PEMBERIAN DOSIS FUKOSANTIN YANG BERBEDA PADA PREADIPOSIT TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR: KAJIAN AWAL FUKOSANTIN SEBAGAI ANTIOBESITAS

LAPORAN SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh:

FADLILAH PURNA AGUSTIN

NIM. 0810830055

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

repository.ub.ac.id

PEMBERIAN DOSIS FUKOSANTIN YANG BERBEDA PADA PREADIPOSIT TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR: KAJIAN AWAL FUKOSANTIN SEBAGAI ANTIOBESITAS

LAPORAN SKRIPSI

PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Universitas Bawijaya

Oleh:

FADLILAH PURNA AGUSTIN

NIM. 0810830055

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PEMBERIAN DOSIS FUKOSANTIN YANG BERBEDA PADA PREADIPOSIT TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) STRAIN WISTAR: KAJIAN AWAL FUKOSANTIN SEBAGAI ANTIOBESITAS

Oleh:
FADLILAH PURNA AGUSTIN
NIM. 0810830055

Telah dipertahankan dihadapan penguji
Pada tanggal 10 Agustus 2012
Dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I	**Dosen Pembimbing I**
Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D	**Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MP**
NIP : 19640919 198903 1 002	**NIP : 1955050503 198503 2 001**
TANGGAL :	**TANGGAL**
Dosen Penguji II	**Dosen Pembimbing II**
Dr. Ir. Hardoko, MS	**Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih,MS**
NIP : 19620108 198802 1 001	**NIP : 19640726 198903 2 004**
TANGGAL :	**TANGGAL :**

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac

RINGKASAN

FADLILAH PURNA AGUSTIN. Laporan Skripsi dengan Judul "Pemberian Dosis Fukosantin Yang Berbeda Pada Preadiposit TikusPutih (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar: Kajian Awal Fukosantin Sebagai Asitas" (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)**

Obesitas merupakan masalah yang banyak terdapat di Negara maju dan berkembang, dimana obesitas merupakan factor penyebab terjadinya penyakit sindrom metabolic seperti hipertensi, diabetes tipe 2 dan dislipedimea. Adanya akumulasi lemak yang berlebih pada penderita obesitas menyebabkan disregulasi adipositokin pada WAT (*White adipose tissue*) sehingga terjadi obesitas dengan meningkatnya produksi proinflami (TNF-alfa) dan menurunnya anti-inflamasi (adiponektin) dengan kata lain obesitas merupakan inflamasi kronik tingkat rendah.

Fukosantin merupakan karotenoid yang banyak terdapat pada rumput laut coklat *Sargassum filipendula* yang mempunyai fungsi *nutraseutikal* sebagai antiobesitas. Adanya struktur aktif seperti ikatan alenik, epoksi dan hidroksil pada molekul fukosantin memungkinkan fukosantin untuk berperan sebagai antiobesitas. Kemampuan antiobesitas fukosantin ini ditunjukkan dengan kemmpuan fukosantin pada dosis yang tepat didalam mengatur regulasi ekspresi adipositokin pada WAT tikus strain wistar. Ekspresi adipositokin merupakan salah satu indicator terjadinya obesitas yang ditandi dengan adipositokin mengahasilkan TNF-alfa yang tinggi dan adiponektin yang rendah. Dengan adanya penelitian ini, dapat memberikan informasi mengenai mekanisme dan pengaruh dari dosis fukosantin yang berbeda didalam mengatur ekspresi adipositokin TNF- alfa dalam sel preadiposit WAT tikus. Berdasarkan penjelasan tersebut maka penelitian ini penting dilakukan sebagai salah satu alternative antiobesitas yang berasal dari hasil laut.

Penelitian ini dilaksakan di Laporatorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, dan Laboratorium Fisiologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2011 – Februari 2012. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Rancangan penelitian dengan Rancangan Acak Lengkap. Perlakukan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dosis fukosantin yang berbeda terhadap ekspresi TNF-alfa dalam kultur pradiposit sebagai antiobesitas. Metode analisa data untuk data parametric dengan menggunakan analisa ragam (ANOVA) yang dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Adapun parameter yang diamati diantaranya rendemen, kromatografi komo, KLT, pola spectra, dan ekspresi TNF-alfa dari kultur sel preadiposit.

Berdasarkan analisa ragam anova didapatkan hasil bahwa kadar fukosantin yang berbeda memiliki pengaruh yang nyata didalam menurunkan nilai TNF-alfa sebagai antiobesitas pada sel preadiposit tikus. Nilai masing-masing dosis fukosantin adalah, fukosantin 50 μM (120,056 ± 45,95), fukosantin dosis 100 μM (86,722 ± 28,39), dan fukosantin 150 μM (163,389 ± 7,51). Perlakuan yang terbaik didalam menurunkan nilai TNF-alfa terdapat pada dosis fukosantin dosis 100 μM (86,722 ± 28,39).

Perlakuan dosis terbaik didalam menurunkan ekspresi TNF-alfa pada penelitian ini didapat pada perlakuan fukosantin dosis 100 μM (86,722 ± 28,39), dimana TNF-alfa lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN i
RINGKASAN ii
KATA PENGANTAR iii
DAFTAR ISI iv
DAFTAR TABEL vi
DAFTAR GAMBAR vii
DAFTAR LAMPIRAN viii

1. PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Tujuan Penelitian 5
1.4 Kegunaan Penelitian 5
1.5 Hipotesis 5
1.6 Waktu dan Tempat 5

2. TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Rumput Laut Coklat 6
2.2 Fukosantin 7
2.3 Obesitas 8
2.3.1 Pengujian Obesitas Dengan Hewan Uji 10
2.3.2 Jaringan Adiposa 11
2.3.3 Sitokin 12
2.3.4 TNF-alfa 13
2.3.5 Kinerja Fukosantin Sebagai Anti Obesitas 15
2.4 Kultur Sel 15
2.4.1 Kultur Sel Preadiposit 17
2.4.2 Media Kultur 18
2.4.2.1 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium) 19
2.4.2.2 Penicilium Streptomisin 19
2.4.2.3 Natrium Bikarbonat 20
2.4.2.4 L-Glutamin 21
2.4.2.5 FBS (Fetal Bovine Serum) 21
2.5 Pengukuran Kadar TNF-α Melalui Metode ELISA 22

3. METODE PENELITIAN 24
3.1 Materi Penelitian. 24
3.1.1 Bahan Penelitian 24
3.1.2 Alat Penelitian 25
3.2 Metode Penelitian 26
3.3.1 Variabel 27

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.3.2 Rancangan Penelitian 27
3.3. Prosedur Penelitian 28
3.3.1 Pengisolasian Fukosantin 28
3.3.1.1 Persiapan Sampel 28
3.3.1.2 Penelitihan Tahap I Ekstraksi Pigmen Fukosantin 29
3.3.1.3 Isolasi Fukosantin 30
3.3.1.4 Kromatografi Lapis Tipis 32
3.3.5.3 Spektrofotometer UV-vis 32
3.3.2 Kultur Sel Preadiposit 33
3.3.2.1 Pembuatan Media Cair dan Media Kultur Lengkap 33
3.3.2.2 Pembuatan Kultur Sel Preadiposit 34
3.3.2.3 Pemanenan Sel dan Pemberian Perlakuan Fukosantin 36
3.3.2.4 Uji Fukosantin Terhadap Sel Preadiposit dengan ELISA 37

4. HASIL DAN PEMBAHASAN 46
4.1 Hasil Penelitian 46
4.2 Pembahasan 47
4.2.1 Isolasi Fukosantin 47
4.2.2 Maserasi, Fraksinasi, dan Kromatografi Kolom 47
4.2.3 Identifikasi Fukosantin dan Rendemen Fukosantin 48
4.2.4 Hasil Fukosantin Sebagai Antiobesitas 50
4.2.4.1 Kultur Sel Preadiposit 50
4.2.4.2 Perhitungan Nilai TNF-alfa dan Pengamatan Sel Preadiposit 51

5. KESIMPULAN DAN SARAN 59
5.1 Kesimpulan 59
5.2 Saran 59

DAFTAR PUSTAKA 60

LAMPIRAN 65

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Indeks Massa Tubuh Menurut WHO	9
2.	Obat-obat Antiobesitas yang Digunakan dan Disetujui oleh FDA	10
3.	Unit Eksperimen TNF-alfa	28
4.	Data Uji Identifikasi Pigmen Fukosantin	46
5.	Nilai TNF-alfa Pada Pengujian Anti Obesitas Fukosantin	46
6.	Nilai Rata - Rata TNF-α dan Notasi BNT	52

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. *Sargassum filipendula* 7
2. Struktur Kimia Fukosantin 14
3. Efek Sitokin TNF-alfa Pada Banyak Tempat 39
4. Ektrasi dan Fraksinasi Alga Coklat 40
5. Isolasi Fukosantin Dengan Kromatografi Kolom 41
6. Kromatografi Lapis Tipis 42
7. Prosedur Analisa Dengan Spektrofotometer UV-1601 43
8. Pembuatan Kultur Preadiposit 44
9. Pemanenan Sel Preadiposit 45
10. Uji Fukosantin Terhadap Sel Preadiposit dengan ELISA 48
11. Hasil KLT Pigmen Fukosantin 49
12. Pola Spektra Pigmen Fukosantin Hasil Isolasi Dalam Aseton 51
13. Perkembangan Sel Kultur Mulai Hari ke 0 Sampai Hari ke 7 52
14. Grafik Rerata Nilai TNF-alfa 54
15. Pengamatan Sel Preadiposit 54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir Prosedur Penelitian	65
2. Pembuatan Media Kultur dan Komposisi Media	66
3. Data dan Perhitungan Kadar Fukosantin	67
4. Data dan Perhitungan Rendemen Fukosantin	68
5. Pembuatan larutan	69
6. Data Kromatografi Kolom	70
7. Pembuatan Dosis Fukosantin Pada Pengujian Antiobesitas	72
8. Prosedur Isolasi Fukosantin	74
9. Hasil Fraksinasi dan Pigmen Fukosantin Hasil Isolasi Kromatografi	75
10. Isolasi Sel Preadiposit Tikus, Kultur Sel Preadiposit dan Pemanenan Sel	76
11. Analisis Data Nilai TNF-alfa	77
12. Glosarium	79

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obesitas adalah gangguan patologis tubuh yang ditandai dengan penimbunan lemak dalam tubuh. Hal tersebut dapat menimbulkan resiko timbulnya penyakit degeneratif, seperti; diabetes melitus, hipertensi, penyakit jantung, dan kanker. Penyakit tersebut secara ekonomis memerlukan biaya yang sangat tinggi dalam perawatannya dan tingkat keberhasilan penyembuhannya tidak besar (Hadi, 2005).

