

**OPTIMASI ANTIKOAGULAN, EKSPRESI GEN SISTEM IMUN DAN UJI
AGLUTINASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*)
BUDI DAYA UNTUK DETEKSI BAKTERI PATOGEN IKAN**

SKRIPSI

Oleh

**SYIFA ATHAYA SHAFIRA
NPM 2014111044**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

**OPTIMASI ANTIKOAGULAN, EKSPRESI GEN SISTEM IMUN DAN UJI
AGLUTINASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*)
BUDI DAYA UNTUK DETEKSI BAKTERI PATOGEN IKAN**

Oleh

SYIFA ATHAYA SHAFIRA

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

OPTIMASI ANTIKOAGULAN, EKSPRESI GEN SISTEM IMUN DAN UJI AGLUTINASI HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus homarus*) BUDI DAYA UNTUK DETEKSI BAKTERI PATOGEN IKAN

Oleh

SYIFA ATHAYA SHAFIRA

Hemolim lobster pasir (*Panulirus homarus*) budi daya diduga memiliki kesamaan fungsi dengan kepiting tapal kuda (*Tachypleus gigas*) yang digunakan untuk mendeteksi bakteri patogen melalui proses aglutinasi (pembekuan). Hemolim dapat diawetkan dengan menggunakan antikoagulan yang perlu diuji ketahanannya selama penyimpanan. Ekspresi gen imun tubuh pada hemolim dan kemampuan aglutinasi hemolim terawetkan untuk deteksi bakteri patogen ikan juga perlu dilakukan. Tujuan penelitian dilakukan untuk mengoptimasi antikoagulan terbaik pada penyimpanan hemolim, mengukur ekspresi gen imun dalam hemolim dan menguji kemampuan aglutinasi hemolim pada bakteri patogen ikan. Optimasi antikoagulan dilakukan dengan menggunakan lima jenis antikoagulan yaitu aspirin, EDTA, natrium sitrat, heparin dan alginat. Empat gen imun yang di-ukur antara lain GPO, lectin, LGBP dan β -actin. Pengujian kemampuan aglutinasi hemolim dilakukan dengan menggunakan *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* dan *Aeromonas hydrophyla*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lima jenis antikoagulan dapat mengawetkan hemolim lobster pasir budi daya lebih dari 24 jam penyimpanan. Ekspresi empat gen imun menunjukkan determinasi gen imun yang positif dengan variasi nilai *cycle threshold value*. Kemampuan aglutinasi hemolim yang disimpan menunjukkan reaksi positif pada pengenceran bertingkat (2^0 - 2^{11}) dilanjutkan dengan reaksi positif pembekuan hemolim yang disimpan pada lima jenis antikoagulan dengan tujuh spesies bakteri patogen pada ikan. Antikoagulan natrium sitrat dan heparin menunjukkan reaksi yang samar untuk *V.harveyi* dan *Salmonella*.

Kata kunci: Aglutinasi, Antikoagulan, Ekspresi Gen, Hemolim, Lobster Pasir
Budi Daya

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ANTICOAGULANTS, IMMUNE SYSTEM GENES EXPRESSION AND AGGLUTINATION ASSAY OF HAEMOLIMPH OF CULTURED SCALLOPED SPINY LOBSTER (*Panulirus homarus*) FOR FISH PATHOGENIC BACTERIA DETECTION

By

SYIFA ATHAYA SHAFIRA

The hemolymph of cultured scalloped spiny lobster (*Panulirus homarus*) is showed to have similar functions to horseshoe crabs (*Tachypleus gigas*) which are used to detect pathogenic bacteria through the agglutination process (freeze blood). Hemolymph can be preserved using anticoagulants whose resistance needs to be tested during storage. The expression of immune genes in hemolymph and the agglutination ability of preserved hemolymph for the detection of fish pathogenic bacteria also need to be carried out. The purpose of this study was to optimize the best anticoagulant for hemolymph storage, measure the expression of immune genes in hemolymph and test the agglutination ability of hemolymph on fish pathogenic bacteria. Anticoagulant optimization was carried out using five types of anticoagulants, namely aspirin, EDTA, sodium citrate, heparin and alginate. The four immune genes measured were GPO, lectin, LGBP and β -actin. Hemolymph agglutination ability testing was carried out using *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Aeromonas hydrophyla*. The results showed that five types of anticoagulants could preserve the hemolymph of farmed scalloped spiny lobster for more than 24 hours of storage. The expression of four immune genes showed positive immune gene determination with variations in cycle threshold value. The agglutination ability of the stored hemolymph showed a positive reaction in multilevel dilutions (2^0 - 2^{11}) followed by a positive reaction of hemolymph coagulation stored in five types of anticoagulants with seven species of pathogenic bacteria in fish. Sodium citrate and heparin anticoagulants showed a faint reaction for *V. harveyi* and *Salmonella*.

Keywords: Agglutination, Anticoagulant, Cultured Scalloped Spiny Lobster, Gene Expression, Hemolymph.

Judul Skripsi

: OPTIMASI ANTIKOAGULAN, EKSPRESI
GEN SISTEM IMUN DAN UJI AGLUTINASI
HEMOLIM LOBSTER PASIR (*Panulirus
homarus*) BUDI DAYA UNTUK DETEKSI
BAKTERI PATOGEN IKAN

Nama Mahasiswa

: Syifa Athaya Shafira

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2014111044

Program Studi

: Budidaya Perairan

Fakultas

: Pertanian



1. Komisi Pembimbing

Dr. Yudha Trinoegraha A., S.Pi., M.Si.
NIP. 19780708 200112 1 001

Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si.
NIP. 19900128 201903 2 018

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

Munti Sarida, S.Pi., M.Sc., Ph.D.
NIP. 19830923 200604 2 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Yudha Trinoegraha A., S.Pi., M.Si.

Sekretaris : Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si.

Penguji Bukan Pembimbing: Dr. Agus Setyawan S.Pi., M.P.

2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.

NIP. 196411181989021002

Tanggal lulus ujian skripsi : 20 Januari 2025

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 14 Juli 2002 di Bandar Lampung, Provinsi Lampung, anak ketiga dari 4 bersaudara. Penulis menempuh pendidikan formal di TK Pertiwi Bandar Lampung pada tahun 2006-2008, kemudian melanjutkan pendidikan dasar di SDN 2 Palapa Bandar Lampung pada tahun 2008-2014, kemudian melanjutkan pendidikan di SMPN 12 Bandar Lampung pada tahun 2014-2017, selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di SMAN 1 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 SBMPTN pada tahun 2020. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum pada mata kuliah Kimia Dasar pada tahun 2022 dan Manajemen Kesehatan Ikan tahun 2023, penulis juga aktif dalam organisasi Himpunan Mahasiswa Perikanan dan Kelautan (Himapik) menjadi anggota Bidang Komunikasi dan Informasi pada tahun 2022 dan Sekretaris Bidang Komunikasi dan Informasi pada tahun 2023.

Penulis pernah melakukan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Januari-Februari tahun 2023 di Desa Tapak Siring Kecamatan Sukau, Kabupaten Lampung barat. Pada Juni-Juli 2023, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau, Jepara, Jawa Tengah dengan judul “Pengukuran Parameter Kimia (Nitrit, Fosfat, Alkalinitas dan Amonia)

Menggunakan UV Spektrofotometer pada Kolam Pembenihan Ikan Nila Salin di Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa tengah”.

Pada Bulan Januari - Agustus 2024 penulis melaksanakan penelitian di Laboratorium dengan judul “Optimasi Antikoagulan, Ekspresi Gen Sistem Imun dan Uji Aglutinasi Hemolim Lobster Pasir (*Panulirus homarus*) Budi Daya Untuk Deteksi Bakteri Patogen Ikan”.

Untuk keluarga besar Herman Sanusi yang senantiasa mendukung membantu dan mendoakan yang terbaik.

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 “*Optimasi Antikoagulan, Ekspresi Gen Sistem Imun dan Uji Aglutinasi Hemolim Lobster Pasir (Panulirus homarus) Budi Daya untuk Deteksi Bakteri Patogen 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;
3. Dr. Agus Setyawan, S.Pi., M.P. selaku Koordinator Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Pembimbing Akademik, dan Penguji Utama;
4. Dr. Yudha Trinoegraha A, S.Pi., M.Si. selaku Pembimbing Utama;
5. Hilma Putri Fidyandini, S.Pi., M.Si. selaku Pembimbing Kedua;
6. Ibu Ida Sari Yorita dan Bapak Edi Effendi.

