat. Dalam praktiknya, dilakukan pengenceran serum secara

bertingkat untuk mengamati kemampuan serum dalam menimbulkan atau menghambat aglutinasi. Nilai titer antibodi atau antigen kemudian ditentukan berdasarkan pengenceran tertinggi yang masih menunjukkan reaksi aglutinasi atau menghambatnya.

2.6.2 Uji Koagulasi

Koagulasi atau proses pembekuan darah adalah reaksi biokimia kompleks di mana protein-protein dalam plasma, terutama fibrinogen, saling berinteraksi dan mengalami transformasi menjadi fibrin, suatu bentuk gel yang tidak larut dan stabil (Sacher & McPherson, 2000). Proses ini berperan penting dalam menghentikan perdarahan. Dalam konteks laboratorium, uji koagulasi dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan suatu mikroorganisme (khususnya bakteri) dalam memproduksi enzim yang dapat memicu pembekuan darah. Salah satu metode yang digunakan adalah metode Lee-White, yang bertujuan untuk mengukur waktu yang dibutuhkan darah untuk membeku secara visual, sehingga dapat digunakan sebagai indikator aktivitas koagulasi.

2.6.3 Ekspresi Gen

Ekspresi gen merupakan rangkaian proses di mana informasi genetik yang tersimpan dalam urutan basa DNA atau RNA diterjemahkan menjadi produk fungsional, seperti protein, yang kemudian membentuk fenotipe suatu organisme (Helen et al., 2003). Tanpa proses ekspresi ini, informasi genetik tidak akan memiliki makna biologis. Produk dari ekspresi gen umumnya berupa protein, meskipun ada juga produk non-protein seperti RNA fungsional, contohnya tRNA (transfer RNA), rRNA (ribosomal RNA), dan snRNA (small nuclear RNA). Untuk mengekspresikan gen-gen tersebut, sel terlebih dahulu menyalin informasi dari DNA ke dalam bentuk mRNA melalui proses yang disebut transkripsi. Selanjutnya, informasi yang terkandung dalam mRNA diterjemahkan menjadi protein melalui proses translasi. Melalui mekanisme inilah sifat genetik dapat diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya.

Metode *Real Time Polymerase Chain Reaction* (RTPCR) telah digunakan dalam pengujian yang mampu secara spesifik mendeteksi pada tingkat DNA (Orbayinah et al., 2019; Mariyani et al., 2021). *Quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) memiliki kelebihan, antara lain mampu untuk mengidentifikasi dengan menggunakan sampel yang sedikit, tidak memerlukan visualisasi, memiliki risiko kontaminasi yang rendah, serta dapat diterapkan pada sejumlah sampel yang banyak (Rahmania et al., 2021).

2.6.4 FTIR (*Fourier Transform Infra Red*)

Dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan *Spektrofotometri Fourier Transform Infrared* (FTIR) telah mengalami kemajuan pesat, melampaui sekadar analisis struktur dasar molekul (Theakstone et al., 2021). FTIR merupakan teknik spektroskopi yang digunakan untuk mempelajari struktur molekul suatu senyawa dengan mengukur interaksi antara radiasi inframerah dan materi (Martin, 2018). Saat sampel dianalisis menggunakan instrumen FTIR, data yang dihasilkan berupa spektrum inframerah. Spektrum ini dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi senyawa, baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Andriansyah et al., 2021).

Spektrometri inframerah (IR) dapat dilakukan melalui dua pendekatan utama, yakni teknik transmisi dan reflektansi. Metode transmisi digunakan untuk menganalisis penyerapan radiasi IR dalam volume sampel dan dapat diterapkan pada sampel dalam bentuk padat, cair, maupun gas dengan prosedur yang sesuai. Untuk sampel padat, spektrum dapat diperoleh menggunakan tablet KBr atau NaCl, sedangkan sampel cair atau suspensi biasanya diuji dalam parafin cair. Jika sampel cukup tipis dan transparan, spektrumnya bisa diukur langsung (Ferraro, 2014). Tiga teknik umum dalam pengukuran spektrum FTIR adalah *Photo Acoustic Spectroscopy* (PAS), *Attenuated Total Reflectance* (ATR), dan *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform* (DRIFT), yang masing-masing memiliki kemampuan unik dalam mendeteksi vibrasi molekul tertentu (Beasley et al., 2014).

2.7 Struktur Dinding Sel Bakteri

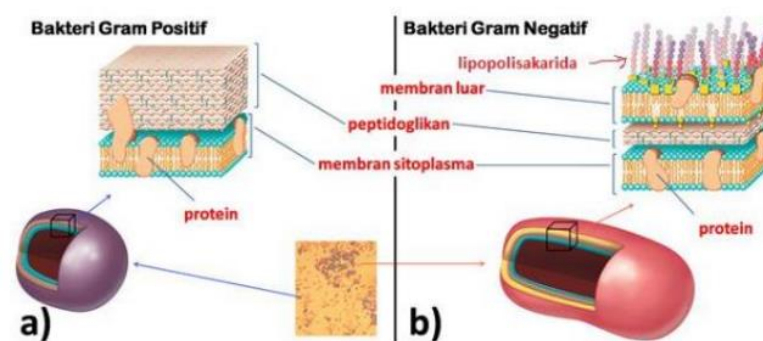
Dinding sel bakteri menentukan bentuk-bentuk sel bakteri dan memiliki struktur yang rumit dan agak kaku. Dinding sel yang kaku memungkinkan bakteri bertahan menghadapi perbedaan konsentrasi osmosis dan menjaga sitoplasma agar tidak mengembang melebihi batas dinding tersebut. Hingga saat ini, diketahui bahwa ketebalan dinding sel bakteri berkisar antara 10 hingga 35 nm. Kakunya dinding sel bakteri disebabkan oleh kandungan peptidoglikan (PG). Peptidoglikan tersusun oleh M-asetigloko-samin (NAG), Asam N-asetilmuramat (NAM), serta peptida yang terdiri dari asam amino, alani, glutamate, diaminopimelat atau lisin dan alanin. Peptidoglikan juga dikenal dengan sebutan mukopeptida, glikopeptida, muropeptide atau murein peptidoglikan. Serat-serat peptidoglikan membentuk anyaman yang kuat tetapi tidak padat (tidak solid), sehingga memungkinkan masuknya air, zat-zat makanan seperti mineral, glukosa, asam amino atau bahkan molekul organik.

Berdasarkan perbedaan kandungan dinding selnya, bakteri dapat dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi (Nurhidayati et al., 2015). Perbedaan susunan dinding bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan susunan dinding bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif

No.	Gram positif	Gram negatif
1	Komponen terbesarnya adalah peptidoglikan (terdiri dari 40 lapis rangka dasar murein, meliputi 30-70% berat kering dinding sel bakteri)	Terdiri dari 3 lapisan: 1. Lapisan dalam adalah peptidoglikan 2. Satu lapis rangka dasar murein (diaminopemelat dan tidak mengandung lisin)

		dan hanya meliputi + 10% dari berat kering dinding sel 3. Lapisan luar lipopolisakarida dan lipoprotein
2	Pada beberapa bakteri terdapat asam teikoat	Tidak ada asam teikoat
3	Peptidoglikan mengalami lisis oleh lisozim	Lisozim melunakan dinding sel, detergen mengadakan disorganisasi dinding itu dengan merusak lapisan lipida
4	Dinding sel tebal sekitar 25-30 nm	Dinding sel tipis sekitar 10-15 nm
5	Lebih rentan terhadap penisilin	Kurang rentan terhadap penisilin
6	Menyerap pewarna dasar (ex: kristal violet) sehingga berwarna ungu ketika proses pewarnaan	Tidak begitu menyerap pewarna dasar, namun bisa dengan pewarnaan safranin (merah)



Gambar 5. Perbedaan dinding (a) sel bakteri Gram positif dan (b) sel bakteri Gram negatif

Sumber (Rini & Rohmah, 2020)

2.8 Proses Koagulasi Hemolim Krustasea

Proses koagulasi hemolimfa pada kepiting tapal kuda telah menjadi objek studi ilmiah selama lebih dari seratus tahun. Lipopolisakarida dalam kadar yang

C. Mekanisme aktivasi ini dianggap serupa dengan aktivasi trombosit oleh trombin melalui reseptor yang diaktifkan oleh proteinase (Kawabata et al., 2009).