WHO menyatakan bahwa kegemukan telah menjadi penyakit epidemi yang menjangkiti seluruh penduduk dunia dan diperkirakan saat ini ada sekitar 100 juta orang mengalami kegemukan. Bila hal ini tidak dikendalikan diperkirakan tahun 2230 seluruh penduduk dunia mengalami kegemukan (Linna, *et al*., 2011). Data Riset Kesehatan Dasar (Riskerdas) tahun 2007 menunjukkan prevelansi obesitas di Indonesia pada penduduk usia lebih dari 15 tahun adalah 10,3 % (laki-laki 13,9 % dan perempuan 23,8 %), sedangkan pada anak-anak usia 6-14 tahun pada laki-laki 9,5% dan perempuan 6,4 % (Depkes, 2009). Dari data di atas dapat diketahui bahwa obesitas sudah menjadi permasalahan serius di negara berkembang khususnya Indonesia, bahkan obesitas saat ini sudah mulai terjadi pada anak-anak.

Ada beberapa cara yang dilakukan untuk mengatasi obesitas, sebagai contoh adalah terapi. Terapi obesitas yang berhasil adalah dengan penyertaan rencana diet, olah raga, modifikasi gaya hidup dengan atau tanpa terapi farmakologi dan/atau pembedahan. Selain itu mengatasi obesitas dapat mengunakan obat-obatan kimia. Obat kimia tidak benar-benar menyembuhkan namun hanya merawat saja, dalam artian hanya menekan nafsu makan yang timbul tanpa menjangkau penyebab dari penyakit tersebut. Lebih dari itu ada

banyak efek samping obat kimia yang mengintai dan akan terus betambah seiring bertambahnya obat yang dikonsumsi. Efek samping yang bisa ditimbulkan adalah iritasi lambung dan hati, kerusakan ginjal, serta berbagai komplikasi penyakit hingga menyebabkan kematian (BPOM, 2006).

Obesitas sebagai salah satu dampak kemajuan peradapan manusia, merupakan salah satu kelainan dari sindroma metabolik. Faktor utama yang menghubungkan obesitas dengan sindroma metabolik adalah disfungsi adiposit. Disfungsi adiposit yang dikenal dengan adiposopati ditandai perubahan sinyal transduksi sampai genetik adiposit yang menyebabkan perubahan kuantitas maupun kualitas sintesis adipositokin. Sebagai upaya dalam pengungkapan hal tersebut dapat dilakukan dengan jalan kultur sel preadiposit untuk mendapatkan objek utama adiposopati secara *in vitro* (Indra, *et al*., 2010).

Jaringan adiposa merupakan organ endokrin dinamik yang mensekresikan sitokin yang berkontribusi pada inflamasi sistemik dan vaskular, salah satunya adalah *tumor necrosis faktor-alpha* (TNF-α). Produksi sitokin tersebut akan meningkat pada kondisi obesitas. Penurunan massa lemak berkorelasi dengan penuruan konsenrasi sitokin proinflamasi tersebut. Peningkatan TNF- α dapat memicu inflamasi yang selanjutnya akan memicu resistensi insulin disfungsi endotel, dan akhirnya menimbulkan aterosklerosis (Lina, *et al*., 2011).

Kultur sel preadiposit pada sel lemak putih (*White adipose tissue*) tikus wistar merupakan metode pengujian obesitas secara *in vitro* yang banyak dilakukan. Hal ini dikarenakan terjadinya obesitas berkaitan dengan sel lemak putih (*White adipose tissue*), selain itu pada sel lemak putih (WAT) merupakan tempat terjadinya proses metabolik dan tempat penyimpanan lemak dalam tubuh (Indra, *et al*., 2010). Penggunan hewan uji tikus wistar dalam penelitian obesitas, dikarenakan tikus wistar memiliki kemiripan jaringan lemak putih dengan yang

dimilik oleh manusia, selain itu pemilihan hewan uji juga harus didasarkan pada patogenesis penyakit antara hewan uji dan dengan manusia mempunyai kesamaan (Nugroho, 2006).

Salah satu yang direkomendasikan para ahli untuk mengatasi masalah obesitas ini adalah fukosantin. Menurut Miyashita (2009), fukosantin adalah salah satu karotenoid yang ditemukan dalam rumput laut coklat. Bioaktif ini menunjukkan efek sebagai anti obesitas dalam mekanisme molekuler. Kajian nutrigenom yang dilakukan oleh Hasokawa *et al*., (2010), menunjukkan bahwa fukosantin merupakan senyawa karotenoid alam yang memiliki ikatan alenik, epoksi dan asetil dalam kerjanya mampu menekan terjadinya obesitas dengan cara mengatur regulasi perubahan produksi adipositokin yaitu sitokin proinflamasi TNF-α pada WAT dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi.

Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Hosokawa *et al*., (2010) tentang fukosantin sebagai antiobesitas yang salah satunya mengukur ekspresi TNF- α, dilakukan pada rumpu laut Alariaceae spesies *Undaria pinnatifida* yang hidup di daerah subtropis. Penelitian pemanfaatan fukosantin *Sargassum* yang hidup di laut tropis seperti di Indonesia khususnya jenis *Sargassum filipendula* belum banyak data pendukung. Oleh karena itu perlu adanya penelitian untuk melakukan pembuktian efektifitas fukosantin yang terkandung dalam *Sargassum filipendula* yang memiliki efek antiobesitas, sehingga dapat digunakan sebagai bahan alternatif dalam mencegah dan menanggulangi tingginya kasus obesitas dengan mengukur nilai TNF- α dalam kultur preadiposit pada tikus wistar.

1.2 Rumusan Masalah

Fukosantin adalah salah satu karotenoid yang ditemukan dalam rumput laut coklat. Bioaktif ini menunjukkan efek sebagai anti obesitas dimana pemanfaatan dari rumput laut coklat ini digunakan untuk kesehatan atau biasa disebut dengan nutraseutikal dalam mekanisme molekuler.

Kajian nutrigenom tentang peranan fukosanin sebagai antiobesitas yang dilakukan oleh Hasokawa *et al*., (2010), menunjukkan bahwa fukosantin jenis *Undaria pinnatifida* dalam kerjanya mampu menekan terjadinya obesitas dengan cara mengatur regulasi perubahan produksi adipositokin yaitu sitokin proinflamasi TNF-α pada *White Adipose Tissue* (WAT) dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi.

Permasalahan obesitas bukan hanya permasalahan kelebihan berat badan, tetapi lebih dari pada itu, obesitas merupakan masalah hormonal. Pada orang obesitas terjadi pembengkakan maupun penambahan jumlah sel adiposa. Hal tersebut menyebakan produksi sitokin pada WAT jaringan adiposa yang terdapat di tikus putih strain wistar akan meningkat. Salah satu sitokin proinflamasi yang sangat berpengaruh terhadap obesitas adalah *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF-α). Sitokin ini akan meningkat ekspresinya pada orang yang mengalami obesitas (Anggraeni, *et al*., 2009).

Saat ini penelitian fukosantin dari *Sargassum filipendula* yang telah diteliti diantarannya mengenai teknik isolasi fukosantin, identifikasi fukosantin, dan uji stabilitas fukosantin. Namun penelitian aplikasi serta kegunaan fukosantin dari *Sargassum filipendula* masih belum banyak untuk dikaji lebih dalam. Beranjak dari permasalahan ini maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi dan kegunaan fukosantin dari *Sargassum filipendula* sebagai antiobesitas (*invitro*) dengan menggunakan sel kultur preadipostit tikus putih strain wistar.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan dosis fukosantin terbaik dari rumput laut coklat (*Sargassum filipendula*) terhadap ekspresi TNF-α pada kultur sel preadiposit pada tikus putih strain wistar.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang fukosantin hasil isolasi pada spesies alga coklat khususnya *Sargassum filipendula* sebagai antiobesitas sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

1.5 Hipotesis

1. Diduga pemberian dosis fukosantin yang berbeda berpengaruh terhadap kemampuan antiobesitas, dengan menghambat ekspresi TNF-alfa pada kultur sel preadiposit tikus putih strain wistar.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai Februari 2012 di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya serta Laboratorium Fisiologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut Coklat

Rumput laut coklat *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Sargassum filipendula* (Zipcodezoo, 2010), adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Phaeophyta
Class	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: *Sargassum filipendula*

Gambar 1. *Sargassum filipendula* (Zipcodezoo, 2010)

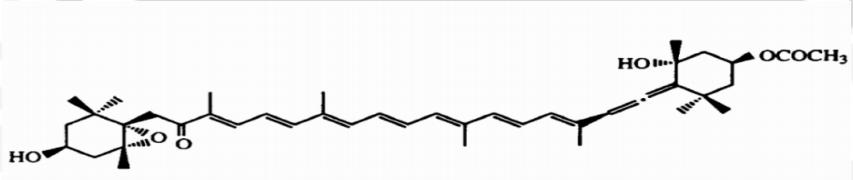
Kelompok algae coklat memiliki bentuk yang bervariasi tetapi hampir sebagian besar jenis-jenisnya berwarna coklat atau pirang. Warna tersebut tahan lama atau tidak berubah walaupun alga ini mati atau kekeringan (Atmaja, 2002). *Sargassum filipendula* memiliki thallus yang umumnya berbentuk silindris atau gepeng, percabangan rimbun, daun melebar, lonjong atau menyerupai pedang, mempunyai gelembung udara (*bleeder*) yang umumnya soliter, panjang dapat

mencapai tujuh meter dan warna thallus umumnya coklat. Umur tanaman lebih dari satu tahun (perenial), terutama pada bagian pangkal utamanya, sedang sebagian besar thalli dapat rontok atau terlepas secara musiman dalam satu tahun. Memiliki pigmen yang dominan yaitu fukosantin. Selain itu terdapat juga golongan klorofil dan karoten (Junianto, 2006).