Bandar Lampung, Januari 2025
Penulis,

Syifa Athaya Shafira

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	2
1.4 Kerangka Pikir.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kepiting Tapal Kuda	5
2.2 Klasifikasi dan Morfologi Lobster Pasir (<i>Panulirus homarus</i>).....	6
2.3 Klasifikasi dan Morfologi <i>Sargassum</i> sp.	8
2.4 Habitat dan Penyebaran <i>Sargassum</i> sp.....	9
2.5 Kandungan Kimia Alga Cokelat	9
2.6 Natrium Alginat.....	10
2.7 <i>Ethylene Diamine Tetra Acetate</i> (EDTA)	11
2.8 Natrium Sitrat	11
2.9 Heparin	12
2.10 Aspirin.....	13
2.11 Koagulasi Darah dan Mekanisme Pembekuan Darah	13
2.12. Antikoagulasi.....	14
III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Waktu dan Tempat	16
3.1.1 Waktu Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.3 Rancangan Penelitian	19
3.4 Prosedur Penelitian.....	19
3.4.1 Pembuatan Ekstrak.....	19
3.4.2 Persiapan Wadah Pemeliharaan	20
3.4.3 Persiapan hewan uji.....	20
3.4.4 Pengambilan Sampel Hemolim	20
3.4.5 Sterilisasi Alat dan Bahan	20
3.4.6. Pembuatan Media	21
3.4.6.1 Media TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>)	21

3.4.6.2 Media TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>).....	21
3.4.7 Penanaman Bakteri.....	21
3.4.7.1 Penanaman Bakteri pada Media TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>).....	21
3.4.7.2 Penanaman Bakteri pada Media TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>).....	22
3.4.8 Pengamatan	22
3.4.8.1 Metode <i>Lee-White</i>	22
3.4.8.2 Aglutinasi	22
3.4.8.3 Ekspresi Gen.....	23
3.5 Analisis data	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Hasil.....	26
4.1.1 Optimasi Antikoagulan	26
4.1.2 Ekspresi Gen	27
4.1.3 Hasil Aglutinasi.....	27
4.2 Pembahasan	29
4.2.1 Optimasi Antikoagulan	29
4.2.2 Ekspresi Gen	30
4.2.3 Uji Aglutinasi	31
V. SIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Simpulan.....	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA.....	35
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat yang digunakan pada pelaksanaan penelitian.....	16
2. Bahan yang digunakan pada pelaksanaan penelitian	18
3. Primer gen imun lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>).....	23
4. Komposisi bahan untuk isolasi RNA	24
5. Komposisi bahan untuk sintesis cDNA.....	24
6. Bahan <i>Real Time Quantitative</i> PCR (qPCR).....	25
7. Kondisi <i>Real Time Quantitative</i> PCR (qPCR)	25
8. Optimasi jenis antikoagulan dan dosis yang berbeda pada lama penyimpanan hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>) budi daya.....	26
9. Ekspresi gen-gen target dari hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>) budi daya.	27
10. Uji aglutinasi dari hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>) budi daya.	27
11. Uji aglutinasi hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>) yang ditambahkan antikoagulan	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka penelitian.....	4
2. Kepiting tapal kuda (<i>horseshoe crab</i>)	6
3. Lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>).....	7
4. Hasil uji aglutinasi hemolim lobster (A) Positif, (B) Negatif dan (C) Samar..	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Nilai C_T ekspresi gen hemolim lobster pasir (<i>Panulirus homarus</i>)	42
2. Uji FTIR Alginat	42

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Negara Indonesia memiliki wilayah perairan yang luas yaitu mencapai 70% sehingga berdampak positif pada keanekaragaman hewan air yang sangat melimpah, salah satunya adalah keberadaan kepiting tapal kuda (*Horseshoe Crab*) atau bisa disebut dengan mimi, belangkas, kepiting ladam, mintuna, dan kepiting bulan. Kepiting tapal kuda memiliki nama latin *Tachypleus gigas* (Anggraini et al., 2017). Salah satu keunikan yang dimiliki kepiting tapal kuda ini adalah darah yang berada di dalam tubuhnya tidak mengandung hemoglobin melainkan mengandung hemocyanin. Kandungan ini berfungsi untuk mengangkut oksigen dan mengandung unsur tembaga yang mengakibatkan warna darah kepiting tapal kuda menjadi biru. Darah kepiting tapal kuda juga mengandung unsur amebosit yang berfungsi sebagai pertahanan organisme untuk melawan patogen (Funkhouser, 2011). *Limulus polyphemus* memiliki ekstrak darah *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL), *Tachypleus* sp. menghasilkan *Tachypleusin Amoebocyt Lysate* (TAL) dan *Carcinoscorpius rotundicaudatus* menghasilkan *Carcinoscorpius Amoebocyt Lysate* (CAL), hal tersebut dapat mendeteksi endotoksin bakteri Gram negatif, endotoksin darah manusia, dan patogen pada produk obat-obatan (Funkhouser, 2011).

Kepiting tapal kuda atau belangkas termasuk hewan laut yang sudah jarang ditemui dan termasuk hewan yang dilindungi sesuai dengan SK Menteri Kehutanan No. 12/Kpts-II/1987 dan Peraturan Pemerintah RI No. 7/1999 (Rubiyanto, 2012). Oleh karena itu eksploitasi terhadap kepiting tapal kuda sudah tidak dapat dilakukan dan diperlukan adanya alternatif lain. Salah satu alternatif yang dapat digunakan untuk mendeteksi endotoksin bakteri adalah hemolim lobster. Hemolim lobster diduga dapat digunakan sebagai detektor endotoksin bakteri penyebab penyakit pada ikan. Hemolim lobster pasir memiliki kesamaan yaitu

memiliki hemolimfa yang sensitif terhadap lipopolisakarida (LPS) yang terdapat di membran luar bakteri Gram negatif sehingga dapat digunakan sebagai pendeteksi bakteri. Menurut Shun-Feng et al (2018), menunjukkan hemosit krustasea termasuk dari lobster pasir berpotensi digunakan untuk fungsi pengobatan khususnya untuk penapisan endotoksin mikroba.

Lobster pasir memiliki fungsi bermanfaat lainnya yang ada untuk pengobatan (Ueda et al., 1994). Meskipun demikian, salah satu kendala yang dihadapi adalah kecenderungan cepatnya terjadi koagulasi (pembekuan) pada hemolim lobster. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menemukan antikoagulan yang efektif dalam menghambat koagulasi hemolim lobster.

Ada beberapa jenis antikoagulan komersil yang telah umum digunakan pada Masyarakat yaitu Heparin, EDTA (*Ethylene diamine tetra acetate*), Aspirin dan Na Sitrat namun terdapat beberapa efek samping dan juga sulitnya mendapatkan antikoagulan-antikoagulan tersebut di pasaran sehingga diperlukannya mencari alternatif lain untuk menggantikan antikoagulan yang lebih mudah didapat dan alami dalam hal ini yaitu alginat karena struktur alginat mirip dengan heparin yang telah umum digunakan untuk terapi antikoagulan selama beberapa dekade (Alban & Franz, 2000). Alasan-alasan ini yang mendasari diperlukannya penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi optimasi jenis dan dosis antikoagulan hemolim lobster pasir (*Panulirus homarus*) budi daya untuk deteksi bakteri patogen ikan dan ekspresi gen.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi optimasi antikoagulan, ekspresi gen sistem imun dan uji aglutinasi hemolim lobster pasir budi daya untuk deteksi bakteri patogen ikan.

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah bagi

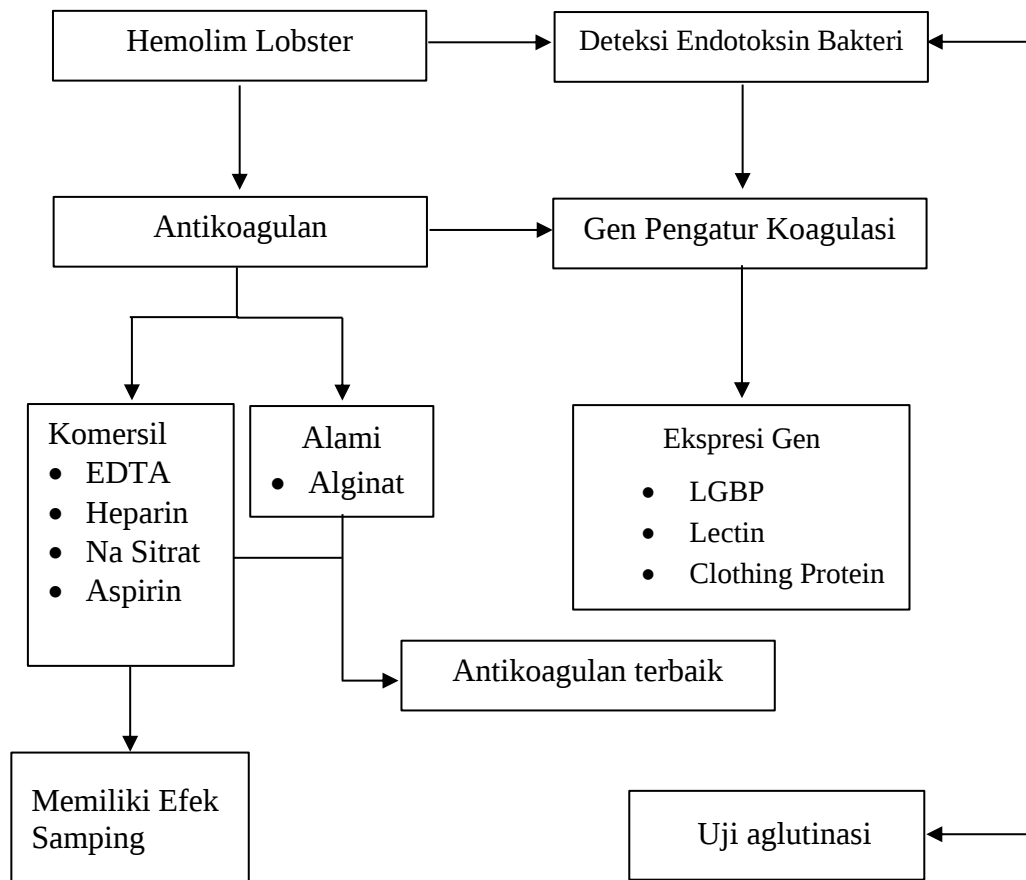
mahasiswa, pembudidaya dan masyarakat mengenai optimasi antikoagulan, ekspresi gen sistem imun dan uji aglutinasi hemolim lobster pasir budi daya untuk deteksi bakteri patogen ikan.

