

Karakterisasi Nanopartikel dan Uji Antiagregasi Platelet secara *In-Vitro* terhadap Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum polycystum*) Hasil Hidrolisis Enzim Sellulase

(In-Vitro Characterization of Nanoparticles and Antiaggregation Tests on Brown Seaweed Extracts (*Sargassum polycystum*) Types of Sellulase Enzyme Hydrolysis)

KARTININGSIH*, SYAMSUDIN ABDILLAH, PARTOMUAN SIMANJUNTAK, CYNTHIA, HARYO

Laboratorium Teknologi Farmasi Sediaan Semi Solid dan Cair Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Lenteng Agung, Jakarta Selatan.

*Penulis korespondensi, Hp : 08128026680

e-mail: kartiningsih.kania2@gmail.com

Diterima 1 April 2019, Disetujui 13 September 2019

Abstrak: Rumput laut coklat mengandung fukoidan, yakni suatu polisakarida sulfat dengan bobot molekul besar (sekitar 100.000 Da) yang memiliki aktivitas antiagregasi platelet. Aktivitas ini tercapai apabila fukoidan memiliki bobot molekul kecil (3900-7600 Da) sehingga dilakukan pengecilan bobot molekul dengan cara hidrolisis enzim sellulase lalu dibuat bentuk nanopartikel untuk meningkatkan aktivitas. Tujuan penelitian ini untuk memperoleh nanopartikel ekstrak yang memenuhi persyaratan mutu fisik dan memiliki aktivitas antiagregasi platelet yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun sesudah dihidrolisis. Ekstraksi menggunakan metode maserasi kinetik 80% dilanjutkan dengan larutan Kalsium Klorida 2%. Hasil dikeringkan lalu dihidrolisis dengan enzim sellulase dan dibuat nanopartikel dengan metode gelasi ionik. Hasil karakterisasi nanopartikel berupa ukuran partikel sebesar 552,8, indeks polidispersitas sebesar 0,569, zeta potensial sebesar +53,5 mV, dan berbentuk sferis. Hasil pengujian aktivitas antiagregasi platelet secara in-vitro dengan konsentrasi 500 µg/mL menunjukkan persentase penghambatan agregasi platelet ekstrak rumput laut coklat sebesar 22,19% dan ekstrak setelah hidrolisis sebesar 57,94% dan nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis sebesar 72,93%. Nanopartikel ekstrak memenuhi persyaratan mutu fisik dan nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis memiliki aktivitas antiagregasi platelet paling tinggi dibandingkan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun setelah dihidrolisis.

Kata kunci: rumput laut coklat, fukoidan, hidrolisis enzim, nanopartikel, antiagregasi platelet.

Abstract: Brown seaweed contains fucoidan, a large molecular weight sulfate polysaccharide (about 100,000 Da) which has platelet antiaggregation activity. This activity is achieved if the fucoidan has a small molecular weight (3900-7600 Da) so this activity can increase by hydrolyzed with cellulase Enzym. The purpose of this study was to obtain extract nanoparticles that meet physical quality requirements and have a higher platelet antiaggregation activity than brown seaweed extract both before and after hydrolysis. Extraction was using kinetic maseration method using 80% ethanol after that using 2% calcium chloride solution. The results were dried and hydrolyzed with cellulase enzyme and nanoparticles were made by ionic gelation method. Nanoparticle characterization results in particle size of 552.8, polydispersity index of 0.569, potential zeta of +53.5 mV, and spherical shape. In-vitro testing results for platelet antiaggregation activity showed the percentage of platelet aggregation inhibition of brown seaweed extract with a concentration 500 µg/mL is 22.19% and extracts after hydrolysis was 57.94% and nanoparticles extract after hydrolysis was 72.93%. Extract nanoparticles meet physical quality requirements and extracted nanoparticles after hydrolysis have the highest platelet antiaggregation activity compared to brown seaweed extract both before and after hydrolysis.

Keywords: brown seaweed, fucoidan, enzyme hydrolysis, nanoparticles, platelet antiaggregation.