Rumput laut coklat memiliki dinding sel yang terdiri atas selulosa dan polisakarida (Ensiklopedia, 2009). Menurut Eva (2008), rumput laut coklat mengandung cadangan makanan berupa laminarin, selulosa, alginat dan banyak mengandung iodium. Selain itu rumput laut coklat mengandung pigmen fotosintesis seperti klorofil a, c, dan kaya akan karotenoid khususnya fukosantin, beta karoten dan violasantin (Nurcahyanti dan Limantara, 2007).

2.2 Fukosantin

Fukosantin adalah karotenoid dalam lautan yang ditemukan pada lapisan rumput laut coklat. Di dalam Strukturnya, 5,6-epoksi-3'-etanoloksi-3,5'-dihidroksi-6',7'-dididehidro-6,6,7,8,5',6'-heksahidro-β,β-karoten-8, termasuk dalam gugus alenik, epoksi, dan residu asetil yang tentu saja berbeda dengan karotenoid yang lain seperti β-karoten dan lutein. Dalam alga coklat, fukosantin merupakan karotenoid utama karena kandungan fukosantin dapat mencapai lebih dari 50% dari total karotenoid. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa diet dengan konsumsi fukosantin akan mengurangi berat badan dalam WAT (White Adipose Tissue) dan akan meningkatkan hiperglikemia di dalam diabetic KK-A^y (Maeda, *et al.*, 2007). Struktur kimia fukosantin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia Fukosantin (Barrow dan Shahidi, 2008)

Menurut Miyashita (2009), fukosantin adalah salah satu karakteristik karotenoid yang ditemukan dalam rumput laut coklat, yang menunjukkan efek sebagai anti obesitas dalam mekanisme molekuler. Sedangkan menurut Orazio *et al.,* 2012), fukosantin juga berpotensi sebagai anti-inflamasi. Ditambahkan oleh Hasokawa *et al*., (2010), bahwa fukosantin yang merupakan senyawa karotenoid alam yang memiliki ikatan alenik, epoksi dan asetil mampu menekan terjadinya besitas serta diabetes dengan cara mengatur regulasi perubahan produksi adipositokin pada WAT dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi.

2.3 Obesitas

Obesitas adalah kondisi kelebihan berat tubuh akibat tertimbunnya lemak, untuk pria dan wanita masing-masing melebihi 20-25% dari berat tubuh (Rimbawan dan Siagian, 2004). Obesitas merupakan suatu kelainan kompleks pengaturan nafsu makan dan metabolisme energi yang dikendalikan oleh beberapa faktor biologik spesifik. Secara fisiologis, obesitas didefinisikan sebagai suatu keadaan dengan akumulasi lemak yang tidak normal atau berlebihan di jaringan adiposa sehingga dapat mengganggu kesehatan. Ditambahkan oleh Anggraeni *et al.,* (2009), obesitas merupakan keadaan patologis dimana terdapat penimbunan lemak lebih dari yang diperlukan oleh tubuh.

Menurut klasifikasi *World Health Organization* (WHO) dalam Mangoenprasodjo (2005), cara menentukan apakah seseorang termasuk obesitas ataupun tidak dapat dilakukan dengan cara menghitung *Body Mass Indeks (*BMI) atau biasa disebut Indeks Massa Tubuh (IMT) orang tersebut, yaitu dengan rumus :

$$\text{IMT} = \frac{\text{Berat Badan (kg)}}{\text{Tinggi Badan (m)}^2}$$

Kategori Indeks Massa Tubuh menurut WHO dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1.
Indeks Massa Tubuh Menurut *World Health Organization* (WHO)

Kategori	IMT (kg/m^2)	Resiko Penyakit Penyerta
Underweight	< 18,5	Rendah
Normal	18,5 - 24,9	Rata-rata
Overweight	25,0 - 29,0	Meningkat
Obesitas I	30,0 – 34,4	Sedang
Obesitas II	35,0 – 39,9	Parah
Obesitas III	40,0	Sangat Parah

Sumber: Mangoenprasodjo (2005)

Obesitas dianggap sebagai awal berbagai penyakit. Bersamaan dengan meningkatnya obesitas prevalensi diabetes tipe 2 juga meningkat tajam. Obesitas juga meningkatkan resiko kematian. Orang yang mempunyai berat badan 40% lebih berat dari berat rata-rata populasi mempunyai resiko kematian. Kenaikan mortalitas diantara penderita obesitas merupakan akibat dari beberapa penyakit yang mengancam kehidupan seperti diabetes tipe 2, jantung, dan kanker yang sensisitif terhadap prubahan hormon (Fidianingsih, 2009).

Obesitas dapat disebabkan oleh, antara lain: genetik, faktor metabolik/hormonal (*cushing's syndrome*, hipotiroidisme), faktor lingkungan (asupan makanan berlebih, makanan tinggi lemak, sosial), obat (misalnya steroid), psikologi (ada orang yang terus menerus makan di saat *stress*), dan tingkah laku (memiliki kebiasan mengemil). Obesitas dapat menurun dalam keluarga melalui gen-gen yang terlibat dalam proses pengeluaran dan pemasukan energi seperti leptin. Leptin merupakan hormon yang dapat menkan nafsu makan (Anggraeni, *et al*., 2009). Ditambahkan oleh Yun (2010), dalam

kajian biomolekuler menyatakan bahwa obesitas terjadi oleh adanya reaksi inflamasi (peradangan) pada adiposit (sel lemak). Reaksi ini melibatkan sitokin, sitokin terdiri dari adiponectin, IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, TGFβ, PAF-1 dan MCP-1.

Penanganan obesitas dapat dilakukan dengan jalan antara lain: 1) Diet rendah kalori, peningkatan aktivitas fisik dan modifikasi gaya hidup, 2) Farmakologi, 3) Terapi bedah, 4) Pencegahan dari penambahan berat badan melalui penyeimbangan energi. Khusus untuk terapi farmakologi obesitas menggunakan obat anti obesitas yang umumnya anoreksan atau penekan nafsu makan golongan simpatomimetik dan pemberiannya sementara. Obat ini dapat menimbulkan toleransi dan lama-lama efek obat ini akan berkurang. Obat-obat antiobesitas yang dapat digunakan dan disetujui oleh FDA hanyalah yang memenuhi *DEA schedule* III dan IV. *DEA schedule* ialah penggolongan obat berdasarkan potensinya untuk menimbulkan ketergantungan. Semakin rendah nilainya maka semakin bahaya untuk disalahgunakan. Daftar obat-obat antiobesitas yang disetujui FDA dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2.
Obat-obat Antiobesitas yang Digunakan dan Disetujui oleh FDA

Nama Generik	Nama Dagang	DEA *Schedule*	Disetujui
Orlistat	Xenical	Tidak ada	1999
Sibrutamin	Meridia	IV	1997
Dietilpropion	Tenuate	IV	1973
Fentermin	Adipex	IV	1973
Fendimetrazin	Bondril	III	1961
Benzfetamin	DIldrex	III	1960

Sumber : Purwono (2011)

2.3.1 Pengujian Obesitas Dengan Hewan Uji

Pada dasarnya tidak ada satu hewan pun yang sempurna untuk uji toksisitas akut yang nantinya akan digunakan oleh manusia. Walaupun tidak ada aturan tetap yang mengatur pemilihan spesies hewan coba, yang lazim digunakan pada uji toksisitas akut adalah tikus, mencit, marmut, kelinci, babi, anjing, monyet. Pada awalnya, pertimbangan dalam memilih hewan coba hanya berdasarkan avaibilitas, harga, dan kemudahan dalam perawatan. Namun, seiring perkembangan zaman tipe metabolisme, farmakokinetik, dan perbandingan catatan atau sejarah avaibilitas juga ikut dipertimbangkan. Hewan yang paling sering dipakai adalah mencit dengan mempertimbangkan faktor ukuran, kemudahan perawatan, harga, dan hasil yang cukup konsisten dan relevan (Sulastry, 2009).

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jenis kelamin jantan dipilih dalam penelitian antiobesitas, diantaranya a). hewan ini lebih besar dan lebih menguntungkan untuk jenis penelitian dalam hal pengambilan serum, atau jaringan plasma yang lebih banyak; b) aspek perilaku dan sisiologi pada tikus lebih relewan dengan manusia dan lebih mudah untuk diamati; c) tikus jantan lebih stabil karena memiliki hormon estrogen yang relatif berpengaruh pada masa-masa tertentu seperti siklus estrus, masa kehamilan dan menyusui sehingga berpengaruh pada kodisi psikologis hewan uji; d) tingkat stess tikus jantan lebih kecil dibandingkan tikus betina yang mungkin menggangu selama proses penguijian (Singagerda, 2009).

2.3.2 Jaringan Adiposa

Jaringan adiposa adalah suatu jaringan yang terdiri dari sel-sel lemak yang digunakan untuk menyimpan lemak tubuh. Secara morfologi, ada dua jenis jaringan adiposa, yaitu jaringan adiposa putih dan jaringan adiposa coklat.

Struktur jaringan adiposa coklat terdiri dari beberapa vakuola kecil dan mitikondria yang berkembang dengan baik. Sedangkan struktur jaringan adiposa putih terdiri dari satu vakuola lemak yang besar dan sedikit mitikondria. Jumlah dan distribusi setiap jaringan tergantung pada spesiesnya dan yang paling banyak dijumpai ialah jaringan adiposa putih (Agustina, *et al.,* 2007).

Adiposa memproduksi beberapa faktor yang berfungsi sebagai *feed back* signal dalam pengaturan metabolisme jaringan adiposa. Tidak diragukan lagi bahwa dengan perkembangan biologi molekuler faktor-faktor yang disekresi tersebut dapat diidentifikasi, yaitu Leptin, Resistin, adipsin, Asylation Stimulation Protein (ASP), Adpose Fatty Acid binding Protein, Agouti protin, dan steroid. Selain itu juga sel adiposa juga berperan sebagai tempat dihasilkan beberapa sitokin yang dominan dalam regulasi keseimbangan energi (Permana, 2009). Ditambahkan oleh Fidianingsih *et al.,* (2009), jaringan lemak juga merupakan organ endokrin penting karena memproduksi beberapa hormon atau protein yang dikenal sebagai sitokin antara lain : adiponektin, adipsin, leptin, angiotensinogen, resistin, TNF alfa dan interleukin-6.