1.4 Kerangka Pikir

Lobster pasir memiliki fungsi bermanfaat lainnya yang ada untuk pengobatan (Ueda et al., 1994) lobster juga bisa digunakan sebagai detektor endotoksin bakteri penyebab penyakit pada ikan. Hemolim lobster pasir memiliki kesamaan yaitu memiliki hemolimfa yang sensitif terhadap lipopolisakarida (LPS) yang terdapat di membran luar bakteri Gram negatif sehingga dapat digunakan sebagai pendeteksi bakteri. Menurut Shun-Feng et al (2018), menunjukkan hemosit krus-tasea termasuk dari lobster pasir berpotensi digunakan untuk fungsi pengobatan khususnya untuk penapisan endotoksin mikroba. Meskipun demikian, salah satu kendala yang dihadapi adalah kecenderungan cepatnya terjadi koagulasi (pembekuan) hemolim pada lobster. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menemukan antikoagulan yang efektif dalam menghambat koagulasi hemolim lobster.

Terdapat banyak jenis antikoagulan yang terdapat dipasaran antara lain: EDTA (*Ethylene diamine tetra acetate*), Heparin, Na Sitrat dan aspirin yang bisa dipakai untuk menghambat terjadinya koagulasi pada hemolim lobster. Namun, terdapat juga efek samping dan kendala untuk mendapatkannya dikarenakan termasuk dalam kategori obat bebas terbatas sehingga diperlukannya mencari alternatif lain untuk menggantikan antikoagulan yang lebih mudah didapat dan alami dalam hal ini adalah alginat dikarenakan struktur alginat mirip dengan heparin yang telah umum digunakan untuk terapi antikoagulan selama beberapa dekade.

Kerangka pikir penelitian disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

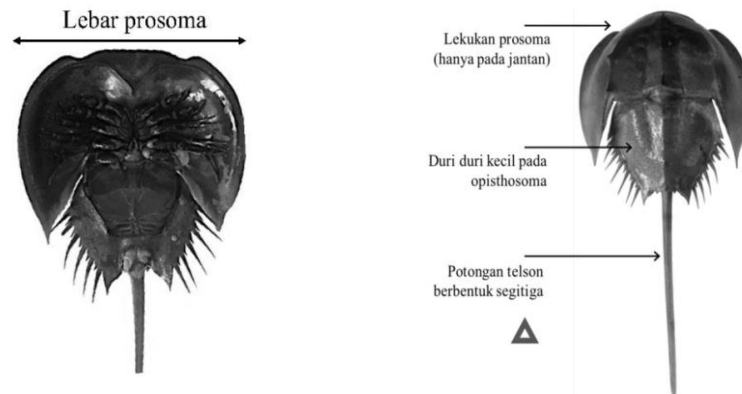
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kepiting Tapal Kuda

Kepiting tapal kuda merupakan *arthropoda* menyerupai krustasea, tetapi karena sangat berbeda dengan krustasea ia dikelompokkan ke dalam subphylum *Chelicerata*. Secara taksonomis hewan ini termasuk Filum *Arthropoda* karena memiliki ruas pada tubuhnya, Kelas *Merostomata* karena memiliki mulut pada ujung proksimal dan kaki renang pada ujung distal dan tubuh terbagi atas *prosoma* dan *ophistosoma*, Ordo *Xiphosura* yang berarti memiliki ekor seperti pedang. Kepiting tapal kuda termasuk ke dalam Famili *Limulidae* yang hanya terdiri dari 3 genus yaitu *Limulus*, *Carcinoscorpius*, dan *Tachypleus* (Hickman, 2008). Kepiting tapal kuda dapat ditemukan di area estuari dan pantai selama musim *spawning season*, kepiting tapal kuda juga menetap di laut dalam secara pasif dengan mengubur diri dengan pasir selama monsoon (*non-spawning season*) (Nugroho et al., 2018).

Kepiting tapal kuda memiliki peran penting secara ekologi dan ekonomi. Secara ekologi kepiting tapal kuda berperan sebagai bioturbator dan mengendalikankan hewan benthik. Kepiting tapal kuda juga memiliki peran sebagai penyeimbang rantai makanan dan sebagai sumber protein bagi beberapa spesies burung pantai (Beekey et al., 2013). Secara ekonomi, darah kepiting tapal kuda bermanfaat dalam bidang farmasi. Salah satu keunikan yang dimiliki kepiting tapal kuda ini yaitu darah yang berada di dalam tubuh tidak mengandung hemoglobin melainkan mengandung hemocyanin. Kandungan ini berfungsi untuk mengangkut oksigen dan mengandung unsur tembaga yang mengakibatkan warna darah kepiting tapal kuda menjadi biru. Darah kepiting tapal kuda juga mengandung unsur amebosit yang berfungsi sebagai pertahanan organisme untuk melawan patogen. (Funkhouser, 2011). Menurut Suci et al (2020) darah kepiting

tapal kuda yang berwarna biru ini mengandung amebosit yang dapat digunakan sebagai bahan untuk melakukan uji terkait keberadaan bakteri endotoksin.



Gambar 2. Kepiting Tapal Kuda
(Sumber: Erwyansyah et al., 2018)

2.2 Klasifikasi dan Morfologi Lobster Pasir (*Panulirus homarus*)

Adapun klasifikasi lobster pasir menurut Chan (1986) dalam Carpenter & Niem (1998)

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Sub Filum	: Crustacea
Kelas	: Malacostraca
Ordo	: Decapoda
Famili	: panuliridae
Genus	: <i>Panulirus</i>
Spesies	: <i>Panulirus homarus</i>



Gambar 3. Lobster Pasir (*Panulirus homarus*)

Lobster pasir masuk ke dalam famili Palinuridae. Tubuh lobster secara morfologi terdiri dari dua bagian, yaitu bagian depan atau *cephalothoraxs* (kepala menyatu dengan dada) dan bagian belakang yang disebut abdomen (perut). Tubuh lobster seluruhnya terdiri dari ruas-ruas yang tertutup oleh kerangka luar yang keras, bagian kepala terdiri dari 13 ruas dan bagian dada terdiri dari enam ruas (BBL., 2012). Secara eksternal lobster dapat dibedakan jenis kelaminnya dengan melihat tanda tanda sebagai berikut:

- 1) Lobster jenis kelamin betina pada kedua pangkal kaki jalan ke-3 terdapat tonjolan berwarna putih bening.;
- 2) Lobster jenis kelamin betina di bagian sisi dalam kaki renang terdapat lembaran berpasangan yang berjumlah 2 lembar dan 1 lembar pada lobster jantan.;
- Ruas kaki jalan ke-5 bercabang tiga untuk lobster kelamin betina.
- 3) Tangkai kaki jalan ke-5 terdapat tonjolan yang berhubungan dengan testis pada lobster jantan (Yusnaini et al., 2009).

Lobster pasir memiliki bentuk tubuh yang memanjang dengan panjang berkisar 16-25 cm. Lobster pasir memiliki 5 pasang kaki jalan dan 5 pasang kaki renang serta modifikasi ekor seperti dayung atau yang disebut uropoda. Perut

bersegmen melintang dan bagian anterior depan dilengkapi oleh empat buah duri besar selain tanduk depan. Warna tubuh dari lobster pasir cenderung kehijauan hingga keco-kelatan dengan mata yang berwarna cokelat tua. Bagian antenulla berwarna se-perti pita putih-cokelat, abdomen (perut) diselimuti oleh bintik-bintik putih (Pratiwi, 2018).

2.3 Klasifikasi dan Morfologi *Sargassum* sp.

Adapun klasifikasi *Sargassum* sp. menurut Anggadiredja et al (2008) yaitu sebagai berikut:

Filum	: Phaeophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargassaceae
Genus	: <i>Sargassum</i>
Spesies	: <i>Sargassum</i> sp.