PENDAHULUAN

INDONESIA merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah, salah satunya adalah tanaman sumber bahan obat alami⁽¹⁾. Rumput laut merupakan salah satu sumber daya alam yang melimpah di perairan Indonesia⁽²⁾. Di Indonesia terdapat banyak jenis rumput laut, salah satunya adalah alga coklat (*Sargassum polycystum*)⁽³⁾. Akhir-akhir ini rumput laut mendapat perhatian penting dalam potensinya sebagai antibakteri, antioksidan dan antiagregasi platelet⁽⁴⁾. Fukoidan merupakan sekelompok senyawa polisakarida hetero yang ada pada dinding selaput rumput coklat dan beberapa invertebrata laut⁽⁵⁾. Fukoidan hanya dapat ditemukan pada alga coklat⁽⁶⁾. Struktur fukoidan biasanya mengandung L-fucose dan sulfat. Sebagian besar metode ekstraksi cenderung mengekstrak fukoidan sebagai multikomponen fukoidan bentuk kasar (*crude fukoidan*)⁽⁷⁾.

Aktivitas antiagregasi platelet dapat tercapai apabila fukoidan memiliki bobot molekul kecil, oleh sebab itu dilakukan dalam tahap untuk menurunkan bobot molekul fukoidan dengan cara hidrolisis secara enzimatis⁽⁸⁾. Dikarenakan senyawa fukoidan merupakan senyawa polimer dimana tersusun dari berbagai macam polisakarida, maka digunakan enzim sellulase sebagai enzim yang menghidrolisis fukoidan. Berdasarkan hasil penelitian (2018)⁽⁹⁾, dilakukan optimasi konsentrasi substrat, optimasi volume enzim, dan optimasi waktu hidrolisis menggunakan metode KLT dan diperoleh hasil konsentrasi substrat terbaik sebesar 2%, volume enzim terbaik sebesar 25 µL, dan waktu hidrolisis terbaik selama 12 jam

Sistem penghantaran obat dengan lokasi tertarget merupakan masalah utama dalam pengobatan banyak penyakit dan merupakan tantangan dalam penelitian di bidang kesehatan⁽¹⁰⁾. Suatu eksperimen dilakukan untuk mengetahui apakah fukoidan molekul kecil dapat meningkatkan bioavailabilitas dan efektivitas, namun diperoleh perbedaan yang tidak signifikan antara fukoidan bobot molekul besar dan fukoidan bobot molekul kecil⁽¹¹⁾. Berdasarkan hal tersebut, dikembangkan teknologi nanopartikel dalam sistem penghantaran obat. Metode ini dapat membantu meningkatkan bioavailabilitas⁽¹²⁾. Dalam penelitian ini, dilakukan pembentukan nanopartikel fukoidan dengan metode gelasi ionik.

Agregasi platelet merupakan salah satu faktor yang mengakibatkan penyumbatan pada pembuluh darah arteri sehingga dapat menyebabkan gangguan *infark miokard* atau *stroke*⁽¹³⁾. Obat antiagregasi platelet digunakan pada pengobatan dan pencegahan

serangan *stroke* akibat terjadinya proses trombosis. Aspirin, klopidothromboprotein, dan dipiridamol merupakan contoh antiagregasi platelet, namun obat tersebut dapat menimbulkan efek samping terutama apabila digunakan dalam jangka panjang. Maka diperlukan adanya pengembangan bahan alam yang penggunaannya relatif lebih aman⁽¹⁴⁾. Sampai saat ini, belum ada penelitian mengenai aktivitas antiagregasi platelet pada *Sargassum polycystum* yang berasal dari Garut.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk membuat ekstrak *Sargassum polycystum* yang telah dihidrolisis oleh enzim sellulase dan dibentuk nanopartikel lalu diuji aktivitasnya sebagai antiagregasi platelet secara *in-vitro*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rumput laut coklat (*Sargassum polycystum*) Garut, Jawa Barat, etanol 80%, kalsium klorida, air murni, asam asetat glasial, kitosan, natrium tripolifosfat, baku standar fukoidan, kalium bromida, KitADP (Adenosine Diphosphate), PRP (Platelet Rich Plasma), PPP (Platelet Poor Plasma), Enzim Sellulase, Dapar pH 5,5, Natrium Klorida 0,9%.