Menurut Linna *et al.,* (2011), pada penderita obesita fungsi jaringan adiposa yang merupakan organ endokrin dinamik yang mensekresikan adipokin yang berkontribusi pada inflamasi sistemik dan vaskular, salah satunya adalah tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). Produksi sitokin tersebut meningkat pada kondisi obesitas. *Visceral fat* lebih aktif menghasilkan sitokin tersebut dibandingkan jaringan adiposa subkutan. Penurunan massa lemak berkorelasi dengan penurunan konsentrasi serum sitokin proinflamasi tersebut. Peningkatan TNF-α dapat memicu inflamasi yang selanjutnya korelasi antara Adiponektin dengan Tumor Necrosis Factor Alpha akan memicu resistensi insulin dan disfungsi endotel, dan akhirnya menimbulkan aterosklerosis.

2.3.3 Sitokin

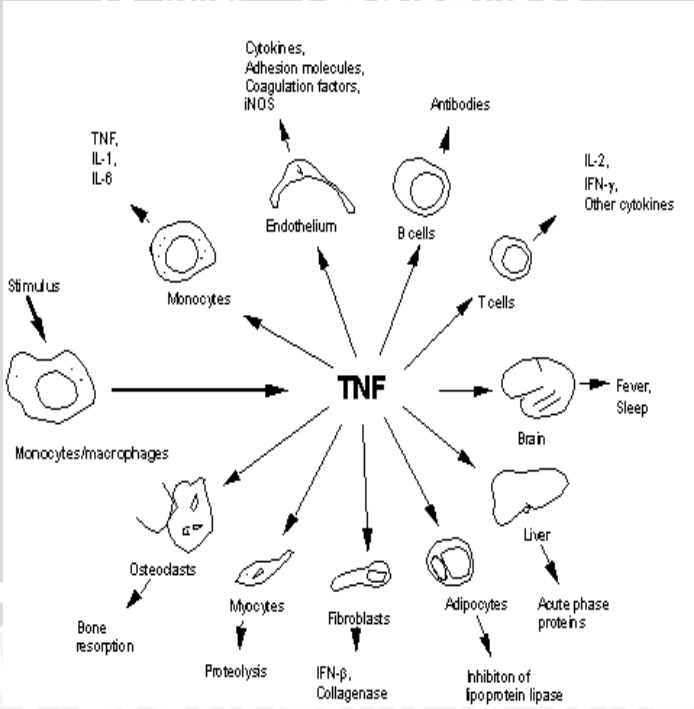
Sitokin merupakan protein-protein kecil sebagai mediator dan pengatur immunitas dan inflamasi. Sitokin adalah salah satu dari sejumlah zat yang disekresikan oleh sel-sel tertentu dari sistem kekebalan tubuh yang membawa sinyal antara sel-sel lokal, dan dengan demikian memiliki efek pada sel-sel lain. Sitokin dihasilkan sebagai respon terhadap stimulus sistem imun. Sitokin bekerja dengan mengikat reseptor-reseptor membran spesifik, yang kemudian membawa sinyal ke sel melalui *secod messenger* (tirosin kinase), untuk mengubah aktivitasnya (ekspresi gen) (Triskayani, 2010).

Menurut Hosokawa *et al*., (2010) dan Sulistyoningrum (2010), terjadinya diabetes dan obesitas berhubungan dengan adanya inflamasi yang disebabkan oleh beberapa sitokin proinflamasi dimana hal ini akan menyebabkan akumulasi jaringan lemak pada penderita obesitas diantaranya TNF%α, IL%6 (Interleukin%6), resistin, leptin, adiponectin, MCP%1 (Monocyte Chemoattractant Protein % 1), PAI%1 (Plasminogen Activator Inhibitor%1), dan angiotensinogen yang bertanggung jawab pada kondisi inflamatorik subakut pada obesitas.

Pada penderita obesitas non diabetes sitokin yang paling banyak berperan didalamnya dan mempunyai hubungan korelasi negatif diantaranya yaitu TNF – alfa dan adiponektin dimana pada penderita obesitas akan menyebabkan TNF-alfa meningkat sedangkan Adiponektin akan menurun. Pada kondisi obesitas, peningkatan TNF-α dan adipositokin lain akan memberikan umpan balik negatif terhadap produksi adiponektin sehingga terjadi penurunan konsentrasi adiponektin (Linna, *et al*, 2011).

2.3.4 TNF-alfa

Tumor nekrosis faktor alpha (TNF-α) merupakan komponen sitokin utama yang berperan dalam proses imunomodulator dan respon inflamasi, yang disekresikan oleh makrofag dan sel adiposa. Salah satu terget utama TNF- α adalah sel adiposa, yaitu terjadi inhibisi terhadap proses transkripsi beberapa gen dan aktivasi ekspresi gen lainnya. Peningkatan kadar TNF- α dijumpai pada hewan dan manusia yang menunjukkan gejala obesitas, dan juga pada individu yang memiliki resistensi insulin. Pada kasus resistensi insulin, TNF-α menghambat terjadinya signaling reseptor insulin pada jaringan adiposa melalui reseptor TNF- α (Permana, 2009). Efek sitokin TNF terhadap banyak tempat dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Efek Sitokin TNF Terhadap Banyak Tempat (Sethi, 1999)

TNF-alfa telah diteliti pada binatang dan manusia yang gemuk kadarnya meningkat. Kadarnya yang meningkat juga dihubungkan dengan penghambatan produksi adiponektin oleh adiposit, perangsangan TGF beta, peningkatan PAI-1, menekan oksidasi asam lemak pada hepar, peningkatan sintesis asam lemak dan kolesterol oleh sel hepar, menginduksi resistensi insulin dengan merangsang serin fosforilase dari reseptor insulin substrart-1 (IRS-1) dengan menggagalkan pengenalan insulin. Sebaliknya penurunan TNF alfa akan meyebabkan penurunan berat badan, dan pemberian anti TNF, meningkatkan sensitifitas insulin (Kersshaw dan Flier, 2004).

TNF alfa merupakan sitokin mutipotensial dengan beberapa fungsi imunologis. Pada 1993, TNF alfa merupakan produk pertama jaringan adiposa yang mempunyai hubungan molekuler antara obesitas dan resistensi insulin, serta pda kenyataannya pemberian TNF alfa meningkatkan resistensi insulin pada tikus. Bebarapa laporan menyataka efek TNF alfa pada obesitas berkaitan dengan resistensi insulin, peningkatan asam lemak bebas oleh adiposit, penurunan sintesis adiponektin, dan gangguan sinyal insulin. Pada jaringan adiposa, TNF alfa mengatur sekresi asam lemak bebas dari adiposit (Ninghayu, 2008).

2.3.5 Kinerja Fukosantin Sebagai Anti Obesitas

Fukosantin yang merupakan senyawa karotenoid alam yang memiliki gugus alenik, epoksi dan asetil mampu menekan terjadinya obesitas serta diabetes dengan cara mengatur regulasi perubahan produksi adipositokin pada WAT dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi. Berdasarkan penenlitian Hasokawa *et al.,* (2010) didapatkan hasil bahwa kemampuan fukosanti didalam meregulasi / mengatur pro-inflamasi adipositokin seperti TNF-

alfa, MCP-1, dan IL-6 pada WAT dengan cara mertindak langsung menekan terjadinya infitrasi makrofage di WAT sehingga menuruntkan regulasi ekspresi mRNA (adipositokin).

Fukosantin mampu mengambat ekspresi mRNA (adipositokin) dengan cara menghambat regulasi enzim COX-2 penghasil PGE_2 serta kemampuan anti radikal bebas fukosanti didalam menghabat Nitite Okside (NO) yang diproduksi oleh enzim iNOS. Kemampuan fukosantin didalam menghambat NO dan PGE_2 menyebabkan fukosantin berfungsi sebagai antiobesitas (Jaswir dan Mansur, 2011). Ditambahkan oleh Maeda *et al.,* (2007) kemampuan fukosantin sebagai antiobesitas pada pengujian secara kultur sel pada sel 3T3-L1, dikarenakan fukosantin mampu menghambat terjadinya diferensiasi sel preadiposit menjadi adiposit penyebab pembesaran sel lemak pada jaringan adiposa.

2.4 Kultur Sel Tikus Strain Wistar

Kultur sel ialah suatu proses dimana suatu sel dari suatu jaringan diambil dan ditumbuhkan pada kondisi terkontrol aseptik. Kultur sel juga dapat berarti sutu koloni sel yang mapan, sehingga mampu melakukan proliferasi tanpa batas waktu. Koloni sel tersebut dapat bermutasi menjadi koloni dengan kultur berbeda, atau merupakan sub-kultur hasil mutasi dari kultur sebelumnya.Sel yang dikultur akan tumbuh dan bertambah banyak dalam kondisi *in vitro*. Sel yang ditumbuhkan secara *in vitro* tidak akan memiliki fungsi *in vivo* (Wikipedia, 2011[a]).

Menurut Indra *et al*., (2010) ada dua macam kultur sel untuk pengkajian regulasi metabolisme adipsoit jangka panjang yaitu :

a. Kultur organ merupakan istilah untuk jaringan lemak di organ tubuh, atau penanaman jaringan lemak dari organ tubuh pada medium yang mengandung nutrisi dan elektrolit (glukosa, asam amino, vitamin, dan

mineral) pada pH 7,4.pada medium dapat ditambahkan suplemen serum, tetapi tidak selalu. Yang harus diperhatikan adalah pemeliharaan ekspresi gen dan fungsi adiposit dalam kultur sampai 2 minggu. Pada umumnya sel lemak yang diisolasi dri jaringan lemak dalam kultur masih mampu merespon hormon, sehingga memungkinkan pengkajian efek hormon (insulin atau hormon pertumbuhan) pada adiposit.

b. Kultur primer adiposit adalah kultur adiposit yang diisolasi dari jaringan lemak menggunakan kolagenase. Kelebihan kultur ini dibanding kultur organ adalah hanya adiposit saja yang da di medium kultur. Kultur primer adiposit berbeda dengan kultur primer adiposit yang baru berdiferensiasi dari sel prekursor stroma. Adiposit muda in pada umumnya multilokular dan monolayer dan ada beberapa petanda sel yang belum berdiferensiasi sempurn. Dengan demikian keuntungan utama dari kultur primer dari isolasi jaringan lemak adalah peluang untuk pengkajian adiposit yang *fully differentiated* dan unilokular dari jaringa lemak hewan dan manusia.