Dalam plasma, LPS (lipopolisakarida) berikatan dengan domain kaya sistein di ujung amino (aminoterminal), yang memicu aktivasi autokatalitik faktor C zymogenik menjadi enzim protease aktif. Enzim aktif ini kemudian mengaktifkan faktor B, yang selanjutnya memotong proenzim pembekuan (*proclotting enzyme*) dalam jalur kaskade tersebut. Proenzim ini kemudian mengonversi koagulogen menjadi koagulin, yang selanjutnya berpolimerisasi secara non-kovalen. Masing-masing dari tiga enzim protease yang terlibat dalam jalur ini dikendalikan oleh serpin tertentu, yang berfungsi mencegah penyebaran enzim aktif ke seluruh hemocoel (rongga tubuh).

Ketiga serpin tersebut memiliki urutan konsensus yang bersifat hidrofobik dan serupa dengan serpin yang ditemukan pada mamalia, yang mengindikasikan adanya kemungkinan mekanisme pembersihan endositotik terhadap enzim pembekuan yang telah berikatan dengan serpin di dalam tubuh kepiting tapal kuda. Walaupun komponen-komponen dalam kaskade pembekuan darah kepiting tapal kuda tidak menunjukkan hubungan yang kuat dengan protein pembekuan dari spesies lain yang telah diketahui, beberapa karakteristik struktural yang menarik berhasil diidentifikasi. Misalnya, koagulogen menunjukkan kesamaan struktur dengan ligan Toll yang dikenal sebagai Spätzle. Selain itu, faktor B dan enzim pro-pembekuan memiliki domain klip pada bagian amino-terminal, yang juga ditemukan pada sejumlah proteinase serin dan homolognya yang berperan dalam sistem imun arthropoda.

Dalam jalur alternatif, faktor G diaktifkan secara proteolitik setelah berikatan dengan β -1,3-glukan, dan kemudian mengaktifkan enzim prekursor pembekuan. Faktor G merupakan protein dimerik yang terdiri dari dua subunit, yakni subunit besar yang mengandung domain mirip glukonase dan xilanase, serta subunit kecil yang memiliki domain serin proteinase (Takaki et al., 2002). Meski demikian, mekanisme pasti bagaimana glukon dapat memicu pelepasan sistem koagulasi dari hemosit masih belum sepenuhnya dipahami. Meskipun TGase tidak berperan langsung dalam pembentukan koagulin, enzim ini tetap memiliki peran penting dalam proses pembekuan karena membentuk ikatan silang antara bekuan

dengan proxin, sehingga memperkuat dan menstabilkan struktur bekuan. Selain itu, TGase juga memfasilitasi pembentukan ikatan silang antara proxin dan stablin, sebuah protein lain yang dilepaskan melalui proses eksositosis (Matsuda et al., 2007).

Ikatan terakhir ini kemungkinan berperan penting dalam mengimobilisasi bakteri pada jaring bekuan melalui interaksi antara stablin dengan asam lipoteikoat dan lipopolisakarida (LPS) (Kawabata et al., 2009). Proses ini membantu mencegah penyebaran bakteri dari lokasi luka. Selain fungsinya tersebut, stablin juga diperkirakan memiliki peran penting dalam membentuk struktur bekuan, karena keberadaan antibodi terhadap stablin terbukti dapat menghambat proses pembekuan. Lebih jauh lagi, aktivasi sistem koagulasi tidak hanya memicu pembentukan bekuan, tetapi juga melibatkan berbagai respons pertahanan lainnya, seperti proses penyembuhan luka, aktivasi sistem komplemen primitif, pelepasan senyawa antimikroba, serta perubahan hemosianin menjadi fenoloksidase (Cerenius et al., 2010).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

3.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Agustus 2024.

3.1.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan Laboratorium Produktivitas, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah dan Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT).

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini

No.	Nama Bahan	Konsentrasi	Merek	Fungsi
1	Aquades	-	-	Pelarut bahan kimia.
2	Alkohol	70%	Onemed	Bahan untuk melakukan sterilisasi.
3	Aspirin	10%	Aspilets Chewable	Antikoagulan.
4	Ethylen Diamin Tetra Acetate (EDTA)	10%	-	Bahan antikoagulan.
5	Natrium Sitrat	10%	-	Bahan antikoagulan.
6	Heparin	-	-	Bahan antikoagulan.
7	Ekstrak Fukoidan	-	Sargassum sp.	Bahan antikoagulan.

No.	Nama Bahan	Konsentrasi	Merek	Fungsi
8	Media TSA	-	-	Media untuk menumbuhkan bakteri.
9	Media TSB	-	-	Media untuk memperbanyak bakteri.
10	Spiritus	-	-	Bahan bakar Bunsen.
11	Etanol	85%	-	Pelarut ekstraksi.
12	CaCl	2%	-	Pelarut ekstraksi.
13	HCl	0,01 M pH 2	-	Pelarut ekstraksi.
14	Es Batu	-	-	Menjaga ketahanan hemolim.
15	Isolate <i>Aeromonas hydrophila</i>	$3,4 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.
16	Isolate <i>E. coli</i>	$3,2 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.
17	Isolate <i>Vibrio harveyi</i>	$2,6 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.
18	Isolate <i>Vibrio alginolyticus</i>	4×10^9	-	Uji aglutinasi.
19	Isolate <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$3,9 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.
20	Isolate <i>Salmonella</i> spp.	$3,8 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.
21	Isolate <i>Staphylococcus aureus</i>	$3,5 \times 10^9$	-	Uji aglutinasi.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Alat yang digunakan dalam penelitian ini

No.	Nama Alat	Merek	Fungsi
1	Mesin giling	FFC 37	Menghaluskan <i>Sargassum</i> sp.
2	Cawan petri	Iwaki Pyrex, 100x15mm	Wadah media bakteri.
3	Bunsen	-	Alat sterilisasi.
4	Tabung Erlenmeyer	Iwaki Pyrex, 250 mL	Wadah membuat media larutan antikoagulan.
5	Spatula	-	Mengambil bahan bentuk serbuk
6	Mikro pipet	DLAB (Vol 0-10µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Mengambil larutan volume mikro.
7	Alumunium foil	Klin Pak	Menutup alat yang diperlukan.

No.	Nama Alat	Merek	Fungsi
8	Jarum ose	HHH Jerman	Mengambil koloni bakteri.
9	Spreader	Bacterial Cell Spreader Glass Drigalki Triangle	Alat meratakan bakteri ke media.
10	Hot plate	MS-H280-Pro	Memanaskan larutan.
11	Inkubator	As One 1- 6767-02 A5501 (55L)	Inkubasi sampel.
12	Magnetic stirrer	PTFE	Menghomogenkan larutan.
13	Lemari pendingin	Sharp	Penyimpanan sampel dan media.
14	<i>Coolbox</i>	Lion Star	Meletakkan lobster.
15	<i>Laminar flow</i>	Nuaire	Ruang kerja kaca aseptis.
16	Tabung reaksi	Iwaki Pyrex, 15 mL	Wadah media bakteri.
17	Label	-	Penanda sampel.
18	<i>Autoclaf</i>	Gea YX-18 LDJ	Mensterilkan alat dan bahan uji.
19	Timbangan digital	Sojikyō	Menimbang bahan.
20	Kamera	-	Mendokumentasikan kegiatan.
21	Rak tabung reaksi	-	Meletakkan tabung reaksi.
22	Mortar porselen	As One	Menghaluskan sampel.
23	Plastik wrapping	Klin Pak	Membungkus cawan petri.
24	Karet gelang	-	Mengikat plastik tahan panas
25	Oven	Rio	Mengeringkan serbuk <i>Sargassum</i> sp.
26	Disposable Syringe	Onemed	Mengambil hemolim lobster.
27	Sarung tangan kerja	-	Melindungi tangan saat memegang lobster
28	Sarung tangan latex	Onemed	Melindung tangan dari kontaminasi.
29	<i>Disposable Needle</i> 23 G dan 27 G	Onemed	Mengambil hemolim lobster.
30	Shaker	Joan Lab	Pengaduk sampel
31	Toples Kaca	-	Meletakkan ekstrak fukoidan.
32	Tabung corning	-	Meletakkan larutan yang akan digunakan.
33	<i>Microtube</i> 1,5 mL	Biologix	Meletakkan hemolim yang akan digunakan.
34	Gelas ukur	Iwaki Pyrex	Mengukur volume larutan.
35	<i>Centrifuge</i>	Corona GL-08	Memisahkan atau mengendapkan partikel.
36	Akuarium	-	Tempat pemeliharaan lobster.
37	Filter	-	Menjaga kebersihan akuarium.
38	Jeriken	-	Tempat aquades.
39	Kertas saring	-	Penyaring ekstrak.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif yaitu dengan skrining jenis dan dosis antikoagulan menggunakan 1 kontrol dan 5 perlakuan (antikoagulan) dengan 3 kali ulangan menggunakan dosis yang berbeda, uji koagulasi endotoksin menggunakan antikoagulan yang terbaik dan uji ekspresi gen. Adapun dosis yang digunakan seperti berikut:

A : Hemolim lobster tanpa penambahan antikoagulan (kontrol negatif)

1. 1:1 = 25µl hemolim lobster
2. 1:2 = 25µl hemolim lobster
3. 2:1 = 50µl hemolim lobster

B : Hemolim lobster dengan penambahan antikoagulan berupa aspirin, EDTA, natrium sitrat, dan heparin (perlakuan)

1. 1:1 = 25µl hemolim lobster : 25µl antikoagulan (aspirin, EDTA, natrium sitrat dan heparin)
2. 1:2 = 25µl hemolim lobster : 50µl antikoagulan (aspirin, EDTA, natrium sitrat dan heparin)
3. 2:1 = 50µl hemolim lobster : 25µl antikoagulan (aspirin, EDTA, natrium sitrat dan heparin)

C : Hemolim lobster dengan penambahan fukoidan (perlakuan)

1. 2:3 = 50µl hemolim lobster : 75µl fukoidan
2. 2:4 = 50µl hemolim lobster : 100µl fukoidan
3. 2:5 = 50µl hemolim lobster : 125µl fukoidan

D : Hemolim lobster dengan penambahan fukoidan (perlakuan) yang gagal

1. 1:1 = 25µl hemolim lobster : 25µl fukoidan
2. 1:2 = 25µl hemolim lobster : 50µl fukoidan
3. 1:3 = 25µl hemolim lobster : 75µl fukoidan
4. 1:4 = 25µl hemolim lobster : 100µl fukoidan
5. 2:1 = 50µl hemolim lobster : 25µl fukoidan
6. 3:1 = 75µl hemolim lobster : 25µl fukoidan
7. 3:2 = 75µl hemolim lobster : 50µl fukoidan
8. 4:1 = 100µl hemolim lobster : 25µl fukoidan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Media Pemeliharaan

Media pemeliharaan yang digunakan adalah aquarium berukuran 100x40x40 cm yang dilengkapi dengan aerasi dan filter yang akan menjaga kebersihan aquarium. Media pemeliharaan diisi menggunakan air laut dan ditambah dengan pasir karang.

3.4.2 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini Lobster Pasir (*Panulirus homarus*) yang diambil dari Balai Besar Perikanan Budidaya Laut (BBPBL) Lampung dengan bobot berkisar 200 ± 25 g dengan panjang berkisar $17,5 \pm 1,5$ cm. Lobster pasir (*Panulirus homarus*) ini diberikan pakan berupa cumi-cumi yang dipotong kecil-kecil.

3.4.3 Persiapan *Sargassum* sp.

Sampel rumput laut coklat *Sargassum* sp. dikumpulkan dari sekitar perairan Lampung yaitu di Pantai Bengkunt, Pesisir Barat. *Sargassum* sp. yang sudah didapatkan kemudian dicuci dengan air tawar dan dikeringkan pada suhu ruang. *Sargassum* sp. yang sudah kering lalu digiling hingga menjadi tepung. *Sargassum* sp. kemudian disimpan pada tempat yang tidak lembab dengan suhu berkisar 18-23°C.

3.4.4 Ekstraksi Fukoidan

Serbuk *Sargassum* sp. Sebanyak 150 g ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,01 g. Serbuk tersebut kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berukuran 1000 ml dan ditambah pelarut polar berupa etanol 85% sebanyak 900 ml. Campuran tersebut dimaserasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah proses maserasi, serbuk *Sargassum* sp. dimasukkan ke dalam waterbath pada suhu 70°C selama 10 jam untuk proses depigmentasi dan deproteinasi. Selanjutnya, dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring

untuk memperoleh supernatan dan residu. Supernatan yang dihasilkan pada tahap ini tidak digunakan dan dibuang, sementara residu dari proses depigmentasi selanjutnya diekstraksi kembali dengan penambahan 900 ml larutan CaCl_2 2%. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dalam waterbath pada suhu 70°C selama 9 jam, dengan pengadukan setiap 30 menit. Setelah pemanasan, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm, lalu disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh supernatan yang dikenal sebagai fraksi A (laminaran) dan residu II. Supernatan pada tahap ini juga tidak digunakan, sedangkan residu II akan diekstraksi Kembali. Proses ekstraksi lanjutan dilakukan dengan menambahkan larutan HCl 0,01 M (pH 2) ke dalam residu II, kemudian dipanaskan kembali dalam waterbath pada suhu 70°C selama 9 jam dengan pengadukan setiap 30 menit. Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm dan disaring menggunakan kertas saring untuk memperoleh supernatant berupa fraksi B, yaitu fukoidan (Rahyuni, 2018).

3.4.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang berbahan kaca dicuci terlebih dahulu hingga bersih, dikeringkan, dan dibungkus menggunakan kertas HVS yang kemudian dimasukkan kedalam plastik tahan panas. Bahan yang digunakan berupa media agar yang sudah di-larutkan di dalam erlenmeyer dan ditutup menggunakan *aluminium foil*. Alat dan bahan disterilisasi dengan metode basah menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Alat lainnya seperti spreader dan jarum ose disterilisasi menggunakan bunsen dan alkohol 70%.

3.4.6 Pembuatan Media

3.4.6.1 Media TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Pembuatan media TSA dilakukan dengan menimbang media TSA sebanyak 4 g yang dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambah aquades steril sebanyak 100 ml, kemudian tutup mulut erlenmeyer menggunakan *aluminium*

foil. Larutan dihomogenkan dan dipanaskan sampai mendidih menggunakan *hot plate*. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Media TSA dituangkan ke cawan petri yang sudah steril (Maryani et al., 2020).

3.4.6.2 Media TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Pembuatan media TSB dengan menimbang media TSB sebanyak 3 g yang dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambah akuades steril sebanyak 100 ml, kemudian tutup mulut erlenmeyer menggunakan *aluminium foil*. Larutan dihomogenkan dan dipanaskan sampai mendidih menggunakan *hot plate*. Media selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 30 menit. Media TSB dituangkan ke tabung reaksi berukuran 10 ml yang sudah steril sebanyak 7 ml per tabung reaksi (Maryani et al., 2020).

3.4.7 Penanaman Bakteri

3.4.7.1 Penanaman Bakteri pada Media TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., dan *Staphylococcus aureus* diinokulasi menggunakan jarum ose pada media TSA kemudian di streak empat kuadran. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.4.7.2 Penanaman Bakteri pada Media TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., dan *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada media TSA kemudian dikultur pada media TSB dengan mengambil bakteri menggunakan jarum ose. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam dan diletakkan di atas *shaker*.

3.4.8 Pengambilan Hemolim Lobster

Pengambilan hemolim lobster dilakukan menggunakan jarum 27 *gauge* dengan *syringe* berukuran 1 ml pada bagian bawah kaki-kaki lobster. Spuit dibilas terlebih dahulu menggunakan antikoagulan berupa natrium sitrat, kemudian hemolim diambil hingga 1 ml. Setelah hemolim diambil kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* berukuran 1 ml, kemudian hemolim disimpan dalam *coolbox* yang sudah diisi dengan es batu. Cara pengambilan hemolim lobster dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Pengambilan hemolim lobster pasir