Alat. Timbangan analitik, pH meter, blender, alat-alat gelas, termometer, pengayak 4/18, masetor kinetik, magnetic stirrer-heater, botol vial, kertas saring, kertas whatman no. 1, lemari es, rotavapor vakum, *water bath*, mikroskop elektron transmisi, *particle size analyzer*, *zeta analyzer*, *freeze dryer*, kuvet spektrofotometer, mikropipet, vortex, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800).

METODE. Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat yang Mengandung Fukoidan. Rumput laut coklat diblender lalu dimaserasi kinetik dengan etanol 80% (*pretreatment*) selama 2x12 jam pada suhu ruang AC (20 °C), dibiarkan semalaman. Ekstrak etanol disaring, dibilas dengan etanol lalu diambil residunya. Residu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. 300 g residu dimaserasi kinetik dengan 3 L CaCl₂ 2% (w/v) pada suhu 70 °C selama 6 jam, lalu disaring. Filtrat diambil dan dipekatkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental, lalu dikeringkan dengan metode *freeze dry* sehingga diperoleh ekstrak kering rumput laut coklat.

Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat yang Telah Dihidrolisis Enzim Sellulase. Sebanyak 2 g ekstrak kering rumput laut coklat dilarutkan dalam larutan pH 5.5 asetat 0.02M hingga 100 mL. Kemudian ditambahkan 25 µL enzim (konsentrasi 110 Ui) dan dikocok hingga terdispersi merata. Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Hasil yang

diperoleh disentrifugasi, diambil supernatant.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat. Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat dibuat dengan konsentrasi kitosan: ekstrak sebesar 20:20 mL.

Karakterisasi Fukoidan secara Kualitatif dengan Metode FTIR. Sebanyak 1 mg digerus dengan 200 mg kalium bromide sampai homogen. Selanjutnya serbuk sampel dibuat tablet tipis dan transparan pada tekanan 7000 Pa, lalu dimasukkan ke dalam *simple pan* untuk dibuat rekaman spektrum infra merah pada bilangan gelombang 4000-500 cm^{-1} . Digunakan untuk menentukan gugus fungsional dalam ekstrak rumput laut coklat dan dibandingkan dengan spektrum dari baku pembanding fukoidan berdasarkan sidik jarinya.

Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat Hasil Hidrolisis Enzim Sellulase. Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat yang telah dihidrolisis dengan enzim sellulase dikarakterisasi ukuran partikel, zeta potensial dan bentuk morfologinya dengan metode TEM.

Uji Aktivitas Antiagregasi Platelet secara In-Vitro. Pengujian dilakukan berdasarkan metode LTA yang sudah dimodifikasi. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis dan diukur pada panjang gelombang 600 nm. Sampel yang diuji adalah ekstrak rumput laut coklat sebelum hidrolisis enzim, ekstrak sesudah hidrolisis enzim, dan nanopartikel ekstrak sesudah hidrolisis enzim.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat Hasil Hidrolisis Enzim. Ukuran Partikel. Berdasarkan hasil pengukuran ukuran partikel, diperoleh ukuran nanopartikel sebesar 552,8 nm. Hasil pemeriksaan ukuran partikel telah memenuhi syarat, dimana suatu partikel dikatakan berukuran nano apabila berada dalam rentang 10-1000 nm.

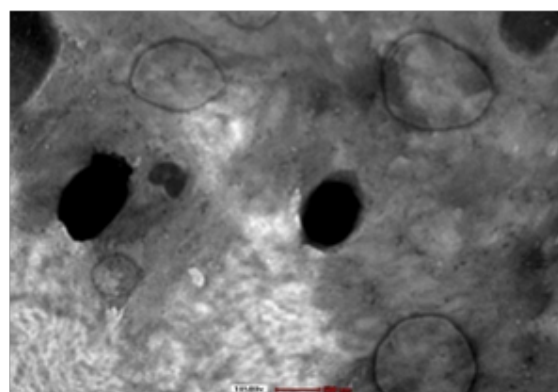
Dari hasil pengukuran zeta potensial menggunakan alat *Zeta Analyzer*, diperoleh nilai zeta potensial sebesar +53.5 mV. Hasil ini memenuhi syarat dimana partikel dalam nanosuspensi dikatakan terdistribusi dengan baik dan terhindar dari kecenderungan untuk beragregasi jika memiliki nilai diatas (+/-) 30 mV.