Kultur primer yaitu menumbuhkan kembali sel dari sel yang berasal dari jaringan hewan secara langsung (Butler, 2004). Sel kultur primer adalah sel yang diperoleh dari suspensi sel yang pertama kali dikultur. Kultur sel membutuhkan sel untuk dapat ditumbuhkan. Sel didapatkan dari jaringan yang diisolasi kemudian dilakukan pemisahan jaringan untuk mendapatkan sel yang terpisah-pisah. Biasannya pemisahan jaringan untuk mendapatkan sel menggunakan enzim tripsin atau kolagenase. Kelangsungan hidup sel dapat ditingkatkan dengan ,melakukakn coating substrat untuk meningkatkan daya lekat sel ke substrat menggunakan gelatin, kolagen, laminin, atau *fibronectin* (Freshney, 2006).

2.4.1 Kultur Sel Preadiposit

Kultur sel preadiposit merupakan model yang bermanfaat untuk mengkaji pertumbuhan adiposit *in vitro*. Diantara beberapa model, *preadipocyte clonal line* dari beberapa sumber dan kultur primer *fibroblast-like adiposeprecursor cell* yang didapat dari fraksi stromal-vaskular jaringan lemak. Preadiposit ini dapat diislasi dari beberapa depo jaringan lemak berbaga spesies termasuk manusia. Keterlaksanaan model-model kultur ini membuka peluang kemajuan dalam karakterisasi tahap-tahap utama diferensiasi dari preadiposit ke adiposit dalam hal: (1) menjelaskan ekspresi marker spesifik, kloning beberapa marker dan (2) mengkaji kontrol hormonal serta (3) pembuktian adannya zat baru yang disekresikan adiposit (Indra, *et al.*, 2010).

Pada penderita obesitas pertumbuhan jaringan adiposa sangat terkait dengan mekanisme proliferasi dan diferensiasi sel preadiposit menjadi adiposit matang. Ada tiga macam molekul yang sangat berperan pada diferensiasi preadiposit yaitu CCAAT-*enhancer binding protein* (C/EBP), *peroxisome proliferator actived receptor (*PPAR) dan sterol regulated element regulated protein (SREBP), dengan adanya diferensiasi sel maka ketiga molekul diatas akan mengaktifkan gen untuk mengaktivasikan sintesis beberapa protein proinflamasi (leptin, resistin, TNF alfa. IL-6, PAI-1 dan antiiflamasi (adiponektin). (Ratnawati, *et al*., (2010). Oleh karena itu kultur sel preadiposit banyak digunakan didalam penelitian pada penyakit sindrom metabolik hal ini berkaitan dengan diferensiasi sel yang terjadi pada penyakit diabetes dan obesitas.

2.4.2 Media Kultur

Istilah *complete medium* merupakan medium yang mengandung semua unsur pokok dan telah ditambahkan suplemen yang cukup seseui satndar yang ditetapkan seperti glutamin, serum, *growth factor*, dan hormon. Serum mengandung *growth factor* yang meningkatkan proliferasi sel dan juga faktor

adhesi dan aktivitas antiripsin yang mengandung perlekatan sel. Serum juga mengandung mineral, lipid, hormon, dan *fetal bovin serum* (FBS) merupakan serum yang paling banyak digunakan akhir-akhir ini, terutama untuk *cell line* dan kloning. Antibiotik dapat ditambahkan pada medium kultur untuk mencegah kontaminasi (Freshney, 2005).

Media untuk perkembangan sel mengandung nutrisi yang tinggi tidak hanya bagi sel hewan tetapi bakteri dan fungi. Kebanyakan mikroorganisme ini memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat diandigkan sel kultur dan terkadag menghasilkan toksin yang dapat mematikan sel. Cara terbaik untuk mencegah kontaminasi pada media kultur adalah dengan menerapakn tektik aseptis. Untuk mencegah kontaminasi maka peralatan untuk kultur, operator, ruangan kultur, dan bahanbahan untuk kultur harus steril. Regen liquid untuk kultur sel disterilisasi dengan teknik filtrasi untuk menyaring bakteri menggunakan membran filter berukuran 0,22 µm (Murtisari, 2011).

2.4.2.1 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) merupakan pengembangan dari *Eagle's Basal Mdium* (BME) dengan meningkatkan konsentrasi baha penyusunnya. DMEM menandung konsentrasi amino 2 kali lipat dan vitamin 4 kali lipat lebih banyak daripada MEM. Kandungan unsur pokok yang lebih baik ini menyebabkan DMEM menajdi medium yang biasa dipakai untuk kultur sel. Media DMEM sangat cocok digunakan dalam berbagai kultur sel termasuk sel-sl yang berasal dari manusia, monyet, hamster, tikus, mencit, ayam, dan ikan (Riyakumala, 2010).

DMEM merupakan medium basal yang terdiri dari vitamin, asam amino, garam, glukosa, dan pH indikator. Namun media ini tida mengandung protein atau agen penumbuh. Media ini membutuhkan suplementasi untuk menjadi medium yang lengkap. Umumnya media ini disuplementasi dengan 5-10% Fetal

Bovine Serum (FBS). Selain itu, DMEM juga membentuk system buffer sodium bicarbonate dan tentunnya membutuhkan tingkat karbon dioksida buatan untuk membuat pH tetap pada kisaran yang diinginkan (Wikipedia, 2011[b]), selain itu DMEM juga mengandung D-glukosa (dektrosa), L-glutamin, HEPES buffer, Hypoksantine garam monosodium, asam linoleat, asam lipoik, sodium piruvat, timidin, asam amino dan vitamin (Bio-Rad, 2012).

2.4.2.2 Penicilium Streptomisin

Penicilium Streptomisin adalah suatu antibiotik yang ditambahkan dalam media kultur yang berfungsi untuk membantu mencegah kontaminasi bakteri dan jamur tanpa membunuh sel kultur didalamnya Komposisi dari antibiotik tersebut adalah sodium klorida, *Penicillin G sodium*, dan *Streptomycin Sulfate*. Antibiotik ini dapat membunuh bakteri aerob, bakteri anaerob dan jamur. *Penicillin G* akan mengganggu tahap akhir dari sintesis dindin sel, sedagkan *Strepomycin Sulfate* akan berlekatan dengan subunit 30S menyebabkan salah pembacaan transkrip genetik. Keduannya merupakan antibiotik spektrum luas (dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif) (Anonymous, 2009[a]).

Ditambahkan oleh Nurcahyo (2011), *Penicilium Streptomisin* berfungsi untuk membunuh bakteri, mikroorganisme serta jamur yang tidak diinginkan dalam media penumbuhan. Dimana *Penicilium* termasuk antibiotik yang sering dipakai pada kultur jaringan hewan bersama dengan antibiotik lainnya seperti *gentamicin* dan Pen-Strep Solution. Pada kultur sel antibiotik mempunyai ciri-ciri: menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak inang (host), bersifat bakterisida dan bukan bakteriostatik, tidak menyebabkan resistensi pada kuman pathogen, berspektrum luas, tidak bersifat alergenik, tetap aktif dalam plasma, cairan badan atau eksudat, larut di dalam air serta stabil, tidak menggagu kesimbangan flora normal dari inang smpai flora usus atau flora kulit.

2.4.2.3 Natrium Bicarbonat

Natrium bikarbonat adalah suatu penyangga yang digunakan untuk menyetabilkan pH. Media tumbuh juga membutuhkan penyangga karena terjadinnya dua kondisi, yaitu pengunaan flast terbuka menyebabkan masuknya O_2 dan meningkatnya pH, dan konsentrasi sel yang tinggi menyebabkan diprosuksinya CO_2 dan asam laktat menyebabkan turunya pH. Kedua kondisi ini dihadapi dengan memberikan buffer natrium bikarbonat kedalam media kultur (Anonymous, 2010[b]).

Menurut Nurcahyo (2011), pada kultur sel memerlukan sodium / natrium bikarbonat berfungsi sebagai ion buffer untuk membantu mempertahankan pH pada medium kultur dengan keseimbangan antara bikarbonat terlarut dan konsentrasi CO_2. Dimana cara kerjanya dengan mengdisosiasi dalam larutan dan membebaskan karbondioksida ke atmosfir serta menghasilkan ion hidroksil di dalam medium. Agar sistem bufer ini dapat bekerja maka kultur dan mediumnya harus mendapatkan CO_2. Dengan demikian diperlukan inkubator yang dapat mempertahankan kadar CO_2 5 % di dalam udara CO_2 dapat disuplai dari gas CO_2 yang dihubungkan dengan CO_2 sensor ke dalam inkubator.

2.4.2.4 L-Glutamin

L-Glutamin merupakan suplemen asam amino untuk media kultur sel. L-Glutamin pada kultur sel dapat meningkatkan kelangsungan hidup sel dan pertumbuhan, berpotensi meningkatkan produktivitas sel, meningkatkan stabilitas media, meminimalkan amonia beracun, serta memaksimalkan kinerja sel. L-glutamin tidak stabil pada pH fisiologis dalam media cair. L-glutamin berasal dari penggunaan hidrolisat protein, terutama hidrolisat gluten (Anonymous, 2011[c]).

Glutamin mengandung satu atom nitrogen sebagai amida dan satu atom nitrogen lain sebagai amina. Glutamin adalah prekursor glutamat, asam amino dasar yang digunakan pada transaminasi ketoacids alfa membentuk alfa amino

lainnya. Ketika kadar glukosa rendah dan kebutuhan energi tinggi, sel dapat memetabolisme asam amino untuk energi. Glutamin adalah salah satu asam amino yang paling siap tersedia untuk digunakan sebagai sumber energi dan merupakan sumber utama energi bagi banyak jenis sel untuk dapat membelah cepat secara *in vitro* (Wikipedia, 2011[c]).