Sargassum sp. memiliki thallus yang gepeng, dengan banyak percabangan yang menyerupai pepohonan di darat. Struktur daunnya melebar dan lonjong seperti pedang, seringkali dilengkapi dengan gelembung udara yang umumnya bersifat soliter. Batang utama memiliki bentuk bulat yang agak kasar, dan bagian holdfast (yang digunakan untuk melekat) berbentuk cakram. Pinggir daun jarang bergerigi, seringkali berombak, dan ujungnya melengkung atau meruncing (Anggadiredja et al., 2008).

Makroalga jenis *Sargassum* biasanya merupakan tanaman air yang berwarna cokelat, memiliki ukuran yang relatif besar, dan tumbuh serta berkembang pada substrat dasar yang kuat (Handayani et al., 2004). Bagian atas tanaman ini menyerupai semak dengan bentuk simetris bilateral atau radial, dilengkapi dengan bagian sisi pertumbuhan. Secara umum, makroalga tumbuh secara liar dan belum sepenuhnya dimanfaatkan secara optimal (Kadi & Atmadja, 1988).

2.4 Habitat dan Penyebaran *Sargassum* sp.

Alga cokelat (*Sargassum* sp.), tumbuh di perairan hangat tropis dan subtropis, berasal dari perairan Jepang, China, dan Alaska (Thomas, 2002). Di Indonesia, beberapa jenis alga cokelat (*Sargassum* sp.) dapat ditemukan di perairan yang tenang dan melekat pada batu karang di pantai Pulau Jawa, mulai dari garis pantai hingga kedalaman 10 meter (Basma et al., 2011).

Karakteristik biologi dari rumput laut *Sargassum* menunjukkan bahwa spesies ini hidup dan tumbuh di daerah pesisir pantai dengan substrat batu karang. *Sargassum* dapat tumbuh di daerah intertidal, subtidal, hingga daerah dengan ombak besar dan arus yang deras. Alga ini berkembang di daerah tropis dengan suhu sekitar 27-30°C, salinitas sekitar 32-33 ppt, dan kedalaman perairan antara 0,5 hingga 10 meter (Hidayat et al., 2017).

Sargassum sp. tumbuh pada zona pantai, yang dikenal sebagai *reef flats*, mulai dari garis pantai hingga daerah tubir, yang biasanya disebut sebagai daerah intertidal (Fauziah, 2017). Daerah tubir ini menjadi tempat tumbuhnya *Sargassum* yang memiliki panjang thallus berkisar antara 1 hingga 3 meter. Pada daerah intertidal berbatu, *Sargassum* juga dapat tumbuh karena memiliki wilayah pesisir dengan substrat keras, seperti batuan atau karang mati (Handayani, 2020). Pertumbuhan *Sargassum* sp. dipengaruhi oleh habitat dengan kondisi perairan yang jernih (Kumalasari et al., 2018). *Sargassum* sp. dapat tumbuh hingga kedalaman di mana cahaya matahari masih dapat menembus (Kepel et al., 2018).

2.5 Kandungan Kimia Alga Cokelat

Makroalga cokelat mempunyai pigmen yang memberikan warna cokelat dan dapat memproduksi senyawa seperti algin atau alginat, laminarin, selulosa, fukoidan, dan manitol. Alga cokelat menghasilkan berbagai senyawa metabolit primer dan sekunder yang memiliki manfaat bagi manusia. Senyawa tersulfatasi, yang juga dikenal sebagai senyawa *fikokolidal* atau *hydrocolloid*, digunakan secara luas dalam industri makanan, kosmetik, dan farmasi sebagai bahan penun-

jang. Metabolit primer alga berupa polisakarida, yang menjadi struktur utama dinding sel alga dan diduga memainkan peran dalam mekanisme pengenalan antara alga dan patogen. Kandungan total polisakarida dalam alga berkisar antara 4 hingga 76% dari total berat kering.

Polisakarida dari rumput laut umumnya mengalami sulfatasi, membentuk polisakarida tersulfatasi. Polisakarida tersulfatasi merupakan kelompok makromolekul yang kompleks dengan aktivitas biologis yang penting. Perbedaan struktur kimia polisakarida tersulfatasi disebabkan oleh taksonomi dan struktur dinding selnya. Polisakarida tersulfatasi dalam alga berperan sebagai matriks ekstraseluler yang memiliki peran penting dalam regulasi mekanik, osmotik, dan ionik (Kasanah et al., 2018). Alga cokelat menghasilkan berbagai jenis polisakarida, dengan agar, karaginan, dan alginat menjadi komponen utama yang paling banyak dieksploitasi secara komersial. Polisakarida-polisakarida ini memiliki sifat-sifat tekstural dan penstabil yang berguna, sehingga sering digunakan dalam industri makanan dan sebagai sumber obat-obatan (Rasmussen & Morrissey, 2007).

2.6 Natrium Alginat

Salah satu bahan alami yang telah terbukti memiliki aktivitas antikoagulasi darah adalah alginat sulfat (Fan et al., 2010). Alginat merupakan polisakarida yang umumnya ditemukan pada alga cokelat, termasuk dalam genus seperti *Sargassum*. Selain mempunyai sifat antikoagulan, alginat juga telah teruji menunjukkan aktivitas imunostimulan dalam konteks budi daya udang vannamei (Darmawan et al., 2023). Alginat merupakan zat yang berasal dari ekstraksi *sargassum* sp yang merupakan salah satu jenis polisakarida yang terdapat dalam dinding sel *Phaeophyceae* dengan kadar mencapai 40% dari total berat kering, alginat juga berperan penting dalam mempertahankan struktur jaringan sel alga (Rasyid, 2010).

Alga cokelat, khususnya *Sargassum* sp, merupakan spesies yang dapat dijumpai di wilayah beriklim tropis. Sebagaimana biota lainnya, alga ini mengandung senyawa-senyawa aktif tertentu yang memiliki potensi medis sebagai bahan

pengobatan dan sebagai sumber vitamin, mineral, serat makanan non kalori, serta memiliki potensi biologis yang aktif (Suresh et al., 2013).

Alginat telah digunakan secara luas dalam beberapa aplikasi industri yaitu mulai dari makanan, kosmetik dan obat-obatan. Saat ini alginat telah dianggap sebagai sumber bioaktif potensial bahan dan aplikasi baru seperti antikoagulan, anti-virus, antiproliferasi dan antikanker sesuai dengan sifat biokompatibilitasnya, tidak beracun, non-imugenik dan dapat terbiodegradasi (Alban & franz., 2000). Struktur alginat mirip dengan heparin yang telah umum digunakan untuk terapi antikoagulan selama beberapa dekade.

2.7 Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA)

Ethylene diamine tetra acetate (EDTA) merupakan salah satu antikoagulan yang dipakai untuk menghindari pembekuan darah, EDTA juga digunakan dalam berbagai pemeriksaan hematologi seperti penentuan kadar hemoglobin, hitung jumlah leukosit, eritrosit, trombosit, retikulosit, hematokrit, dan penentuan laju en-ap Darah (Gandasoebrata, 2008). EDTA bekerja dengan cara mengikat ion kalsium, sehingga terbentuk garam kalsium yang tidak larut. Takaran yang direkomendasikan untuk penggunaan EDTA adalah 1-1,5 mg EDTA per ml darah. EDTA tidak memengaruhi ukuran dan bentuk trombosit atau leukosit. EDTA mencegah trombosit untuk menggumpal, sehingga cocok digunakan sebagai antikoagulan. *Ethylene diamine tetra acetate* (EDTA) memiliki kemampuan mempertahankan morfologi sel dan menghambat agregasi trombosit dengan baik dari pada antikoagulan yang lain (Muslim, 2015).

2.8 Natrium Sitrat

Natrium sitrat merupakan larutan yang isotonik dengan darah dan mencegah pembekuan darah. *International Committe for Standarization in Hematology (ICSH)* dan *International Society fo Thrombosis and Haematology* telah

merekomendasikan natrium sitrat sebagai antikoagulan untuk pemeriksaan koagulasi (Kiswari, 2014). Natrium sitrat adalah antikoagulan yang aman dan tidak beracun yang berfungsi dengan mengikat kalsium, mencegah pembekuan darah (Yayuningsih et al., 2017). Antikoagulan yang baik digunakan dalam pengecekan koagulasi merupakan yang mengandung sitrat (Gandasoebrata, 2008).

Konsentrasi sitrat yang digunakan dapat menyebabkan adanya variasi hasil pemeriksaan koagulasi, termasuk *Prothrombin Time*. Seluruh sitrat yang ada didalam tabung akan mengikat ion kalsium pada sampel pemeriksaan. Konsentrasi atau jumlah sitrat yang berlebihan akan mengikat lebih banyak ion kalsium, sehingga menyebabkan pemanjangan waktu terjadinya pembekuan (Adcock et al., 1997).