3.4.9 Pengamatan

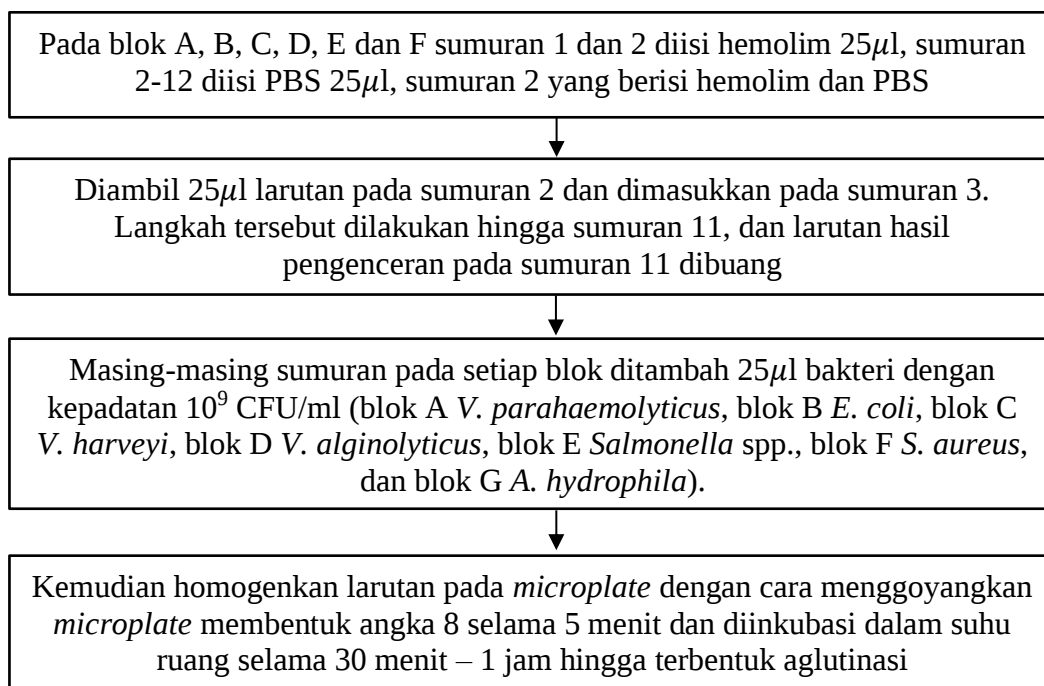
3.4.9.1 Uji Waktu Koagulasi

Uji waktu koagulasi ini menggunakan metode *Lee-White* sebagai penentu lama pembekuan darah (koagulasi) yang diamati secara langsung. Antikogulan berupa aspirin, *Ethylene Diamine Tetra Acetate* (EDTA), natrium sitrat, heparin dan fukoidan dimasukkan ke dalam *microplate* sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan menggunakan *micropipet* dengan bantuan *yellowtip* dan *whitetip*. Kemudian, ambil hemolim lobster pasir sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan dan dimasukkan ke dalam *microplate*. Amati lama pembekuan hemolim lobster pasir dengan menggunakan *stopwatch* hingga 40 menit. Setelah diamati selama 40 menit kemudian tutup *microplate* dan lapiisi dengan *plastic wrap* dan kemudian simpan di kulkas. Amati kembali lama pembekuan hemolim setiap 1 hari sekali selama 3 hari.

3.4.9.2 Uji Aglutinasi Endotoksin Bakteri

a. Uji Aglutinasi Hemolim Lobster

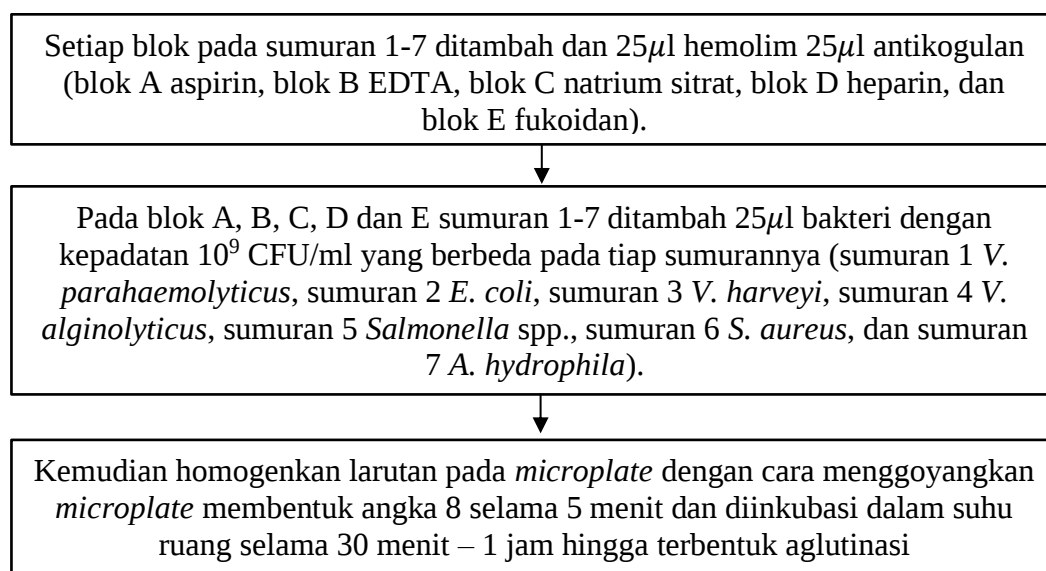
Pengamatan aglutinasi dilakukan menggunakan *microplate* 96 well with *lid flat*. Pada blok A, B, C, D, E, F dan G sumuran 1 dan 2 diisi hemolim 25 μ l, sumuran 2-12 diisi PBS 25 μ l, sumuran 2 yang berisi hemolim dan PBS diencerkan dengan bantuan *micropipet*, diambil 25 μ l larutan pada sumuran 2 dan dimasukkan pada sumuran 3. Langkah tersebut dilakukan hingga sumuran 11, dan larutan hasil pengenceran pada sumuran 11 dibuang. Pada blok A ditambah bakteri *V. parahaemolyticus*, blok B ditambah bakteri *E. coli*, blok C ditambah bakteri *V. harveyi*, blok D ditambah bakteri *V. alginolyticus*, blok E ditambah bakteri *Salmonella* spp., blok F ditambah bakteri *S. aureus*, dan blok G ditambah bakteri *A. hydrophila*. Kemudian homogenkan larutan pada *microplate* dengan cara menggoyangkan *microplate* membentuk angka 8 selama 5 menit. Inkubasi *microplate* pada suhu ruang selama 30-1 jam kemudian diamati aglutinasi yang terbentuk. Pengamatan uji aglutinasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengamatan uji aglutinasi hemolim lobster

b. Uji Aglutinasi Hemolim Lobster Dengan Penambahan Antikoagulan

Pengamatan aglutinasi hemolim lobster yang ditambah antikoagulan berupa aspirin, EDTA, natrium sitrat, heparin dan fukoidan dilakukan menggunakan *microplate* 96 well with lid flat. Pada blok A sumur 1-7 ditambah 25 μ l hemolim lobster dan 25 μ l aspirin. Pada blok B sumur 1-7 ditambah 25 μ l hemolim lobster dan 25 μ l EDTA. Pada blok C sumur 1-7 ditambah 25 μ l hemolim lobster dan 25 μ l natrium sitrat. Pada blok D sumur 1-7 ditambah 25 μ l hemolim lobster dan 25 μ l heparin. Pada blok E sumur 1-7 ditambah 25 μ l hemolim lobster dan 25 μ l fukoidan. Pada blok A, B, C, D dan E sumuran 1 ditambah bakteri *V. parahaemolyticus*, sumuran 2 ditambah bakteri *E. coli*, sumuran 3 ditambah bakteri *V. harveyi*, sumuran 4 ditambah bakteri *V. alginolyticus*, sumuran 5 ditambah bakteri *Salmonella* spp., sumuran 6 ditambah bakteri *S. aureus*, dan sumuran 7 ditambah bakteri *A. hydrophila*. Kemudian homogenkan larutan pada *microplate* dengan cara menggoyangkan *microplate* membentuk angka 8 selama 5 menit. Inkubasi *microplate* pada suhu ruang selama 30-1 jam kemudian diamati aglutinasi yang terbentuk. Pengamatan uji aglutinasi dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Pengamatan uji aglutinasi hemolim lobster ditambah antikoagulan

3.4.9.3 Ekspresi Gen

Dalam penelitian ini terdapat dua gen imun yang diamati yaitu LGBP (*lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein*) dan lectin. Masing-masing gen diamati dan dibandingkan dengan *housekeeping gene* sebagai kontrol internal. Primer masing-masing gen terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Primer gen imun lobster pasir (*Panulirus homarus*)