2.4.2.5 FBS (Fetal Bovine Serum)

Fetal bovine serum (FBS) adalah serum yang diperoleh dari janin sapi. Janin umumnya masih berumur 3 bulan pada saat penyembelihan (Jochems *et al*., 2003). Sapi bunting yang sedang dipotong diambil janinnya dan FBS dipanen melalui pembocoran jantungnya (Even, *et al*., 2006). Pengambilan FBS melalui pembocoran jantung dimaksudkan untuk mencegah kontaminasi dari mikroorganisme yang berasal dari janin itu sendiri dan lingkungan sekitar (Jochems, *et al*., 2003).

Penggunaan FBS sebagai suplemen kultur sel memiliki berbagai fungsi tertentu. Menurut Valk *et al*., (2004) terdapat 4 fungsi FBS dalam kultur sel. Pertama, sebagai hormon yang menstimulasi pertumbuhan sel dan proliferasi. Kedua, berperan dalam transpor protein, mineral, dan lemak. Ketiga, mengikat dan menyebarkan matriks ekstraselular. Keempat, sebagai penstabil pH dan penghambat protease secara langsung.

Dalam FBS terkandung protein (terbesar), hemoglobin, glukosa, insulin, kortison, hormon paratiroid (PTH), prostaglandin E (PGE), dan protein gen product (PGP) (Price and Gregory, 1982). Selain FBS, alternatif serum yang lain adalah serum manusia, albumin serum sapi, albumin manusiarekombinan, dan albumin manusia murni (Valk, *et al*., 2004). FBS paling banyak digunakan sebagai suplemen untuk kultur sel *in vitro*. Hal ini disebabkan karena FBS mengandung banyak faktor pertumbuhan serta

memungkinkan untuk fleksibilitas dalam banya aplikasi kultur sel yang berbeda (Wikipedia, 2011[d]).

2.6 Pengukuran Kadar TNF-α Melalui Metode ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

ELISA merupakan suatu teknik biokimia yang biasa digunakan dalam immunologi untuk mendeteksi keberadaan antibodi atau antigen dalam suatu sampel dalam jumlah yang sedikit. ELISA merupakan pengembangan dari teknik *Enzyme Immunoassay* (EIA) yang heterogen. Prinsip dasar ELISA menggunakan reaksi antigen-antibodi yang bersifat sangat spesifik dan sensitivitas tinggi, sehingga dapat memberikan hasil dengan nilai akurasi yang cukup tinggi (Arfianti, 2008).

Teknik pengujian ELISA menggunakan dua antibodi, satu antibodi spesifik terhadap antigen (capture antibody), dan satunya lagi adalah antibodi pendeteksi yang dapat bereaksi dengan kompleks antigen-antibodi, dan kemudian berpasangan dengan sebuah enzim. Antibodi yang kedua ini yang lebih dikenal dengan nama “enzyme-linked” dapat menimbulkan terbentuknya perubahan warna setelah ditambahkan substrat yang bersifat kromogen atau fluorogen yang mampu menghasilkan signal, dan dapat dibaca spektrofotometri (Mening, 2011).

Pada umumnya ELISA dibedakan menjadi dua jenis, yaitu *competitive assay* yang mnggunakan konjugat antigen-enzim atau konjugat antibodi-enzim, dan *non-competitive assay* yang menenggunakan dua antibodi.pada ELISA *non-competitive assay*, antibodi kedua akan dikonjugasikan dengan enzim sebagi indikator. Teknik kedua ini seringkali disebut sebagai “*Sandwich*” ELISA (Anonymous, 2011[d]).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan untuk isolasi fukosantin dan bahan untuk kultur sel preadiposit. Bahan untuk isolasi fukosantin meliputi bahan utama, bahan kimia dan bahan penunjang. Bahan utama yang digunakan adalah *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari Desa Padike, Kecamatan Talango, Sumenep Madura. Rumput laut yang didapat kemudian dicuci dengan air bersih, dan selanjutnya ditempatkan dalam *polyback* hitam dan dimasukkan ke dalam cool box berisi es selama perjalanan. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah metanol, aseton, dietil eter, etil asetat, *silica gel* tipe F-254, *sea sand* (pasir laut) etanol dan heksan. Bahan kimia ini memiliki *grade* pro analis (PA) dengan merk Merck dan diperoleh dari Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang. Selain itu juga digunakan bahan lain yaitu gas nitogen diperoleh dari Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Brawijaya Malang, alumunium foil, *cling wrap*, kertas saring, pelat KLT, kapas, aquades, air ledeng dan garam grosok.

Sedangkan bahan untuk kultur sel preadiposit meliputi bahan untuk kultur sel dan bahan untuk pengujian ELISA. Bahan untuk kultur sel meliputi tikus putih jantan strain wistar umur 1 bulan berasal dari koleksi Laboratorium Fisiologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, DMEM merk Gibco, Natrium bicarbonate (Na_2CO_3) merk Gibco, L-Glutamin merk Gibco, Pen-Strep merk Gibco, DPBS , collagen type I merk Gibco, NaOH 2M, HCL, Fetal Bovine Serum (FBS) merk Gibco, aquabides, alkohol 70%, fukosantin, quersetin, ketamin, larutan consolution, DMSO memiliki *grade* pro analis (PA) dengan merk Merck, dan trypsin EDTA merk Sigma. Sedangkan bahan untuk pengujian ELISA

meliputi antibodi primer TNF-α merk Santacruze, coating buffer, BSA merk Sigma, PBS, tween merk Biorat, antibodi sekunder (IgG Biotin) merk KPL, TMB merk KPL, HCl 1N, enzim SA-HRP merk KPL, alumunium foil, dan tissue.

3.1.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk isolasi fukosantin dan peralatan untuk kultur sel preadiposit. Untuk isolasi fukosantin peralatannya meliputi ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah gunting, nampan, timbangan digital, mortar, *beaker glass*, erlemeyer, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, spatula, *hot plate*, *magnetic stirrer*, corong kaca, corong pisah, *rotary vacuum evaporator* dan botol sampel. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah kolom kromatografi, statif, tabung reaksi, *beaker glass*, cawan petri, pinset, pipet serologis, corong pisah, dan spektrofotometer multispec-1601 UV Vis merek Shimadzu merupakan koleksi dari Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Brawijaya Malang.

Sedangkan peralatan untuk kultur sel preadiposit meliputi alat untuk kultur sel dan alat untuk pengujian ELISA. Alat untuk kultur sel meliputi Laminar Air Flow, inkubator CO_2 merk Binder, mikroskop inverter merk Olympus CKX41, syringe filter 0,2 mikron, cawan petri, tube 15 ml, spuit 10 ml, pipeting aid, kultur plate, TC Flast 25 kultur, bunsen, mikro pipet, blue tip, pinset, gunting bedah, pH meter merk WTW series inolab, water bath shaker merk WINA 605, timbangan Chyo dan sentrifuse merk WINA 501. Sedangkan alat untuk pengujian ELISA meliputi multichannel pipet, blue tip, yellow tip, white tip 20 µl, mikro pipet, vortex mixer merk Velp, tube, shaker elisa plate merk WINA tipe 207, elisa plate, dan elisa reader merk Awareness Tecnology INC. Seluruh peralatan untuk kultur sel

tersebut merupakan koleksi dari Laboratorium Fisiologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Eksperimen adalah mengadakan kegiatan percobaan untuk melihat sesuatu hasil. Hasil itu yang akan menegaskan bagaimana kedudukan hubungan kautsal antara variabel yang diselidiki (Surakhmad, 1998).

Penelitian ini melalui dua tahap. Tahap I adalah isolasi fukosantin yang meliputi, ekstraksi dan fraksinasi *Sargassum filipendula* sebanyak 100 grm menggunakan metode Pangestuti *et al.,* (2007) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009), dan selanjutnya dilakukan isolasi fukosantin kromatografi kolom dengan menggunakan metode Pangestuti *et al*., (2007). Isolat pigmen orange fukosantin hasil kolom selanjunya dilakukan pengujian KLT dengan metode Yan *et al.,* (1999) dan UV-vis dengan metode Jenie *et al.,* (1997) untuk memastikan pigmen yan didapat adalah fukosantin. Selanjutnya didapatkan fukosantin murni. Tahap II adalah kultur sel preadiposit yang meliputi, pembuatan kultur sel preadiposit dengan menggunakan metode dari Indra *et al.,* (2010), selanjutnya pemeliharaan sel kultur selama ± 1 minggu atau sampai sel lemak dalam kultur tumbuh besar, selanjutnya dilakukan pemanenan sel yang kemudian sel dipindahkan dalam kultur plate. Langkah selajutnya sel siap diberi perlakuan fukosantin dalam berbagai macam dosis. Kemudian dilakukan pengukuran ekspresi TNF-α *(Tumor Necrosis Faktor Alpha)* dengan menggunakan metode dari Indra *et al.,* (2010), yaitu metode ELISA *(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* dan selanjutnya didapatkan hasil.

3.2.1 Variabel

Penelitian ini menggunakan kultur preadiposit untuk mengetahui efek fukosantin. Variabel bebas dari pada penelitian ini adalah pemberian fukosantin dalam kultur preadiposit dengan dosis fukosantin yang berbeda-beda (50 μM, 100 μM, 150 μM) dan sebagai kontrol pembanding adalah quersetin dengan dosis 125 μM. Sedangkan variabel terikat yang digunakan adalah ekspresi TNF-alfa dalam kultur preadiposit yang telah diberi fukosantin. Penentuan dosis fukosantin ini berdasarkan pada penelitian antiobesitas senyawa quersetin dimana pada penelitian tersebut range kemampuan antiobesitas dari senyawa quersetien antara 50 μM – 125 μM (Ratnawati. *et al.*, 2010)

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial yang terdiri dari 1 faktor yaitu dosis fukosantin yang berbeda yang diberikan di dalam kultur sel preadiposit. Dilakukan tiga kali ulangan pada setiap perlakuan. Metode analisis yang digunakan adalah ragam (ANOVA: *Analysis of Variance*) yang dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Tingkat selang kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 persen (α = 5%). Unit eksperimen dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Unit eksperimen TNF alpha

DOSIS	ULANGAN		
	1	2	3
K	K1	K2	K3
Q	Q1	Q2	Q3
P1	P11	P12	P13
P2	P21	P22	P23
P3	P31	P32	P33

Keterangan:

Faktor : Dosis

K = kontrol (-), adiposit ditambah dengan DMSO 0,01%

Q = control (+), adiposit ditambah quersetin dosis 125 µM dalam DMSO 0,01%

P1 = adiposit ditambah fukosantin dosis 50 µM dalam DMSO 0,01%

P2 = adiposit ditambah fukosantin dosis 100 µM dalam DMSO 0,01%

P3 = adiposit ditambah fukosantin dosis 150 µM dalam DMSO 0,01%

3.3 Prosedur Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama adalah cara mengisolasi fukosantin dari rumput laut coklat (*Sargassum filipendula*) dan kedua adalah kultur sel preadiposit untuk mengetahui pengaruh pemberian dosis fukosantin yang berbeda dari rumput laut coklat (*Sargassum filipendula*) terhadap sel preadiposit. Adapun tahapan tersebut antara lain adalah

3.3.1 Pengisolasian Fukosantin

3.3.1.1 Persiapan Sampel

Sampel alga coklat dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran dan dibilas dengan air tawar untuk menghilangkan garam yang berasal dari air laut (lingkungan). Sampel alga coklat kemudian dikeringkan dengan menggunakan kain lap dan dimasukkan ke dalam plastik *polyback* hitam.