2.9 Heparin

Heparin telah digunakan lebih dari 50 tahun sebagai antikoagulan yang efektif baik untuk mencegah trombus pada penderita yang berisiko tinggi maupun pengobatan penyakit tromboemboli. Secara umum pengobatan menggunakan heparin yang memadai menurunkan angka kematian dan kesakitan akibat penyakit trombosis akut akan tetapi penggunaan heparin juga menyebabkan komplikasi yaitu perdarahan dan trombositopenia, sehingga perlu untuk memantau dosis antikoagulan dan dampak antiplatelet. (Warkentin., 2004)

Heparin adalah antikoagulan yang terjadi secara alami diproduksi oleh basofil dan sel mast. Heparin merupakan antikoagulan yang mencegah pembentukan bekuan dan perpanjangan pembekuan yang ada dalam darah. Heparin bekerja secara tidak langsung pada sistem pembekuan darah intrinsik dan ekstrinsik dengan meningkatkan aktivitas antitrombin III serta menghambat faktor IX, X, XI, dan XII. Selain itu, heparin juga merangsang pembentukan kompleks antitrombin III trombin yang dapat mencegah konversi fibrinogen menjadi fibrin. Dengan demikian, heparin menghentikan pembentukan trombin dari protrombin, sehingga mencegah pembentukan fibrin (Nugraha, 2015).

2.10 Aspirin

Aspirin atau asam asetil salisilat (asetosal) merupakan jenis obat dari keluarga salisilat yang sering digunakan sebagai anagesik, antipiretik, dan anti-inflamasi. Aspirin juga memiliki efek antikoagulan dan digunakan dalam dosis rendah dalam tempo lama untuk mencegah serangan jantung. Aspirin sudah dikenal dari masa perang dunia 1. Target kerja aspirin terletak pada *cyclooxygenase* (COX) dan *prostaglandin endoperoxidase synthase*. Aspirin menghambat akses asam arakidonat ke tempat penempelan sehingga menyebabkan inhibisi COX-1 dan COX-2 (Fuster & Sweeny, 2011).

2.11 Koagulasi Darah dan Mekanisme Pembekuan Darah

Koagulasi atau pembekuan darah merupakan kemampuan darah untuk berubah dari cair menjadi massa semi padat. Pembekuan darah melibatkan perubahan fibrinogen, makrofag yang dapat larut yang berupa rantai-rantai polipeptida menjadi monomer fibrin dengan kerja trombin enzim proteolitik. Aktivasi tromboplastin yang dapat mengubah protombin (faktor II) menjadi trombin terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik (Dewoto, 2008). Pembekuan darah (koagulasi) adalah suatu proses kimiawi dimana protein-protein plasma berinteraksi untuk mengubah molekul protein plasma besar yang larut, yaitu fibrinogen menjadi gel stabil yang tidak larut yang disebut fibrin (Sacher & McPherson, 2000).

Hemostasis memiliki pengertian bahwa darah tetap berada dalam sistem pembuluh darah. Komponen dalam mekanisme hemostasis yaitu trombosit, endotel vaskuler, faktor protein plasma prokoagulan, protein antikoagulan natural, protein fibrinolitik, dan protein antifibrinolitik. Semua komponen ini harus tersedia dalam jumlah cukup dengan fungsi yang baik serta tempat yang tepat untuk dapat menjalankan mekanisme hemostasis dengan baik. Hemostasis dan trombosis terdiri dari 3 fase yaitu terbentuknya agregasi trombosit, pembentukan jaring-jaring fibrin, dan pelarutan parsial atau total agregat oleh plasmin. Proses pembentukan agregasi trombosit awal bersifat sementara pada tempat luka. Trom-

bosit akan mengikat kolagen pada tempat luka pembuluh darah dan diaktifkan oleh trombin yang terbentuk dalam kaskade peristiwa koagulasi pada tempat yang sama. Trombosit dapat pula berikatan dengan ADP yang dilepaskan trombosit aktif lainnya. Trombosit akan berubah bentuk, kemudian melakukan proses agregasi dengan adanya fibrinogen untuk membentuk sumbat hemostatik ataupun trombus. Pembentukan jaring atau benang-benang fibrin yang terikat dengan agregat trombosit membentuk sumbatan hemostatik atau trombus yang lebih kuat dan lebih stabil.

Hemostasis terdiri dari hemostasis primer, hemostasis sekunder dan hemostasis tersier. Hemostasis primer terdiri dari komponen pembuluh darah dan trombosit. Hemostasis primer yang pertama kali terlibat dalam proses penghentian darah bila terjadi perdarahan. Proses ini diawali dengan vasokonstriksi pembuluh darah dan pembentukan plak trombosit yang menutup luka dan menghentikan perdarahan. Hemostasis sekunder terdiri dari faktor koagulasi dan antikoagulasi. Akhir dari mekanisme hemostasis sekunder adalah terbentuknya benang fibrin. Hemostasis tertier adalah mekanisme hemostasis lanjutan yang diperankan oleh darah. Bekuan atau hemostatic plug yang sudah terbentuk akan dihancurkan dalam sistem fibrinolisis. Hemostasis tersier ini bertujuan untuk mengontrol agar aktivitas koagulasi tidak berlebihan (Atanassova et al., 2012)

2.12. Antikoagulasi

Antikoagulan merupakan zat yang dapat menghambat pembekuan darah. Pengujian antikoagulan dapat ditujukan untuk pengobatan, seperti mencegah terjadinya trombosis pada keadaan tertentu, dan dapat juga ditujukan untuk mendapatkan plasma darah, yang ditujuannya untuk analisis komponen tertentu dalam darah (Weliyani et al., 2015).

Antikoagulan dapat mencegah pembekuan darah dengan jalan menghambat fungsi beberapa faktor pembekuan darah. Antikoagulan ada yang bekerja dengan cara mengaktifkan antithrombin sehingga mengganggu pematangan protein faktor penggumpalan, seperti thrombin. Selain itu, ada juga antikoagulan yang mengikat ion Ca^{+} , sehingga tidak bermuatan lagi dan penggum-

palan darah akan terhenti (Weliyani et al., 2015). Beberapa jenis antikoagulan yang sering digunakan antara lain EDTA, Natrium sitrat, Heparin, dan Warfarin. Namun, perlu dicatat bahwa terdapat beberapa efek samping yang terkait dengan penggunaan antikoagulan tersebut. Selain itu, dalam konteks analisis komponen darah, pemilihan antikoagulan memiliki dampak signifikan terhadap hasil analisis. Antikoagulan yang digunakan harusnya tidak merusak komponen darah dan tidak mempengaruhi morfologi sel darah atau menyebabkan hemolisis (Weliyani et al., 2015).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

3.1.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Agustus 2024.

3.1.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dan Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat yang digunakan pada pelaksanaan penelitian

No	Alat	Konsentrasi	Merek	Fungsi
1	Panci besar	-	-	Wadah pembuatan ekstrak.
2	Pengaduk	-	-	Mengaduk ekstrak.
3	Gelas ukur	500 & 1000ml	Iwaki Pyrex	Mengukur larutan.
4	Mikro pipet	Vol 0-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	DLAB	Mengambil larutan volume mikro.
5	Alumunium foil	-	Klin Pak	Menutup alat yang diperlukan.
6	Centrifuge	-	Corona GL-08	Memisahkan pellet dan substansi.

No	Alat	Konsentrasi	Merek	Fungsi
7	Tabung corning	15ml	Onemed	Wadah ekstrak.
8	Termometer	-	GEA	Pengukur suhu.
9	Timbangan digital	Ketelitian 0,01	Sojikyō	Menimbang bahan.
10	Lemari pendingin	187L	Sharp	Penyimpanan sampel dan media.
11	Toples besar	1L	-	Menyimpan ekstrak.
12	Coolbox	24S	Lion Star	Meletakkan sampel uji.
13	Sput	1ml	Onemed	Mengambil hemolim.
14	Tabung eppendorf	5ml	Biologix	Wadah larutan.
15	Microplate datar	96 well	Onemed	Wadah darah saat diuji.
16	Saringan	-	-	Menyaring ekstrak.
17	Corong	-	-	Membantu memindahkan ekstrak ke botol lain.
18	Kompor	-	Rinnai	Merebus <i>Sargassum</i> .
19	Plastik wrapping	-	Klin Pak	Menutup bahan yang ingin disimpan.
20	Mesin penggiling	-	FFC 37	Menghaluskan <i>Sargassum</i> .
21	pH paper	-	MQuant	Mengukur tingkat pH.
22	Sarung tangan latex	-	Nitrile	Menjaga bahan dan larutan tetap steril.
23	Akuarium	120 x 50 x 50 cm ³	-	Media pemeliharaan lobster.
24	Cawan petri	100x15mm	Iwaki Pyrex	Media bakteri.
25	Microtube	1,5ml	Biologix	Media darah setelah diambil.
26	Microplate u shape	96 well	Onemed	Media darah dan bakteri .
27	Jarum ose	-	HHH Jerman	Mengambil koloni bakteri.