Gen	Primer	Sekuen (5'-3')	Accession	Referensi
LGBP	CqLGBP-qPCR-F	CAGCGGTGAGATTGACATT	KP100470	Hou et al. (2015)
	CqLGBP-qPCR-R	TGGAAACTGTTAGCGAAGG		
Lectin	CqCTL-qRT-F	ATGGTGAAGGCATGTGTGACG	MN944107	Wang et al. (2020)
	CqCTL-qRT-R	GCAGACCAAGGTCTCTTGCTCA		
Clotting protein	GPO-F	TTTTTCCGTGCAAAAAGGAC	AY973252	Haryati et al. (2017)
	GPO-R	TAATACGCGATGCCCTAAC		
β -actin (Internal control)	β -actin-F	ATCACTGCTCTGGCTCCTGCTACC		Hou et al. (2015)
	β -actin-R	CGGACTCGTCGTACTCCTCCTTGG		

a. Ekstraksi RNA dengan menggunakan Trizol Reagent (Invitrogen)

Metode isolasi RNA dilakukan sesuai dengan Schmittgen & Livak (2008). 50 μ L hemolim ditambah 500 μ L larutan Trizol Reagent. Hemolim dan Trizol dihomogenkan dengan menggunakan pipetting, inkubasi sampel pada suhu 15-30°C selama 5 menit. Tambahkan 100 μ L kloroform dan campur dengan kuat selama 5 detik, inkubasi pada suhu 15-30°C selama 2-3 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatant dibuang dan cuci dengan etanol 75% sebanyak 250 μ L lalu divortex. Sampel di sentrifugasi pada kecepatan 7.500 g selama 15 menit pada suhu 2-8°C. Buang etanol yang terdapat pada tube menggunakan *micropipette* dan keringkan pada suhu ruang selama 5-10 menit. Kemudian larutkan pellet RNA dengan

nuclease free water sebanyak 50-100 μl dan RNA siap digunakan atau disimpan pada suhu -20°C .

b. Sintesis cDNA (*Reverse transcription*)

Proses pembentukan RNA menjadi cDNA menggunakan AMV *transcriptase kit* (Promega). Sebanyak 2 μl RNA hasil ekstraksi dengan konsentrasi 100 μl direaksikan dengan 2,5 μl buffer AMV, 0,125 μl enzim AMV *transcriptase*, 2 μl *mix reverse primer*, dan 5,875 μl *nuclease free water*. Setelah dihomogenkan dengan vortex, campuran tersebut direaksikan pada suhu 42°C selama 30 menit dan dilanjutkan dengan inaktivasi enzim *reverse transcriptase* pada suhu 94°C selama 5 menit. cDNA hasil RT-PCR disimpan pada suhu -20°C . Komposisi bahan untuk sintesis cDNA dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Komposisi bahan untuk sintesis cDNA

Bahan	Volume (μL)
RNA 100 μl	2
Buffer AMV	2,5
Enzim AMV <i>transcriptase</i>	0,125
<i>Mix reverse primer</i>	2
<i>Nuclease free water</i>	5,875
Total	12,5

d. *Real Time Quantitative PCR* (qPCR)

Analisis tingkat ekspresi gen diuji dengan *real time PCR* (qPCR) menggunakan PCR *mix* yang terdiri dari 6,25 μl KAPA SYBR FAST qPCR *kit master mix* (2X) Universal (KAPA Biosystem), 0,25 μl primer *forward* (10 μM), 0,25 μl primer *reverse* (10 μM), dH_2O dan 0,125 μl ROX *Low reference dye*. PCR *mix* tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 96 *well-plate* dan diikuti dengan penambahan 2 μl sampel cDNA. Template cDNA sebelumnya diencerkan dengan *nuclease free water* dengan perbandingan 1:4. Setelah itu 96 *well-plate* ditutup menggunakan *optical strips* dan disentrifugasi dengan kecepatana 3000 rpm

selama 5 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *thermocycler* (7500 Fasn Real-Time PCR System, Applied Biosystems) untuk proses amplifikasi cDNA.

Program PCR yang digunakan adalah predenaturasi 94°C selama 7 menit. Bahan dan kondisi qPCR terdapat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Bahan qPCR-Mix

Bahan	Volume (μL)
KAPA SYBR FAST Universal	6,25
Primer Forward	0,25
Primer <i>reverse</i>	0,25
ROX <i>Low reference dye</i>	0,125
dH ₂ O	10

Tabel 7. Kondisi qPCR

Program	Suhu (°C)	Waktu (menit)	Siklus
Pre-denaturasi	94	7	1x
Denaturasi	94	0,10	45x
<i>Annealing</i>	55-60	0,30	
<i>Extention</i>	68	0,50	
<i>Final Extention</i>	72	5	1x
<i>Melting Curve</i>	95	30	

Ket: - menandakan bahwa Denaturasi, *Annealing* dan *Extention* satu kesatuan dengan 45 siklus

3.5 Analisis FTIR

Spektroskopi FTIR (*fourier transform infrared*) merupakan salah satu teknik analitik dalam proses identifikasi struktur molekul suatu senyawa. Komponen utama spektroskopi FTIR adalah interferometer michelson yang mempunyai fungsi menguraikan (mendispersi) radiasi infra merah menjadi komponen-komponen frekuensi (Kusumastuti, 2011). Cara kerja FTIR yaitu awalnya zat yang akan diukur diidentifikasi, berupa atom atau molekul. Sinar infra merah yang berperan sebagai sumber sinar dibagi menjadi dua berkas, satu dilewatkan melalui sampel dan yang lain melalui pembanding. Kemudian secara

berturut-turut melewati chopper. Setelah melalui prisma atau grating, berkas akan jatuh pada detector dan diubah menjadi sinyal listrik yang kemudian direkam oleh recorder (Sanjiwani & Sudiarsa, 2021). Pengujian analisis FTIR dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT), Universitas Lampung. Identifikasi dilakukan dengan cara mencampurkan 1 mg senyawa baku fukoidan dan ditambah 10 mg kalium bromide kemudian digerus didalam mortar dan ditekan hingga diperoleh pellet, dan dimasukkan ke dalam alat spektrofotometri FTIR, diukur serapannya pada frekuensi 4000-400 cm^{-1} (Ghosh & Galczynski, 2014).

3.6 Analisis Data

Data pengamatan uji koagulasi, uji aglutinasi, dan ekspresi gen yang diperoleh pada penelitian ini disajikan dalam bentuk tabel yang dianalisis secara deskriptif.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Ekstrak fukoidan dapat digunakan sebagai antikoagulan karena dapat mencegah penggumpalan pada hemolim lobster dengan dosis terbaik yang didapatkan adalah 2:3. Hemolim lobster dapat digunakan sebagai antibakteri penyebab penyakit ikan baik bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif karena dapat berinteraksi antara antigen dan antibodi. Dan gen β -Actin, LGBP, Lectin, dan GPO terbukti terekspresi dalam hemolim lobster pasir (*Panulirus homarus*).

5.2 Saran

Fukoidan dengan dosis 2:3 dapat diaplikasikan pada hemolim lobster untuk mencegah penggumpalan darah serta hemolim lobster dapat digunakan sebagai alternatif pengujian antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Adcock, D. M., Kressin, D. C., & Marlar, R. A. (1997). Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *American Journal of Clinical Pathology*, 107(1), 105-110.
<https://doi.org/10.1093/ajcp/107.1.105>
- Alfonso, L., Ai, G., Spitale, R. C., & Bhat GJ. (2014). Molecular targets of aspirin and cancer prevention. *British Journal of Cancer*, 111(1), 61–67.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2014.271>
- Amanu & Kurniasih. (2017). *Prinsip antigen, imunogen, dan reaksi imunologik dengan rapid test kit pada ikan*. Gadjah Mada University Press.
- Andriansyah, I., Wijaya, H. N. M., & Purwaniati, P. (2021). Analisis adulteran pada kopi luwak dengan metode Fourier Transform Infra Red (FTIR). *Jurnal Kimia Riset*, 6(1), 26-38. <https://doi.org/10.20473/jkr.v6i1.23397>
- Anggadiredja, J.T., Zatnika, A., Purwato, H., & Istini, S. (2008). *Rumput laut, pembudidayaan, pengolahan dan pemasaran komoditas perikanan potensial*. Penebar Swadaya.
- Ariki, S., Koori, K., Osaki, T., Motoyama, K., Inamori, K., & Kawabata, S. (2004). A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101(4), 953-958. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306904101>
- Baharawi, S., Lutfy, A., Rustam, E., Duranta, D., Kembaren., Fuad, H., Warsito., Siswanto., Jimmi., & Prabowo. (2015). *Seri panduan perikanan skala kecil perikanan lobster laut panduan penangkapan dan penanganan*. WWFIndonesia.
- Balai Budidaya Laut (BBL) Lombok. (2012). *Petunjuk teknis budidaya lobster (Panulirus spp)*. Kementrian Kelautan dan Perikanan. Lombok.
- Balakrishnan, A., Marathe, S. A., Joglekar, M., & Chakravorty, D. (2013). Bactericidal permeability increasing protein: A multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immunity*, 19(4), 339-347.
<https://doi.org/10.1177/1753425912465098>.