Berdasarkan hasil pemeriksaan morfologi nanopartikel dengan metode *Transmission Electron Microscopy* (TEM) pada perbesaran 18500x dengan ukuran partikel sebesar 500 nm. Dari hasil pengujian TEM didapatkan hasil morfologi berbentuk sferis atau bulat, namun terdapat pula partikel yang berbentuk amorf. Bentuk sferis yang dihasilkan menunjukkan

terjadi reaksi antara kitosan dengan ekstrak dimana kitosan yang digunakan akan menghasilkan morfologi partikel berupa lembaran membran. Namun bentuk amorf yang diperoleh dapat disebabkan karena pengadukan (*stirring*) yang kurang optimal sehingga nanopartikel belum homogen sempurna. Hasil karakterisasi nanopartikel ekstrak rumput laut coklat diperlihatkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan ukuran partikel dan zeta potensial dari nanopartikel ekstrak.

Karakterisasi nanopartikel	Hasil
Ukuran partikel	552,8 nm
Zeta potensial	+53.5 mv
Morfologi partikel	Sferis



Gambar 1. Hasil pemeriksaan morfologi nanopartikel dengan TEM.

Hasil Pengujian Karakterisasi Fukoidan secara Kualitatif dengan Metode FTIR. Berdasarkan hasil pengujian analisis gugus fungsi dengan FTIR, dapat disimpulkan bahwa ekstrak rumput laut coklat, ekstrak setelah hidrolisis dengan enzim selulase, serta nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis diduga mengandung komponen dari senyawa fukoidan dengan adanya gugus sulfat. Kemudian, dapat disimpulkan pula bahwa hidrolisis ekstrak rumput laut coklat dengan enzim selulase serta pembuatan nanopartikel ekstrak tidak mempengaruhi struktur kimia ekstrak rumput laut coklat. (Tabel 2)

Hasil Uji Aktivitas Antiagregasi Platelet. Berdasarkan pengukuran persentase penghambatan agregasi platelet, diperoleh hasil bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak baik ekstrak kering, ekstrak setelah hidrolisis enzim, maupun nanopartikel ekstrak, maka semakin tinggi aktivitas penghambatan agregasi platelet.

Selain itu, ekstrak yang telah dihidrolisis enzim dalam bentuk nanopartikel memiliki rata-rata persentase penghambatan agregasi platelet yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut

coklat baik sebelum maupun sesudah dihidrolisis. Hal ini dapat disebabkan karena dalam bentuk nanopartikel, partikel obat memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dengan luas permukaan yang besar sehingga lebih mudah berdifusi ke dalam membran pembuluh darah dan memiliki aktivitas penghambatan agregasi platelet yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun setelah dihidrolisis enzim.

Hasil penghambatan agregasi platelet diperoleh dengan membandingkan serapan sampel dengan serapan dari kontrol negatif. Pada penelitian, digunakan kontrol positif berupa klopidothrombin. Klopidothrombin digunakan sebagai kontrol positif dikarenakan klopidothrombin merupakan golongan obat antiplatelet yang memiliki kemampuan untuk

menghambat agregasi platelet yaitu sebagai antagonis reseptor ADP. Dari hasil penelitian, diperoleh penghambatan agregasi platelet pada kontrol positif sebesar 83,08%.

Hasil uji statistik menunjukkan ada perbedaan bermakna terhadap persentase penghambatan agregasi platelet dari ekstrak kering rumput laut coklat, ekstrak yang telah dihidrolisis enzim dan nanopartikel ekstrak. Setelah uji statistik dilanjutkan dengan *post hoc tests* diperoleh hasil ada perbedaan bermakna terhadap persentase penghambatan agregasi platelet dari ekstrak kering rumput laut coklat dengan ekstrak hasil hidrolisis, ekstrak kering rumput laut coklat dengan nanopartikel ekstrak dan ekstrak hasil hidrolisis dengan nanopartikel ekstrak. Hasil uji aktivitas antiagregasi platelet diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 2. Hasil pengujian karakterisasi fukoidan secara kualitatif dengan metode FTIR.