No	Alat	Konsentrasi	Merek	Fungsi
28	<i>Hot plate</i>	-	MS-H280-Pro	Memanaskan larutan.
29	<i>Laminar flow</i>	71 x 26 x 50cm ³	Nuaire	Ruang kerja kaca aseptis.
30	<i>Autoclave</i>	24L	Gea YX-18LDJ	Mensterilkan bahan uji.
31	Bunsen	Ketebalan 3-4mm	Rofa lab	Alat sterilisasi.
32	Aerasi	-	-	Meningkatkan sirkulasi oksigen di akuarium.
33	Filter akuarium	-	-	Memfilter air akuarium.
34	<i>Spreader</i>	-	Bacterial Cell Spreader Glass Drigalki Triangle	Meratakan bakteri ke media.

Tabel 2. Bahan yang digunakan pada pelaksanaan penelitian

No	Nama Bahan	Konsentrasi	Merek	Fungsi
1	Akuades	-	-	Pelarut bahan kimia.
2	HCl	1%	-	Bahan pelarut <i>Sargassum</i> .
3	KCl	187, 5ml	-	Bahan pelarut <i>Sargassum</i> .
4	Serbuk <i>Sargassum</i>	500g	-	Bahan utama sebagai antikoagulan.
5	Soda ASH	300g	-	Bahan pelarut <i>Sargassum</i> .
6	HCl	10%	-	Bahan pelarut <i>Sargassum</i> .
7	Soda api	400g	Kuda Bintang	Menetralkan ekstrak.
8	Air laut	280 L	-	Media pemeliharaan lobster.
9	EDTA	10%	-	Bahan antikoagulan.
10	Na Sitrat	10%	-	Bahan antikoagulan.
11	Heparin	10%	-	Bahan antikoagulan.
12	Aspirin	10%	Aspilets Chewable	Bahan antikoagulan.
13	Es Batu	-	-	Untuk mendinginkan darah.
14	Lobster Pasir	-	-	Hewan uji.
15	Isolat bakteri	-	-	Menguji bakteri.
16	Alkohol	70%	Onemed	Sterilisasi.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode campuran (*mixed methods*) antara eksploratif dan eksperimental. Metode eksploratif pada pengambilan sampel hemolim secara langsung untuk mengidentifikasi ekspresi gen-gen yang terlibat pada sistem imun lobster pasir. Metode eksperimental digunakan untuk menemukan antikoagulan yang terbaik untuk hemolim lobster yang terdiri dari 5 perlakuan dan 1 kontrol dengan masing-masing 3 kali pengulangan sebagai berikut:

1. Hemolim lobster tanpa penambahan antikoagulan (kontrol)
2. Hemolim lobster dengan penambahan antikoagulan komersil Aspirin, EDTA, NA Sitrat dan Heparin dengan dosis sebagai berikut:
 - a) 1:1 (25µl hemolim lobster:25µl antikoagulan)
 - b) 1:2 (25µl hemolim lobster:50µl antikoagulan)
 - c) 2:1 (50µl hemolim lobster:25µl antikoagulan)
3. Hemolim lobster dengan penambahan antikoagulan alami Alginat dengan dosis sebagai berikut:
 - a) 2:3 (50µl hemolim lobster:75µl alginat)
 - b) 2:4 (50µl hemolim lobster:100µl alginat)
 - c) 2:5 (50µl hemolim lobster:125µl alginat)

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak

Ditimbang 500 g rumput laut halus kemudian rumput laut direndam HCl 1% selama 1 jam, lalu rumput laut dibilas menggunakan air mengalir, kemudian disiapkan air tawar sebanyak 15 l dalam wadah perebus lalu dimasukan soda ASH 300 gram ke dalam wadah berisi air dan diaduk, setelah itu rumput laut direbus selama 1 jam dengan suhu 60°C dan diaduk sesekali. Setelah direbus rumput laut disaring menggunakan saringan untuk mendapat air/ekstrak lalu dilakukan pemucatan ekstrak dengan KCl 187,5 ml dan didiamkan 30 menit. Kemudian dilakukan penurunan ekstrak dengan HCl 10% sampai mencapai pH 2-3 dan didiamkan 30

menit setelah itu ekstrak dinetralkan dengan soda api sampai pH 7 dan ekstrak siap dipakai/disimpan dalam wadah tertutup (Setyawan et al., 2021).

3.4.2 Persiapan Wadah Pemeliharaan

Media pemeliharaan yang digunakan yaitu akuarium berukuran 120 x 50 x 50 cm³ lalu air yang digunakan adalah air laut. Akuarium dilengkapi dengan 2 selang aerasi dan filter akuarium untuk menjaga air tetap bersih.

3.4.3 Persiapan hewan uji

Hewan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu lobster pasir dewasa berukuran 8-17cm hasil budi daya di keramba jaring apung mitra Unila di Hanura, Kecamatan Teluk Pandan, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung. Selama pemeliharaan dalam akuarium, lobster pasir diberi pakan udang vaname dan cumi-cumi segar sebanyak dua kali sehari.

3.4.4 Pengambilan Sampel Hemolim

Pengambilan sampel hemolim dilakukan di Laboratorium Budidaya Perikanan, Jurusan Perikanan dan Kelautan dengan bantuan alat suntik (*syringe*) 1ml dengan *needle* 23G, hemolim diambil dari pangkal kaki jalan lobster dari 3 lobster yang berbeda kemudian hemolim dimasukkan ke dalam tabung *microtube* yang telah diberi label lalu dimasukan ke dalam *coolbox* yang sudah diisi dengan es batu.

3.4.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang berbahan kaca sebelum digunakan dicuci terlebih dahulu hingga bersih lalu dikeringkan, dan dibungkus menggunakan kertas HVS kemudian dimasukan ke dalam plastik tahan panas. Bahan yang digunakan berupa media agar yang sudah dilarutkan 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

yaitu 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 yaitu dengan menimbang media TSA sebanyak 5g lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan aquades sebanyak 125ml, kemudian erlenmeyer ditutup 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.

3.4.6.2 Media TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Pembuatan media TSB yaitu dengan menimbang media TSB sebanyak 3,75g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan akuades sebanyak 125ml, kemudian erlenmeyer ditutup menggunakan *aluminium foil*. Larutan dihomogenkan dan dipanaskan sampai mendidih menggunakan *hot plate*. Selanjutnya Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1atm selama 30 menit. Media TSB dituangkan ke tabung reaksi berukuran 10ml yang sudah steril sebanyak 7ml per tabung reaksi.

3.4.7 Penanaman Bakteri

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

Penanaman bakteri pada media TSA dilakukan dengan cara bakteri diinokulasi menggunakan jarum ose pada media TSA kemudian digores 4 kuadran. Isolat bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang digunakan yaitu antara lain: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp.* Dan *Staphylococcus aureus*.

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

Bakteri 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 Pengamatan

3.4.8.1 Metode *Lee-White*

Metode ini dilakukan untuk menentukan berapa lama pembekuan darah (koagulasi) yang diamati secara langsung. Antikoagulan berupa aspirin, *Ethylene diamine tetra acetate* (EDTA), natrium sitrat, heparin, dan alginat dimasukkan ke dalam *microplate* sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan menggunakan *micropipet* yang telah dipasangkan *yellowtip* dan *whitetip*. Kemudian diambil hemolim lobster pasir sesuai dengan dosis yang sudah ditentukan dan dimasukkan ke dalam *microplate*. Setelah itu, amati lama pembekuan hemolim lobster pasir dengan menggunakan *stopwatch* hingga 40 menit. Setelah diamati selama 40 menit tutup *microplate* lalu lapiisi dengan *plastic wrap* kemudian simpan di kulkas kemudian amati lama pembekuan darah setiap satu hari sekali selama tiga hari.

3.4.8.2 Aglutinasi

Pengamatan aglutinasi dilakukan menggunakan *microplate* 96 well with *lid flat*. Pada blok A, B, C, D, E, dan F 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. Ditambahkan antikoagulan berupa aspirin pada sumuran blok A sebanyak 25 μ l. Ditambahkan antikoagulan berupa EDTA pada sumuran blok B sebanyak 25 μ l. Ditambahkan antikoagulan berupa natrium sitrat pada sumuran blok C sebanyak 25 μ l. Ditambahkan antikoagulan berupa heparin pada sumuran blok D sebanyak 25 μ l. Ditambahkan antikoagulan berupa alginat pada sumuran blok E sebanyak 25 μ l. Kemudian diho-

mogenkan larutan pada *microplate* dengan cara menggoyangkan *microplate* membentuk angka 8 selama 5 menit. Inkubasi *microplate* pada suhu ruang selama 30 menit sampai 1 jam kemudian diamati aglutinasi yang terbentuk.

3.4.8.3 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 3.