- Balboa, E. M., Rivas, S., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2013). Simultaneous extraction and depolymerization of fucoidan from *Sargassum muticum* in aqueous media. *Marine Drugs*, 11(11), 4612–4627. <https://doi.org/10.3390/md11114612>
- Beasley, M. M., Bartelink, E. J., Taylor, L., & Miller, R. M. (2014). Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone biapatite diagenesis. *Journal of Archaeological Science*, 46(1), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.02.003>
- Biris-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., & Farcas, A. C. (2020). Macroalgae a sustainable source of chemical compounds with biological activities. *Nutrients*, 12(10), 2085-3107. <https://doi.org/10.3390/nu12103085>
- Blankenhorn, S. U. (2007). *Seaweed farming and artisanal fisheries in an Indonesian seagrass bed-complementary or competitive usages*. Science for the Protection of Indonesian Coastal Ecosystems.
- Bo, L., Rui, X.Z., & Xin, J.W. (2008). Anticoagulant activity of fucoidan from *Hizikia fusiforme*. *Agro Food Industry Hi-tech*. 19, 22-24. https://www.researchgate.net/publication/281348947_Anticoagulant_activity_of_fucoidan_from_Hizikia_fusiforme
- Boney, A. D. (1965). Aspect of the biology of the seaweeds of economic importance. *Marine Biology*, 3(1), 205-253. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60397-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60397-1)
- Brkljaca, R., & Urban, S. (2014). Chemical profiling (HPLC-NMR & HPLC-MS), isolation, and identification of bioactive meroditerpenoids from the Southern Australian marine brown alga *Sargassum paradoxum*. *Marine Drugs*, 13(1), 102-127. <https://doi.org/10.3390/md13010102>
- Brown, B. A. 1984. *Hematology principles and procedures*. Lea & Febriges.
- Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (1998). *The Living Marine Resources of the Western Central Pacific*. In FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Castro, R. I. Zarrab, & Lamas, J. (2004). Watersoluble seaweed extracts modulate the pantoea agglomerans lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunology*, 10, 555-558.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B. L., Nonaka, M., & Söderhäll, K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 575-583. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.006>

- Chen, L., & Mozier, N. (2013). Comparison of *Limulus* amebocyte lysate test methods for endotoxin measurement in protein solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.011>
- Chevolot, L., Foucault, A., & Chauber, F. (1999). Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*, 319(1-4), 154-165. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00127-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00127-5)
- Damis, D., Asmidar, A., Rauf, A., & Saenong, M. (2021). Penentuan Kesesuaian Lokasi Budidaya Lobster Menggunakan Aplikasi SIG di Wilayah Pesisir Puntundo. *Jurnal Sains dan Teknologi Perikanan*. 1(1), 55-62. <https://doi.org/10.55678/jikan.v1i1.381>
- Dawes, C. (1981). *Marine Botany*. John Wiley & Sons, Inc.
- Dewi, L. (2016). In silico analysis of the potential of the active compounds fucoidan and alginate derived from *Sargassum* Sp. as inhibitors of COX-1 and COX2. *Medical Archives*, 70(3), 172-176. <https://doi.org/10.5455/medarh.2016.70.172-176>
- Ding, X., Su, W., & Ding, X. (2015). Methods of endotoxin detection. *Journal of Laboratory Automation*, 20(4), 354-364. <https://doi.org/10.1177/2211068215572136>
- Dousip, A., Matanjun, P., Sulaiman, M. R., Tan, T. S., Ooi, Y. B. H., & Lim, T. P. (2014). Effect of seaweed mixture intake on plasma lipid and antioxidant profile of hyperholesterolaemic rats. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 999-1008. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0128-y>
- Dovizio, M., Bruno, A., Tacconelli, S., & Patrignani, P. (2013). Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results in Cancer Research*, 191, 39-65. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30331-9_3
- Dullah, E. C., & Ongkudon, C. M. (2017). Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 251–261. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1141393>
- Farvin, K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1670-1681. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, M., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2017). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan

- Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 3707-3714. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>
- Ferraro, J. R. (2014). *Practical Fourier Transform Infra Red Spectroscopy: Industrial and Laboratory Chemical Analysis*. Saint Louis. Elsevier Science.
- Fitria, L., Illiy, L. L., & Dewi, I. R. (2017). Pengaruh Antikoagulan dan Waktu Penyimpanan Terhadap Profil Hematologis Tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) Galur Wistar. *Biosfera*, 33(1), 22. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2016.33.1.321>
- Fricker, G. (2007). *Endotoxins–Pyrogens, LAL testing and depyrogenation* (K. L. Williams, Ed.). Informa Healthcare.
- Funkhouser, D. (2011). Crab love nest. *Scientific American*, 304(4), 29. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0411-29>
- Fuster, V., & Sweeny, J. M. (2011). Aspirin: A historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation*, 123(7), 768-778. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963843>
- Gandasoebrata, R. (2008). *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat.
- Gandasoebrata, R. (2010). *Penuntun Laboratorium Klinik*. Dian Rakyat.
- Ghosh, R., & Galczynski, M. (2014). *Redefining Multicultural Education: Inclusion and The Right To Be Different* (3rd ed.). Canadian Scholar's Press.
- Girard, T. J., & Broze, G. J. (1993). Tissue factor pathway inhibitor. *Methods in Enzymology*, 222, 195-209. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)22014-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)22014-7)
- Gorr, T. A., & Vogel, J. (2015). Western blotting revisited: Critical perusal of underappreciated technical issues. *Proteomics Clinical Applications*, 9(3-4), 396-405. <https://doi.org/10.1002/prca.201400118>
- Guiry, M. D. (2007). Seasonal growth and phenotypic variation in *Poryphyra linearis* (Rhodophyta) populations on the west coast of Ireland. *Journal of Phycology*, 43(1), 90-100. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00300.x>
- Haryanti, Sembiring, S. B. M., Sudewi, Widiastuti, Z., Giri, N. A., & Sugama, K. (2017). Respons imunitas benih lobster, *Panulirus homarus* dengan penggunaan probiotik pada pakan moist. *Jurnal Riset Akuakultur*, 12(1), 85-97 hal. <https://doi.org/10.15578/jra.12.1.2017.85-97>

- Hellen, C., John, Q., & Alvis, B. (2003). *Microarray Gene Expression Data Analysis*. MPG Books Ltd.
- Heo, S. J., Ko, S. C., Kang, S. M., Kang, H. S., Kim, J. P., Kim, S. H., Lee, K. W., Cho, M. G., & Jeon, Y. J. (2008). Cytoprotective effect of fucoxanthin isolated from brown algae *Sargassum siliquastrum* against H₂O₂ -induced cell damage. *European Food Research and Technology*, 228(1), 145-151. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0918-7>
- Hou, L., Liu, X., Jing, Y., Zhang, J., Ding, Z., Huang, Y., Gu, W., Meng, Q., & Wang, W. (2015). Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein from red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*, 441, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.025>
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. (2008). ICCVAM Test Method Evaluation Report. *Validation status of five in vitro test methods proposed for assessing potential pyrogenicity of pharmaceuticals and other products* (NIH Publication No. 08-6392)
- Iwanaga, S. (1993). The limulus clotting reaction. *Current opinion in immunology*, 5(1), 74-82. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90084-6](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90084-6)
- Jones, C. M. (2009). Advances in the culture of lobsters. Dalam G. Burnell & G. L. Allan (Eds.), *New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environmental management* (hlm. 822-844). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845696474.5.822>
- Kamelia, M., Widiani, N., & Adistyningrum, N. (2018). Analisis perbedaan jumlah bakteri pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) budidaya. *Biospecies*, 11(2), 76-82. <https://doi.org/10.22437/biospecies.v11i2.5718>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2013). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. EGC.
- Kawabata, S., Koshiba, T., & Shibata, T. (2009). The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab. *Invertebrate Survival Journal*, 6(1), 59-77. <https://www.isj.unimore.it/index.php/ISJ/article/view/180/96>
- Keohane, E. M., Smith, L. J., & Walenga, J. M. (2015). *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. Elsevier/Saunders.
- Kim, J. A., Kong, C. S., Seo, Y. W., & Kim, S. K. (2010). *Sargassum thunbergii* extract inhibits MMP-2 and -9 expressions related with ROS scavenging in HT1080 cells. *Food Chemistry*, 120(1), 418-425. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.10.022>