Selama dalam perjalanan, sampel disimpan dalam *cool box* yang berisi es. Setelah sampai kemudian sampel disimpan ke dalam *freezer.*

3.3.1.2 Penelitian Tahap I Ekstraksi Pigmen Fukosantin

Ekstraksi alga coklat dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti *et al.,* (2007) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009). Alga coklat yang sudah dibersihkan dengan air ledeng kemudian dikeringkan dengan kain yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air bahan.Selanjutnya rumput laut dipotong kecil – kecil yang bertujuan supaya rumput laut cepat kering dan juga bertujuan untuk memperluas permukaan bidang supaya pigmen terekstraksi dengan maksimal. Alga coklat tersebut ditimbang 100 gram dengan menggunakan timbangan digital. Kemudian rumput laut tersebut dihaluskan dengan mortar yang bertujuan untuk memperluas permukaan bidang.Lalu ditambah $CaCO_3$ ± 0,5 gr. Penambahan $CaCO_3$ ini bertujuan untuk menetralkan alga coklat agar tidak bersifat basa hal ini karena pigmen fukosantin yang terkandung didalamnya tidak tahan pada pH tertentu (basa).Kemudian diekstraksi dengan cara maserasi yaitu dengan cara perendaman menggunakan bahan kimia Metanol dan aseton dengan perbandingan (7:3) sebanyak 300 ml. Pada saat ekstraksi pertama dilakukan selama 2 jam, sedangkan ekstraksi ke 2 dan 3 masing-masing selama 30 menit pada suhu kamar. Adapun tujuan dari pemberian metanol yaitu agar pelarut bisa bercampur dengan air dan dapat melarutkan semua senyawa organik. Sedangkan aseton adalah untuk mengangkat pigmen polar (pelarut yang cocok untuk fukosantin). Sedangkan prinsip dari maserasi ini adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam atau memecah glukoprotein.

Tahapan selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring halus hingga mendapatkan filtrat. Filtrat selanjutnya dipartisi menggunakan dietil eter lalu ditambahkansaturasi garam dan air ledeng hingga terbentuk dua fase

(fase atas dan fase bawah). Partisi menggunakan dietil eter bertujuan agar semua pigmen terangkat ke fase atas dan fase bawah. Pelarut dietil eter yang bersifat non polar akan melarutkan sampel (pigmen) yang cenderung bersifat non polar walaupun tidak semua sampel (pigmen) yang terkandung didalamnya akan larut dalam dietil eter. Bahan organik yang larut dalam dietil eter akan berada di bagian atas corong pisah yang dinamakan fase atas. Sedangkan fase bawah merupakan bagian yang lebih bersifat polar oleh metanol, aseton, saturasi garam, air ledeng dan terdapat sedikit pigmen yang larut pada pelarut yang bersifat polar.

Perbandingan yang digunakan antara filtrat : dietil eter : saturasi garam : air ledeng dalam proses partisi ini adalah 50:25:60:5 ml. Fase yang diambil adalah fase atas karena mengandung banyak pigmen. Hasil dari fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari metanol dan aseton. Hasil dari fase atas selanjutnya di *rotary evaporator vacum* dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas nitrogen sampai kering sempurna, tujuan dari dikeringkan dengan nitrogen ini adalah menarik air dan pelarut yang ada pada ekstrak kasar. Ekstrak pigmen kering ditutup dengan *alumunium foil*yang bertujuan agar ekstrak pigmen kering terhindar dari pengaruh suhu, cahaya dan pH tertentu karena pigmen fukosantin labil terhadap suhu, cahaya dan pH tertentu kemudian disimpan dalam *freezer*. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 4.

3.3.1.3 Isolasi Fukosantin

Isolasi fukosantin dilakukan untuk mendapatkan fukosantin murni. Isolasi fukosantin dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel*. Fase gerak untuk isolasi fukosantin menggunakan heksan : etil asetat (8:2 v/v) (Yan,

et al (1997). *Silica gel* sebanyak 40 gram dilarutkan dalam fase gerak ± 150 ml dan distirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuannya adalah agar tidak ada lagi gelembung udara dalam *silica gel* dan *silica gel* tidak pecah ketika di dalam kolom hal ini bertujuan agar fase diam dapat berfungsi seperti yang diharapkan.

Tahap selanjutnya kolom dipasang pada statif dan dimasukkan sedikit fase gerak untuk membasahi kapas. Kapas tipis dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi, kemudian ditambahkan fase gerak sampai hampir penuh. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolomdengan bantuan corong pisah dan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di tengah tengah kolom. Timbunan bubur *silica gel* akan mencapai ¾ tinggi kolom. Selanjutnya ditambahkan *sea sand* (pasir laut) agar pelarut tidak mengenai *silica gel* dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Fukosantin kering dilarutkan dalam 5 ml fase gerak (heksan : etil asetat 8:2 v/v), kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Kran kolom yang berada di bawah dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya dimasukkan fase gerak sambil kran kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir terus menerus, sehingga perlu menambahkan fase gerak baru agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan untuk heksan : etil asetat 8:2v/v, 7:3 v/v. 6:4 v/v. Kemudian fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan tabung reaksi berdasarkan warnanya. Setiap fraksi dianalisis dengan menggunakan KLT. Prosedur Isolasi Fukosantin dapat dilihat pada Gambar 5.

3.3.1.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi pigmen berdasarkan totol warna yang terbentuk dan nilai Rf. Pada penelitian ini, fase diam yang digunakan *silica gel* F-254. Fase gerak untuk identifikasi fukosantin menggunakan heksan : aseton (7:3 v/v) (Yan, *et al*., 2008). Tujuan pengunaan fase gerak heksan dan aseton adalah untuk melarutkan senyawa yang tidak polar, polar maupun semi polar seperti fukosantin, sehingga senyawa tersebut dapat larut dan tertarik keatas sesuai tingkat kepolaranya.

Langkah pertama dalam KLT yaitu membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh oleh pelarut. Kemudian fraksi dari kolom yang ditampung dalam tabung reaksi diambil sebanyak 6 µl menggunakan pipet mikro dan ditotolkan pada pada pelat KLT sambil ditiup-tiup sesekali. Setelah bercak tersebut mengering, pelat dimasukkan dalam *beaker glass* yang berisi fase gerak sebanyak 5 ml dan kertas saring. Tujuan pemberian kertas saring adalah untuk mengetahui kehomogenan larutan didalam *beaker glass.* Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Selanjutnya diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat. Hasil totol pigmen yang terbentuk pada pelat diamati dan dihitung nilai Rf-nya (*retardation factor*). Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 6.

3.3.1.5 Spektrofotometer UV-vis

Spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi pigmen fukosantin murni yang diamati. Di dalam analisa kuantitatif dengan metode spektrofotometri, panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu, agar komponen yang dianalisa menyerap

sinar tersebut semaksimum mungkin. Spektrofotometer UV-VIS ini berfungsi untuk analisis kualitatif atas dasar spektrum dan analisis kuantitatif atas dasar serapan.

Metode spektrofotometri ini dilakukan untuk mengetahui pola spektra (serapan cahaya yang diabsorbsi) pigmen fukosantin murni yang terkandung dalam alga coklat . Fraksi hasil dari kromatrografi kolom dan KLT yang diyakini sebagai fukosantin yang dilihat berdasarkan warna dan nilai RF-nya. Kemudian fraksi yang diyakini sebagai fukosantin tersebut diuapkan dengan menggunakan *rotary vacum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen yang telah dikeringkan kemudian ditambahkan aseton PA 100% hingga pengenceran 10^3. Larutan pigmen dituang pada kuvet ± 3 ml dan kuvet kemudian dimasukan ke dalam instrumen spektrofotometer 1601 Shimidzu dan dilakukan pengujian. Hasil dari pengujian yang berupa serapan maksimum yang terbentuk oleh pigmen fukosantin kemudian dibandingkan dengan serapan spektra maksimum. Prosedur analisa Spektofotometer UV-VIS dapat dilihat pada Gambar 7.

3.3.2 Kultur Sel Preadiposit

3.3.2.1 Pembuatan Media Cair dan Media Kultur Lengkap

Pembuatan media kultur cair dilakukan di LAF (Laminar Air Flow) pada kondisi aseptis, sehingga sebelum dan sesudah mengambil bahan yang sudah steril, harus selalu dilakukan pemanasan peralatan di dekat nyala api bunsen. Pertama-tama adalah mempersiapkan seluruh komponen media yang akan digunakan, yang terdiri atas DMEM 1,08 gram, Pen-Srep 1 ml, natrium bikarbonat 1 ml, dan L-Glutamin 0,720 ml. Media yang akan dibuat dalam penelitian kali ini adalah sebanyak 80 ml. Langkah selanjutnya seluruh media tersebut dituang ke dalam 80 ml akuabides steril kedalam botol Duran 100 ml dan aduk hingga rata. Kemudian larutan media tersebut diukur pH nya dengan

menambahkan NaOH 2 M dan HCl 1 N ± 0,5 ml, hingga didapatkan pH 7,2. Menurut Hermawan (2009), pertumbuhan sel yang baik terjadi pada pH 7,0-7,4. Langkah selanjutnya adalah dilakukan filtrasi media dengan filter 0,2 mikron, dan ditampung ke dalam botol Duran 100 ml. Beri penandaan pada botol tersebut yang meliputi tanggal dan nama media. Selanjutnya simpan media di kulkas dengan suhu 4^0C hingga siap digunakan.