Tabel 3. Primer gen imun lobster pasir (*Panulirus homarus*)

Gen	Primer	Sekuen (5'-3')	Accession	Referensi
LGBP	CqLGBPqPCR-F	CAGCGGTGAGATTGACATT	KP100470	Hou et al.,(2015)
	CqLGBPqPCR-R	TGGAAACTGTTAGCGAAGG		
Lectin	CqCTLqRT-F	ATGGTGAAGGCATGTGTGACG	MN944107	Wang et al.,(2020)
	CqCTLqRT-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. Isolasi RNA Hemolim

Metode isolasi RNA dilakukan sesuai dengan Schmittgen & Livak (2008). Sebanyak 50 μ L hemolim ditambahkan larutan Trizol. Hemolim dan Trizol dihomogenkan dengan menggunakan pipet, inkubasi sampel pada suhu ruang selama 5 menit. Sebanyak 200 μ L kloroform dan ditambahkan dan dikocok sebanyak 15 kali, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit. Supernatant dipindahkan pada 1,5 ml *microtube*. Tambahkan 500 μ L isopropanol dan RNA dipresipitasi selama 10 menit pada suhu ruang. Sampel di sentrifugasi pada kecepatan 12.000g selama 10 menit. Pindahkan supernatant pada 1,5 ml *microtube*,

kemudian tambahkan 1.000 μL etanol 75% sentrifugasi pada 7.500g selama 5 menit. Buang etanol yang terdapat pada tube menggunakan *micropipette*.

Langkah selanjutnya yaitu DNase Treatment. Tambahkan RNA dengan RNasefree DNase untuk menghilangkan residual DNA. Tambahkan 1,2 μL RNA dengan 4,5 μL master mix yang terdiri dari bahan pada (Tabel 4) kemudian tambahkan air se-banyak 30 μL . Homogenkan dengan cara dijentikkan, masukan *tube* ke dalam *minicentrifuge*. Inkubasi sample menggunakan *PCR Thermal Cycler* pada suhu 37°C selama 10 menit dan 90°C selama 5 menit untuk menginaktivasi DNase.

Komposisi bahan untuk isolasi RNA dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi bahan untuk isolasi RNA

Bahan	Volume (μL)
RNase-free DNase I	1,8
RNA guard	0,3
25 mM MgCl ₂	2,4
Total	4,5

a. Sintesis cDNA (*Reverse transcrption*)

Siapkan master mix (Tabel 5). Tambahkan 25 μL reverse transkrip mastermix pada 200 μL PCR Strip tube. Tambahkan 25 μL RNA yang sudah di beri perlakuan DNase. Inkubasi menggunakan *PCR Thermal Cycler* pada 26°C selama 10 me-nit 42 °C selama 45 menit dan 75 °C selama 10 menit.

Komposisi bahan untuk sintesis cDNA dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Komposisi bahan untuk sintesis cDNA

Bahan	Volume (μL)
5 SuperScript II buffer	10
10 mM dNTPs	5
0.1 M DTT	5
BSA (RNase-free, optional)	1,25
<i>Random primers</i>	0,25
RNA guard	1,25
Superscript II reverse transcriptase	1,25
Molecular biology water	1
Total	25

Hasil PCR konvensional selanjutnya di elektroforesis untuk melihat hasil amplifikasi DNA. Elektroforesis dilakukan pada gel agarose 1%. Gel agarose dicetak dalam cetakan gel berukuran kecil (6 Sumuran). Gel agarose kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis yang sebelumnya sudah ditambahkan TAE Buffer 1X. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel masing-masing sebanyak 5 μ L. Elektroforesis dilakukan pada 80 mA selama 30 menit. Visualisasi pita DNA dilakukan dengan menggunakan UV-Transilluminator.

a. *Real Time Quantitative* PCR (qPCR)

Ekspresi gen imun di analisis menggunakan qPCR mengikuti standar protokol qPCR (Setyawan, 2018). Bahan dan kondisi qPCR terdapat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Tabel 6. Bahan *Real Time Quantitative* PCR (qPCR)

Bahan	Volume (μ L)
2 x SYBR Green reagen	6,25
Primer Forward	0,125
ROX Low reference dye	0,25
dH ₂ O	10,5

Tabel 7. Kondisi *Real Time Quantitative* PCR (qPCR)

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

Ket: tanda (~) menunjukan siklus yang sama.

3.5 Analisis data

Data yang diperoleh pada penelitian ini disajikan dalam bentuk gambar dan tabel yang dianalisis secara deskriptif.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Penambahan antikoagulan komersil (aspirin, EDTA, Na sitrat, heparin) maupun antikoagulan alami (alginat) pada hemolim lobster pasir (*Panulirus homarus*) efektif mencegah pembekuan darah lebih dari 24 jam. Hemolim lobster pasir juga terbukti dapat digunakan untuk mendeteksi endotoksin bakteri dikarenakan keberadaan gen protein reseptor yang mampu mendeteksi keberadaan benda asing seperti endotoksin pada dinding sel bakteri. Penambahan antikoagulan juga tidak mempengaruhi efektivitas hemolim dalam mengaglutinasi bakteri.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah, perlu diadakannya penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi alginat sebagai antikoagulan alternatif dari antikoagulan komersil.

DAFTAR PUSTAKA

- Adcock, D., 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.
<http://doi.org/10.1093/ajcp/107.1.105>
- Alban, S., & Franz, G. (2000). Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thrombosis Research*. 99(2000), 377-388.
[http://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00264-4](http://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00264-4)
- Anggadiredja, J.T., Zalnika, A., Purwanto, H., & Istini, S. (2008). *Rumput laut*. Penebar Swadaya.
- Anggraini, R., Bengen, D.G., & Nati N.M.N. (2017). Struktur populasi dan morfometri belangkas *Carcinoscorpius rotundicauda*, Latreille 1802 di Pesisir Kampung Gisi Teluk Bintan Kepulauan Riau. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(1), 211-220.
<https://journal.ipb.ac.id/index.php/jurnalikt/article/view/17934>
- Atanassova, P. A., Massaldjieva, R. I., Chalakova, N. T., & Dimitrov, B. D. (2012). *Cerebral venous sinus thrombosis – Diagnostic strategies and prognostic models: A review*. In E. Okuyan (Ed.), *Venous thrombosis – Principles and practice* (pp. 129–157). InTech.
<https://doi.org/10.5772/27889>
- Balai Budidaya Laut (BBL) Lombok. (2012). *Petunjuk teknis budidaya lobster (Panulirus spp)*. Kementrian Kelautan dan Perikanan. Lombok.
- Basma, A.A., Zakaria, Z., Latha, L.Y., & Sasidharan, S. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4(5), 386-390. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60109-0](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60109-0)
- Beekey, M.A., Mattei, J.H., Pierce, B.J. (2013). Horseshoe crab eggs: a rare resource for predators in Long Island Sound. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 439(1), 152-159.
<https://doi.org/10.1016/j.jembe.2012.11.004>

- Brown, B.A. (1984). *Hematology: Principles and procedures*. Lea & Febiger. Philadelphia.
<https://archive.org/details/hematologyprinci0006brow/mode/1up>
- Carpenter, K.E., & V.H. Niem. (1998). *FAO Species identification guide for fishery purposes. the living marine resources of the western central pacific volume 2. cephalopods, crustaceans, holothurians and sharks*. FAO. Rome.
<https://www.fao.org/4/w7192e/w7192e00.htm?utm>
- Darmawan, M., Setyawan, A., Juliasih, N.L.G.R., & Fidyandin, H.P. (2023). Efektivitas perlindungan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) terhadap infeksi white spot syndrome virus (WSSV) dengan suplementasi natrium alginat *Sargassum* sp. dari perairan Lampung dan kombinasi dengan vitamin C. *Journal of Tropical Marine Science* 6.(1), 11-22.
<https://doi.org/10.33019/jour.trop.mar.sci.v6i1.3819>
- Dewoto, H.R. (2008). *Antikoagulan, antitrombotik, trombolitik dan hemostatik. edisi 5*. Balai Penerbit. Jakarta.
- Durachim, A., & Astuti, D. (2018). *Hemostatis : bahan ajar teknologi laboratorium medik*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Erwyansyah, Wardiatno, Y., Kurnia, R., & Butet, N.A. (2018). Kepastian taksonomi dan sebaran Belangkas *Tachypleus tridentatus* Leach 1819 di Perairan Balikpapan Timur. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 10(3), 547-559. <https://doi.org/10.29244/jitkt.v10i3.21917>
- Fan, L., Jiang, L., Xu, Y., Zhou, Y., Shen, Y., Xie, W., Long, Z., & Zhou, J. (2010). Synthesis and anticoagulant activity of sodium alginate sulfates. *Carbohydrate Polymers*. 83(2011), 1797-1803.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.038>
- Fauziah, F. (2017). *Pertumbuhan Sargassum sp. pada tipe habitat dan berat koloni berbeda di pantai sakera bintan*. (Skripsi). Universitas Maritim Raja Ali Haji. Tanjung Pinang.
- Fitria, L., Illiy, L. L., & Dewi, I. R. (2016). Pengaruh antikoagulan dan waktu penyimpanan terhadap profil hematologis tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout. 1769) Galur Wistar. *Biosfera*. 33(1), 22-30.
<https://doi.org/10.20884/1.mib.2016.33.1.321>
- Funkhouser, D. (2011). Crab love nest. *Scientific American*. 304(4), 1-29.
<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. Jakarta.
- Handayani, T., Sutarno, & Setyawan, A.D. (2004). Analisis komposisi nutrisi rumput laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh. *Biofarmasi*. 2(2), 45-5.
<https://doi.org/10.13057/biofar/f020201>
- Handayani, T. (2020). Struktur komunitas, peranan dan adaptasi makroalga di intertidal berbatu. *Oseana*. 45(1), 59-69.
[10.14203/oseana.2020.Vol.45No.1.56](https://doi.org/10.14203/oseana.2020.Vol.45No.1.56)
- Haryanti, Sembiring, S.B.M., Sudewi, Widiastuti, Z., Giri, N.A., & Sugama, K. (2016). Respons imunitas benih lobster, *Panulirus homarus* dengan penggunaan probiotik pada pakan moist. *Jurnal Riset Akuakultur*. 12(1), 85-97. <https://dx.doi.org/10.15578/jra.12.1.2017.85-97>
- Hastuti, D.S. (2012). Suplementasi β -glucan dari ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam pakan terhadap aktivitas fagositosis, aktivitas NBT, total protein plasma dan aktivitas aglutinasi darah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Depik*. 1(3), 149-155. <https://doi.org/10.13170/depik.1.3.102>
- Hickman, Cleveland. P. (2008). *Integrated principles of zoology*. McGraw-Hill.
https://archive.org/details/isbn_9780072930283?utm
- Hidayat, T., Nurjanah, Nurilmala, M., & Anwar, E. (2017). Karakterisasi rumput laut tropika dari Kepulauan Seribu sebagai sumber bahan baku kosmetik. *Creative Research Journal*. 4(2), 49-62.
<https://doi.org/10.34147/crj.v4i02.165>
- 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.cbpb.2009.04.014>
- Kadi, A., & Atmadja, W. S. (1988). *Rumput laut (Alga): Jenis, reproduksi, produksi, budidaya, dan pasca panen*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi, LIPI.
- Kasanah, N., Setyadi, Triyanto, & Ismi, T., (2018). *Rumput laut indonesia: keanekaragaman rumput laut di Gunung Kidul Yogyakarta*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Keohane, E.M., Smith, L., & Walenga, J.M. (2015). *Rodax's hematology*. Elsevier Health Sciences. Amsterdam.