- Kiswari & Rukman. (2014). *Hematologi dan Tranfusi*. Erlangga.
- Kusumastuti, A. (2011). Pengenaan pola gelombang khas dengan interpolasi. *Jurnal Cauchy*, 2(1), 7-12. <https://doi.org/10.18860/ca.v2i1.1803>.
- Li, F., & Xiang, J. (2013). Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1-2), 11-26. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.016>
- Li, Y., Fu, X., Duan, D., Liu, X., Xu, J., & Gao, X. (2017). Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine Drugs*, 15(2), 49-64 hal. <https://doi.org/10.3390/md15020049>
- Linse, S., Scheidt, T., Bernfur, K., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., Cohen, S. I. A., Sileikis, S., Lundqvist, M., Qian, F., O'Malley, T., Bussiere, T., Weinreb, P. H., Xu, C. K., Meisl, G., Devenish, S. R. A., Knowles, T. P. J., & Hansson, O. (2020). Kinetic fingerprints differentiate the mechanisms of action of anti- $A\beta$ antibodies. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), 1125-1133. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0505-6>.
- Loverock, B. (2010). Stimuli to the revision process: A recombinant factor c procedure for the detection of gram-negative bacterial endotoxin. *USP Pharmacopoeial Forum*, 36(1), 321-329. https://www.researchgate.net/publication/237287586_A_Recombinant_Factor_C_Procedure_for_the_Detection_of_Gram-negative_Bacterial_Endotoxina
- Martin, S. (2018). Spektroskopi fourier transform infra red metode reflektansi (Atr-FTIR) pada optimasi pengukuran spektrum vibrasi vitamin C. *Temapela*, 1(2), 39-43. <https://doi.org/10.25077/temapela.1.2.39-43.2018>
- Mariyani, Siswindari, & Rumiati. (2021). Validasi metode *real-time polymerase chain reaction* untuk deteksi DNA babi (*Sus scrofa domestica*) dan celeng (*Sus barbatus*) pada sosis sapi. *Jurnal Ilmiah Indonesia*, 6(8), 2940-3925. <https://doi.org/10.36418/syntax-literate.v6i8.3806>
- Maryani., Monalisa, S. S., & Panjaitan, R. S. (2020). Efektifitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *edwardsiella tarda* pada uji *in vitro*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 10(2): 198-208. <http://doi.org/10.33512/jpk.v10i2.9218>
- Matsuda, Y., Osaki, T., Hashii, T., Koshihara, T., & Kawabata, S. (2007). A cysteine-rich protein from an arthropod stabilizes clotting mesh and immobilizes bacteria at injury sites. *Jornal of Biological Chemistry*, 282(46), 33545-33552. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705854200>

- Mentari, I. N., Ariza, D., & Halid, I. (2020). Pemanfaatan ekstrak daun seledri (*Apium graveolens*) sebagai antikoagulan pengganti EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*) pada pemeriksaan jumlah trombosit. *Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmiah Kesehatan*, 6(2), 192-198. <https://jurnal.poltekrmfh.ac.id/index.php/JPKIK/citationstylelanguage/get/turabian-fullnote-bibliography?submissionId=146&publicationId=142>
- Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13763-13781. <https://doi.org/10.3390/ijms140713763>
- Mojjada, S. K., Joseph, I., Koya, K. M., Sreenath, K. R., Dash, G., Sen, S., Mahendra, Fofandi, D., Anbarasu, M., Bhint, H. M., Pradeep, S., Shiju, P., & Rao, G. S. (2012). Capture Based Aquaculture of Mud Spiny Lobster, *Panulirus polyphagus* (Herbst, 1793) in Open Sea Floating Net Cages of Veraval, North-West Coast of India. *Indian Journal of Fisheries*, 59(4), 29-34. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=5d393ab4a55fc0cbead157203ce7c4fc399f83cc>
- Moosa, M. K., & Aswandy, I. 1984. *Udang Karang (Panulirus spp.) dari Perairan Indonesia*. Lembaga Oseanologi Nasional.
- Morales, R. P., Alejo, V. M., Viera, L. R., & Perera, E. (2020). Evaluation of anticoagulants and hemocyte-maintaining solutions for the study of hemolymph components in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae). *Journal of Crustacean Biology*, 40(2), 213-217. <https://doi.org/10.1093/jcobiol/ruz099>.
- Munne-bosch, S. (2012). *Phenolic acids: Composition, applications and health benefits*. Nova Science Publishers.
- Nugraha, G. (2015). *Panduan Pemeriksaan Laboratorium Hematologi Dasar*. Trans Info Media.
- Nurhayati, E., Sukma, S. A., & Wahdaniah. (2021). Pengaruh ekstrak kulit jeruk bali (*Cirus maxime Merr.*) sebagai antikoagulan dengan metode clotting time (lee and white). *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*, 5(1), 29-33. <https://doi.org/10.30602/jlk.v5i1.951>
- Nurhidayati, S., Faturrahman, & Ghazali, M. (2015). Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, 1(2), 24-30. <https://doi.org/10.29303/jstl.v1i2.53>
- Ongkudon, C. M., Chew, J. H., Liu, B., & Danquah, M. K. (2012). Chromatographic removal of endotoxins: a bioprocess engineer's

perspective. *ISRN Chromatography*, 2012(1), 1-9.
<https://doi.org/10.5402/2012/649746>

- Orbaniyah, S., Hari, W., Adam, H., Sismindari, S., & Abdul, R. (2019). Application of real-time polymerase chain reaction using species primer targeting on mitochondrial cytochrome-b gene for analysis of pork in meatball products. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(2), 260-265. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f342>
- Ørving, R. B., Carpenter, B., Roth, S., Reich, J., Kallipolitis, B. H., & Hansen, J. S. (2020). Bacterial endotoxin testing fast endotoxin masking kinetics in the presence of lauryldimethylamine oxide. *Microorganism*, 8(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111728>
- Paikin, J. S., & Eikelboom, J. W. (2012). Aspirin. *Circulation*, 125(10), 439-442 hal. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.046243>
- Pakidi, C. S., & Suwoyo, H. S. (2017). Potensi dan pemanfaatan bahan aktif alga coklat *Sargassum* sp. *Octopus*, 6(1), 551-562. <https://doi.org/10.26618/octopus.v6i1.708>
- Park, C. Y., Jung, S. H., Bak, J. P., Lee, S. S., & Rhee, D. K. (2005). Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 33(3), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.04.002>
- Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F., & Wang, J. H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, 9, 1806-1828. <https://doi.org/10.3390/md9101806>
- Pertiwi, N. P. D., Mahardika, I. G. N. K., & Watiniasih, N. L. (2015). Optimasi amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada ikan karang anggota famili Pseudochromidae (Dottyback) untuk identifikasi spesies secara molekular. *Jurnal Biologi*, 19(2), 53-57. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27883.34083>
- Poole, S., & Gaines, D. R. E. (2001). Towards a human pyrogen test. *European Journal of Parenter and Pharmaceutical Sciences*, 6, 63-64.
- Prabu, D. L., Sahu, N. P., Pal, A. K., & Narendra, A. (2013). Isolation and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fucoidan rich extract from Indian brown seaweed, (*Sargassum wightii*). *Continental Journal Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 9-16. <https://doi.org/10.5707/cjpharmsci.2013.7.1.9.16>