BP fukoidan	Bilangan gelombang spesifik (cm ⁻¹)			Bilangan gelombang acuan (cm ⁻¹)	Indikasi gugus/struktur
	Ekstrak	Ekstrak hidrolisis	Nanopartikel ekstrak		
3410,85	3369,61	3397,28	3334,56	3400-an	Hidroksil/ O-H
1633,79	1626,55	1633,82	1620,91	1820-1600	Gugus karbonil/ C=O
1225,57	1236,58	1227,09	1255,07	1260-1240	Ester sulfat/ ikatan S=O
1015,54	1088,61	1116,25	-	1080-1010	Ikatan glikosidik
827,54	-	-	-	810-840	Ikatan C-O-S

Tabel 3. Hasil uji antiagregasi platelet secara *in-vitro*.

Ekstrak / Konsentrasi	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
Ekstrak	13,76%	18,45%	22,19%
E. Hidrolisis	44,83%	53,70 %	57,94%
E. Nano	64,86%	70,66%	72,93%

SIMPULAN

Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat yang dibuat dengan metode gelas ionik memenuhi persyaratan mutu fisik nanopartikel yaitu rata-rata pengukuran ukuran partikel ekstrak rumput laut coklat adalah 552,8 nm dengan indeks polidispersi 0,569, nilai hasil pengukuran zeta potensial 53,5 mV, dan morfologi partikel berbentuk sferis.

Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat hasil hidrolisis enzim selulase memiliki aktivitas penghambatan agregasi platelet sebesar 72,93% yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut coklat baik yang telah dihidrolisis enzim selulase sebesar 57,94% maupun yang tidak dihidrolisis enzim selulase sebesar 22,19% pada konsentrasi 500 µg/mL dan lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol positif (klopidothrombin) sebesar 83,08%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Septiana AT, Asnani A. Kajian sifat fisikokimia ekstrak rumput laut coklat *Sargassum duplicatum* menggunakan berbagai pelarut dan metode ekstraksi. Agrotek. 2016 Nov 9;6(1):22-8.
2. Sahri A. Mengenal potensi rumput laut: kajian pemanfaatan sumber daya rumput laut dari aspek industri dan kesehatan. Majalah Ilmiah Sultan Agung. 2018 Jun 2;44(118):95-116.
3. Pakidi CS, Suwoyo HS. Potensi Dan Pemanfaatan Bahan Aktif Alga Cokelat *Sargassum sp.* Octopus: Jurnal Ilmu Perikanan. 2017 Jun 30;6(1):551562.
4. Dewanto SM, Iskandar Y, Barliana MI. Potensi Rumput Laut Coklat Jenis *Sargassum duplicatum* yang berasal dari Perairan Menganti-Kebumen sebagai Antiagregasi Platelet. Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran. 2011
5. Sinurat E, Marraskuranto E. Fucooidan from brown seaweed and its bioactivity. Squalen Bulletin of Marine

- and Fisheries Postharvest and Biotechnology. 2013 May 8;7(3):131-8.
6. Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, Rajasekar P, Prabhu NM. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. International journal of biological macromolecules. 2017 Sep 1;102:405-12.
 7. Thuy TT, Van TT, Hidekazu Y, Hiroshi U. Fucoidan from Vietnam *Sargassum swartzii*: Isolation, Characterization and Complexation with Bovine Serum Albumin. Asian Journal of Chemistry. 2012 Aug 1;24(8).
 8. Chollet L, Saboural P, Chauvierre C, Villemin JN, Letourneur D, Chaubet F. Fucoidans in nanomedicine. Marine drugs. 2016 Jul 29;14(8):145.
 9. Santoso, H. Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum polycystum*) Yang di Hidrolisis dengan Enzim Sellulase. 2018
 10. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2006;29(9):1790-8.
 11. Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. Marine drugs. 2011 Sep 30;9(10):1731-60.
 12. Martien R, Adhyatmika A, Irianto ID, Farida V, Sari DP. Perkembangan teknologi nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Majalah Farmaseutik. 2012;8(1):133-44.
 13. Cosemans JM, Angelillo-Scherrer A, Mattheij NJ, Heemskerk JW. The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. Cardiovascular research. 2013 May 10;99(2):342-52.
 14. Said KA. Penggunaan antiplatelet (aspirin) pada akut stroke iskemik. Co-ass Clinical at neurology departement dr. Zainoel Abidin Teaching Hospital, Faculty of Medicine University of Syiah Kuala. 2011;201.