- Kepel, R. C., Mantiri, D. M. H., & Nasprianto. (2018). Biodiversitas makroalga di perairan pesisir tongkaina Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Platax*, 6(1), 160-161. <https://doi.org/10.35800/jip.6.1.2018.19558>
- Kiswari, R. (2014). *Hematologi dan transfusi*. Erlangga. Jakarta.
- Kumalasari, D. E., Sulistiyowati, H., & Setyati, D. (2018). Komposisi jenis alga makrobentik divisi phaeophyta di zona intertidal Pantai Pancur Taman Nasional Alas Purwo. *Berkala Sainstek*, 6(1), 28. [10.19184/bst.v6i1.7558](https://doi.org/10.19184/bst.v6i1.7558)
- Li, F., & Xiang, J. (2013). Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Developmental and Comparative Immunology*. 39(1-2), 11–26. [10.1016/j.dci.2012.03.016](https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.016)
- Marques, M. R. F., & Barracco, M., A. (2000). Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*. 1(191), 23-44. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00417-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00417-8)
- Muslim, A. (2015). Pengaruh waktu simpan darah K₂EDTA dan Na₂EDTA pada suhu kamar terhadap hemoglobin. *Jurnal Analisis Kesehatan*. 4(2), 329-396. <https://doi.org/10.26630/jak.v4i2.259>
- Nugraha, G. (2015). *Panduan pemeriksaan laboratorium hematologi dasar*. Trans Info Media. Jakarta.
- Nugroho, T.S., Fahrudin, A., Yulianda, F., & Bengen, D.G. (2018). Analisis kesesuaian lahan dan daya dukung ekowisata mangrove di kawasan mangrove Muara Kubu, Kalimantan Barat. *Jurnal Pengelolaan Sumber Daya Alam dan Lingkungan*. 9(2), 483-497. <http://dx.doi.org/10.29244/jpsl.9.2.483-497>
- Paikin, J.S., & Eikelboom, J.W. (2012). Aspirin. *Circulation*. 125(10), 439-442. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.046243>
- Pratiwi, R. (2018). Keanekaragaman dan potensi lobster (Malacostraca: *palinuridae*) di Pantai Pameungpeuk, Garut Selatan, Jawa Barat. *Biostera*, 35(1), 10- 22. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2018.35.1.524>
- Pulsawat, W., & Thongmalee S. (2012). Screening and environmental factors effecting on growth of heparinase-producing bacteria. *KKU Research Journal*. 17(4), 593-606. https://rtt.kku.ac.th/ejournal/pa_upload_pdf/414039.pdf?utm
- Rasmussen R.S., & Morrissey M.T., (2007). Marine biotechnology for production of food ingredients. *Taylor SL Advances in Food and Nutrition Research*. 52, 237-292. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52005-4](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52005-4)

- Rasyid A. (2010). Ekstraksi natrium alginat dari alga coklat *Sargassum echinocarphum*. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*. 36(3), 393-400.
- Rubiyanto, E. (2012). *Studi Populasi Kepiting Tapal Kuda (Xiphosura) di Perairan Kuala Tungkal, Kabupaten Tanjung Jabung Barat, Jambi*. (Disertasi). Universitas Indonesia.
<https://lib.ui.ac.id/detail.jsp?id=20308202>
- Ronghua H, Yumin D., & Jianhong Y. (2003). Persiapan dan aktivitas antikoagulan in vitro dari alginat sulfat dan turunan kuaterisasinya. *Polim Karbohidrat*. 52, 19-24.
- Sacher, R. A., & McPherson, R. A. (2000). *Widmann's clinical interpretation of laboratory tests*. F.A. Davis Company.
- Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Setyawan, A., Riana, Supono, Hudaiah, S., & Fidyandini, H. P. (2021). Nonspecific immune response of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by supplementation of sodium alginate of *Sargassum* collected from Lampung Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 890(1), 1-8. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/890/1/012015>
- Shun-Feng, C., Xin, C., Deng, D., & Wenqi, W. (2018). Klasifikasi hemosit dari empat crustacea dan reaktivitas silang antiseranya. *Jurnal Penelitian Kerang*. 37(1), 159-171. <https://doi.org/10.2983/035.037.0114>
- Small, D. P., Calosi, P., Boothroyd, D., Widdicombe, S., & Spicer, J. I. (2015). Stage-specific changes in physiological and life-history responses to elevated temperature and pCO₂ during the larval development of the European lobster *Homarus gammarus* (L.). *Physiological and Biochemical Zoology*. 88(5), 494–507. <https://doi.org/10.1086/682734>
- Suci I.T., Windarti, & Efawani. (2020), februari 17. Identifikasi jenis belangkas di Muara Sungai Paluh Semblang Desa Tapak Kuda Kecamatan Tanjung Pura Kabupaten Langkat Provinsi Sumatera Utara. *Berkala Perikanan Terubuk*. 48(1), 274-286.
- Suresh, V., Senthilkumar, N., Thangam, R., Rajkumar, M., Anbazhagana, C., Rengasamy, R., Gunasekaran, P., Kannan, S., & Palani, P. Separation. (2013). Purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *sargassum plagiophyllum* and its *in vitro* anticancer and antioxidant activity. *Process Biochemistry*. 48(2), 364-373.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.014>

- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., & Tang, S. (2013). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(4), 954-967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>
- Thomas, D.N. (2002). *Seaweeds*. Natural History Museum. London.
- Ueda, R., Sugita, H., & Deguchi Y. (1994). Bactericidal Activities of the Hemolymph of the Japanese Spiny Lobster, *Panulirus japonicus* (Decapoda, Palinuridae). *Crustaceana*. 67(2), 256-258. <https://doi.org/10.1163/156854094X00611>
- Warkentin, T.E. (2004). Heparin induced thrombocytopenia. *Diagnosis and Management*. 110(18), 454-458. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147537.72829.1B>
- 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>
- Weliyani, Nugroho, R., A., & Syafrizal. (2015). *Uji Aktivitas Antikoagulan Ekstrak Propolis Trigona Laeviceps Terhadap Darah Mencit (Mus Musculus L.) (Proseding Seminar Sains dan Teknologi)* Universitas Mulawarman. Samarinda.
- Yayuningsih, D., Prayitno, H., & Mazidah, R. (2017). *Hematologi*. Buku Kedokteran (EGC). Jakarta.
- Yu, X.Q., & Kanost, M.R. (2004). Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental & Comp Immunology*. 28(9), 891-900. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.02.005>
- Yusnaini, M.N. Nessa, M. I. Djawad, & D. D. Trijuno. (2009). Ciri morfologi jenis kelamin dan kedewasaan Lobster mutiara (*Panulirus ornatus*). Torani. *Jurnal IlmuKelautan dan Perikanan*. 19(3), 166-17.
- Zhang, H., Mau, W., Fang, F., Li, H., Sun, H., & Chen, Y. (2008). Karakteristik kimia dan aktivitas antikoagulan polisakarida tersulfasi dan fragmennya dari *Monostroma latissimum*. *Polim Karbohidrat*. 71, 428-434. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.012>