- Pramudita, Sarjito, Prayitno, S. B. (2013). Identifikasi bakteri agensia penyebab *Motile Aeromonas* pada ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari Kecamatan Rowosari, Kabupaten Kendal. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2(2), 1-9. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jfpik>
- Pratini, N. P. W. A. P., Jiwantoro, Y. A., & Khusuma, A. (2019). Perbedaan Kadar Kolesterol Total Menggunakan Antikoagulan EDTA ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), Natrium Sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), dan Natrium Oksalat ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$). *Jurnal Analis Medika Biosains (JAMBS)*, 6(2), 130-134. <https://doi.org/10.32807/jambs.v6i2.146>
- Pratiwi, R. (2018). Keanekaragaman dan Potensi Lobster (*Malacostraca: Palinuridae*) di Pantai Pameungpeuk, Garut Selatan, Jawa Barat. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA. A Scientific Journal*, 35(1), 10-22. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2018.35.1.524>
- Priyana, A. (2021). Perdarahan iliopsoas pada pasien covid-19 dalam terapi antikoagulan. *Ebers Papyrus*, 27(1), 116-123. <http://repository.untar.ac.id/id/eprint/36819>
- Putra, A. P. A., Aristoteles, & Diantari, R. (2016). Sistem pakar diagnose penyakit pada ikan budidaya air tawar dengan metode forward chaining berbasis android. *Jurnal Komputasi*, 4(1), 92-98. <http://digilib.unila.ac.id/id/eprint/22243>
- Rahardianti, R., & Nur, E. M. (2017). *Akurasi Metode Real PCR Untuk Analisis Ekspresi Gen PmVRP15. Prosiding Pertemuan Teknis Teknisi Litkayasa Lingkup BBPBAP Jepara*. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. 166 hal.
- Rahmania, Y. L., Widayat, Agustini, T. W., Suzery, M., & Albaari, A. N. (2021). Pengukuran kandungan DNA babi dalam berbagai produk pangan dengan metode real time polymerase chain reaction (RT-PCR). *Indonesia Journal of Halal*, 3(2), 129-133. <https://doi.org/10.14710/halal.v3i2.10276>
- Rahyuni. (2018). *Identifikasi fucoidan dalam alga coklat (Sargassum polycystum) sebagai pangan fungsional dalam mendukung ketahanan pangan indonesia*. Pusat Analisis Regional (Pusar) Indonesia.
- Rao, S. N., Manissero, D., Steele, V. R., & Pareja, J. (2020). A systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of covid-19. *Infectious Diseases Therapy*, 9(3), 573-596. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00324-3>
- Rini, C. S., & Rohmah, J. (2020). *Buku ajar bakteriologi dasar*. Umsida Press.

- Rochmah, S. (2017). Perbedaan waktu pembekuan darah kapiler dan vena pada ibu hamil trimester III. *Jurnal Nasional Ilmu Kesehatan*, 6(1), 2-9. <http://repository.unimus.ac.id/id/eprint/1925>
- Rosidah, & Wibowo, C. (2018). Perbedaan antara pemeriksaan antikoagulan EDTA dan heparin terhadap nilai hematokrit (Hct). *Jurnal Sains*, 16, 16-21. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID: 155169855>
- Rustikawati, I. (2012). Efektivitas ekstrak *Sargassum* sp. Terhadap diferensiasi leukosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi *Streptococcus iniae*. *Jurnal Akuatika*, 3(2), 125-134. <https://jurnal.unpad.ac.id/akuatika/article/view/1609>
- Sacher, R. A., & McPherson, R. A. (2000). Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests. *Philadelphia*. Davis Company.
- Sadikin, M. (2002). *Biokimia Darah*. Widya Medika. Jakarta.
- Sanjiwani, N. M. S., & Sudiarsa, I. W. (2021). Sosialisasi pemanfaatan herbal drink daun salam sebagai pengobatan tradisional. *Jurnal Widyadari*, 22(2), 685-693. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5576068>.
- Satyarsa, A. B. S. (2019). Potential of Fucoidan From Brown Seaweeds (*Sargassum* sp.) as Innovation Therapy on Breast Cancer. *Journal of Medicine & Health*, 2(3), 909-919. <https://doi.org/10.28932/jmh.v2i3.1235>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Setyanto, A., Rachman, N.A., & Yulianto. E.S. (2018). Distribusi dan komposisi spesies lobster yang tertangkap di perairan laut Jawa Timur, Indonesia. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada*, 20(2), 49-55. <https://doi.org/10.22146/jfs/.36151>
- Skinner, M., & Hunter, D. (2013). *Bioactives in fruit: Health benefits and functional foods*. Wiley-Blackwell.
- Stokol, T., Priest, H., Behling-Kelly, E. & Babcock, G. (2014). *Samples for Hematology, Animal Healths Diagnostic Center*. Clinical Pathology Laboratory College of Veterinary Medicine Cornell University, Ithaca.
- Subiyono, S., Martsiningsih MA., & Gabrela D. (2016). Gambaran kadar glukosa darah metode GOD-PAP (Glucose Oksidase– Peroxidase Aminoantipirin) sampel serum dan plasma EDTA (*Ethylen Diamin Terta Acetat*). *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 5(1), 45-8. <http://www.teknolabjournal.com/index.php/Jtl/index>

- Sudewi, Widiastuti, Z., Slamet, B., & Mahardika, K. (2018). Investigasi penyakit pada pembesaran lobster pasir. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, 10(1), 111-122. <http://doi.org/10.29244/jitkt.v10i1.18976>
- Sukamto, Muryanto, T., & Kuslani, H. (2017). Teknik identifikasi jenis kelamin lobster berbasis ciri-ciri morfologi. *Buletin Teknik Litkayasa*, 15(2), 99-102. <https://doi.org/10.15578/btl.15.2.2017.99-102>
- Takaki, Y., Seki, N., Kawabata, S., Iwanaga, S., & Muta, T. (2002). Duplicated binding sites for (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan in the horseshoe crab coagulation factor G: implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 14281-14287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200177200>
- Theakstone, A. G., Rinaldi, C., Butler, H. J., Cameron, J. M., Confield, L. R., Rutherford, S. H., Sala, A., Sangamnerkar, S., & Baker, M. J. (2021). Fourier Transform Infra Red Spectroscopy of Biofluids: A Practical Approach. *Translational Biophotonics*, 3(2), 20. <https://doi.org/10.1002/tbio.202000025>
- Tizard, I. (2004). *Immunology an Introduction*. Sevent Edition. Saunders Publiser.
- Umar, I., & Sujud, R. W. (2020). Hemostatis dan disseminated intravascular coagulation (DIC). *Journal of Anasthesia and Pain*, 1(2), 19-32. <https://doi.org/10.21776/ub.jap.2020.001.02.04>
- Usov, A. I., Smimova, G. P., Kamenarska, Z., Dimitrova-Konaklieva, S., Stefanov, K. L., & 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. <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000023102.04368.3d>
- Usov, A.I. & Bilan, M.I. (2009). Fucoidan sulfated polysaccharides of brown algae. *Russian Chemical Reviews*, 78(8), 785-799. [10.1070/RC2009v078n08ABEH004063](https://doi.org/10.1070/RC2009v078n08ABEH004063)
- Verghese, B., Radhakrishnan, E. V., & Padhi, A. (2007). Effect of Environmental Parameters on Immune Response of the Indian Spiny Lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish & Shellfish Immunology*, 23(5), 928-936 hal. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.01.021>.
- Wandira, A., Ramli, & Halili, M., (2020). Jenis dan Kelimpahan Benih Lobster (*Panulirus* spp.) Berdasarkan Kedalaman di Perairan Desa Ranooha Raya, Kecamatan Moramo, Kabupaten Konawe Selatan. *Sapa Laut*, 5(2), 163-172. <http://ojs.uho.ac.id/index.php/jsl>

- Wang, C. Y., Wu, T. C., Hsieh, S. L., Tsai, Y. H., Yeh, C. W., & Huang, C. Y. (2015). Antioxidant activity and growth inhibition of human colon cancer cells by crude and purified fucoidan preparations extracted from *Sargassum cristaeifolium*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23, 766-777. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.07.002>
- Wang, Y., Wang, B.J., Liu, M., Jiang, K.Y., Wang, M.Q., & Wang, L. (2020). The first identification of a C-type lectin gene (CqCTL) in *Cherax quadricarinatus*: sequence features and expression profiles. *Invertebrate Survival Jurnal*, 17(1), 108-116. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v0i0.108-116>
- Wirawan, R., & Silman, E. (2000). *Pemeriksaan Laboratorium hematologi sederhana 2 nded*. Balai Penerbit FKUI.
- Yayungsih, Dewi, Prayitno, H., & Mazidah, R. (2018). *Hematologi*. Edisi Pertama. EGC. Jakarta.
- Yusnaini, M. N., Nessa, M. I., Djawad, & Trijuno, D. D. (2013). Morfologi dan morfometrik perkembangan awal filosoma lobster mutiara (*Panulirus ornatus*). *Jurnal Aqua Hayati*, 9(1), 71-76. <https://www.neliti.com/id/publications/217729/morfologi-dan-morfometrik-perkembangan-awal-filosoma-lobster-mutiara-panulirus-o>
- Ye, H., Zhou, C., Sun, Y., Zhang, X., Liu, J., Hu, Q., & Zeng, X. (2009). Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. *European Food Research and Technology*, 230, 101-109 hal. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1147-4>.