Media kultur lengkap adalah media yang mengandung faktor pertumbuhan seperti *Fetal Bovine Serum* (FBS). Pada penelitian ini menggunakan FBS 10 %. Langkah pertama dalam pembuatan media kultur lengkap ini adalah menyiapkan botol Duran 100 ml. Selanjutnya diambil 1,5 ml FBS dan dituang ke dalam botol duran. Kemudian ditambahkan media cair DMEM sebanyak 15 ml dan media siap digunakan. Perlu diperhatikan untuk selalu menjaga sterilitas dengan memanaskan ujung pipet dan mulut botol pada nyala api bunsen dalam setiap perlakuan, Komposisi serta perhitungan pembuatan media cair serta media kultur lengkap dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.2.2 Pembuatan Kultur Sel Preadiposit

Pembuatan kultur sel preadiposit ini menggunakan metode dari Indra *et al.,* (2010). Sebagai objek penelitian adalah kultur sel preadiposit yang diisolasi dari sel primer jaringan adipose viseral tikus. Pertama-tama adalah penyediaan jaringan lemak. Jaringan lemak diambil dari tikus jantan umur 1 bulan yang telah disuntik dengan ketamin sebanyak 200 µl. Kemudian ditunggu ± 15 menit hingga tikus pingsan. Setelah itu tikus direntangkan diatas malam yang padat. Selanjutnya seluruh tubuh tikus (terutama bagian abdomen) disemprot dengan alkohol 70% tujuannya agar steril. Kemudian tikus mulai dibedah pada bagian perut (pembedahan dari sisi perut bagian kiri ke bagian kanan membentuk setengah lingkaran). Jangan lupa setiap peralatan bedah harus didekatkan ke

bunsen untuk menjaga kondisi aseptis dan mencegah kontaminasi. Kemudian dipotong jaringan lemak. Pemotongan jaringan lemak harus dilakukan secara hati-hati, untuk menghindari kerusakan dari jaringan tersebut. Jaringan lemak yang didapat seberat ± 3 gram dimasukkan dalam larutan consolution. Fungsi larutan consolution adalah sebagai medium pembawa sebelum dikultur.

Jaringan lemak dicuci di cairan dPBS *(Dublbeco Phosphate Buffer Saline)* sebanyak 3 kali proses pencucian sambil dicacah kecil, kemudian dilakukan pencucian terakhir di dalam larutan media kultur DMEM yang terdiri dari DMEM *(dulbecco's modified eagle's medium)* serta komponen-komponen penunjang pertumbuhan lain seperti pen-strep (*penicillin streptomisin*), natrium bikarbonat (Na_2CO_3), dan L-Glutamin. Tujuan dari pencacahan adalah untuk memecah jaringan lemak menjadi komponen-komponen yang lebih kecil, sedangkan tujuan dari pencucian adalah untuk membersihkan jaringan lemak dari eritrosit. Kemudian cacahan jaringan lemak tadi dimasukkan kedalam tabung 15 ml yang berisi cairan collagen type I dalam DMEM. Tujuan dari penambahan collagen type I adalah sebagai pencacah matriks jaringan lemak, sehingga sel target dapat terlepas. Selanjutnya diinkubasi di waterbath shaker selama 37ºC selama 60 menit. Langkah selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 7 menit. Selanjutnya supernatan yang berupa jaringan lemak yang mengapung serta larutan dibuang hingga hanya tertinggal pelet yang berupa sel di dasar tabung, Kemudian ditambah larutan media kultur DMEM. Selanjutnya kembali disentrifus seperti diawal hingga di tambah DMEM, langkah tersebut diulang sebannyak 3 kali. Langkah terakhir ditambah media kultur lengkap DMEM dan FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10%. Langkah selanjutnya campuran tersebut dihomogenasi menggunakan pipeting aid, dan kemudian dipindahkan dalam wadah inokulasi yaitu TC Flask kultur. Tepi tutup Flask diisolasi dengan parafilm separuhnya untuk menghindari kontaminasi. Kemudian dimasukkan dalam

inkubator CO_2 5% dengan suhu 37ºC. Seluruh rangkaian prosedur tersebut dilakukan di dalam LAF (Laminar Air Flow). Selanjutnya setiap 2 hari media dicuci untuk mendapatkan medium yang segar. Untuk setiap kali pencucian sel dilakukan tiga kali ulangan pencucian. Untuk pencucian pertama dan yang kedua menggunakan media kultur lengkap DMEM, sedangkan untuk pencucian ketiga menggunakan media kultur lengkap DMEM ditambah dengan FBS 10%, sambil diamati perkembangan pertumbuhan sel lemak menggunakan mikroskop inverter. Pencucian sel serta pengamatan pertumbuhan sel dilakukan sampai sel tumbuh dengan besar ± 1 minggu hingga siap diberi perlakuan fukosantin. Prosedur pembuatan kultur sel preadiposit dapat dilihat pada Gambar 8.

3.3.2.3 Pemanenan Sel dan Pemberian Perlakuan Fukosantin

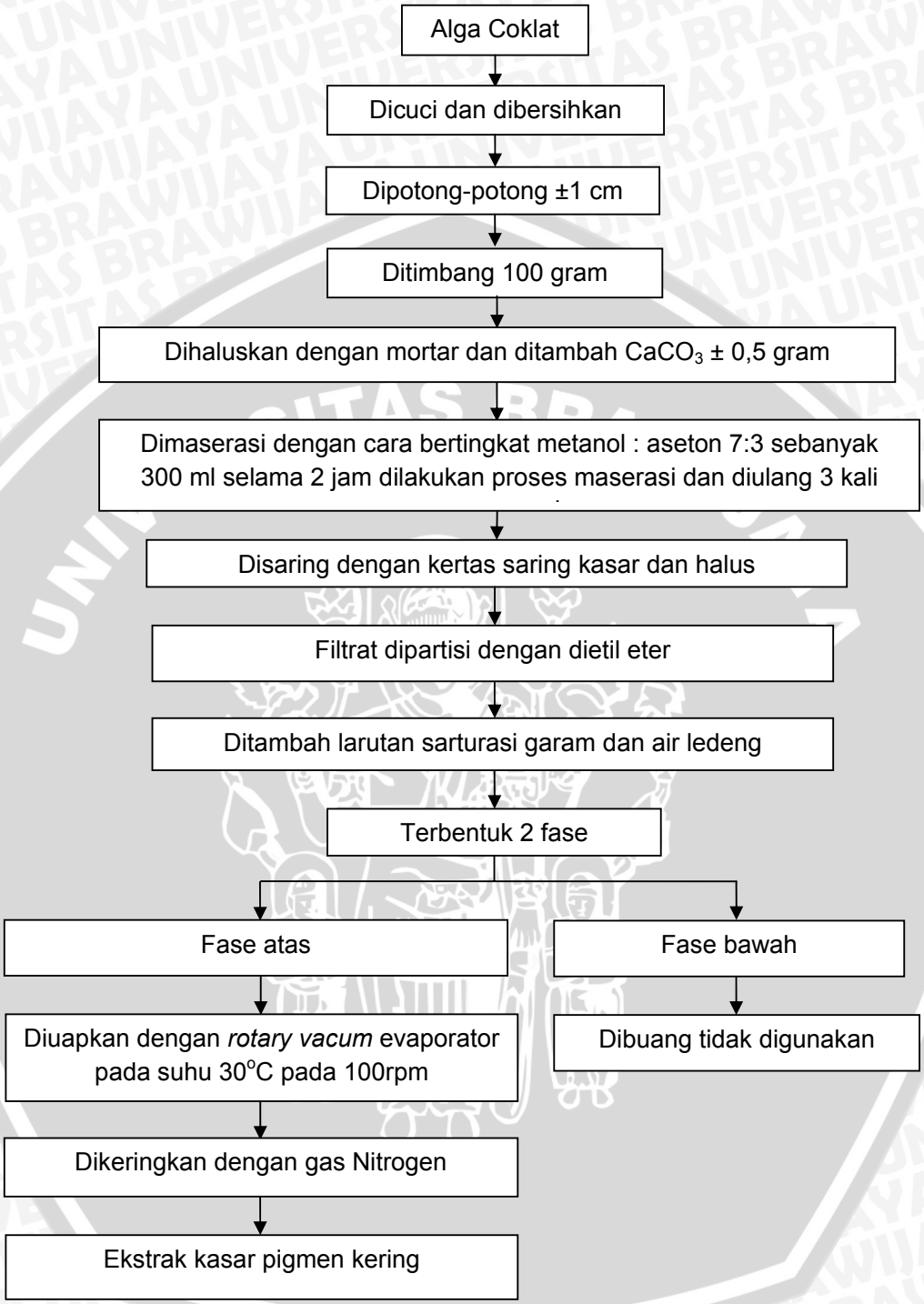
Sel kultur yang telah tumbuh besar dalam Flask kultur selanjutnya diambil medianya. Kemudian diganti dengan PBS (*Phopapate Buffer Saline*) tiga kali tujuannya untuk menghilangkan sisa-sisa serum yang menempel pada saat dikultur. Selanjutnya ditambahkan larutan tripsin EDTA *(ethylene diamine tetra acetic*) 0,25 % sampai seluruh permukaan sel terbasahi. Kemudian larutan tripsin EDTA 0,25 % diambil. Langkah selanjutnya sel diinkubasi di dalam inkubator suhu 37°C CO_2 5 %. Selanjutnya diamati bentuk sel tiap 1 menit sekali dibawah mikroskop inverter (sel diamati hingga terangkat). Jika sel belum terangkat masukkan kembali dalam inkubator, lalu diamati tiap 1 menit dibawah mikroskop inverter. Jika sel sudah terangkat, tambahkan media kultur lengkap DMEM dan serum FBS 20% untuk menginaktivasi kerja Trypsin EDTA 0,25 %. Kemudian sel dihomogenasi menggunakan pipeting aid, selanjutnya ditanam pada kultur plate baru. Langkah terakhir adalah menginkubasi kultur plate tersebut kedalam inkubator CO_2 5 % dengan suhu 37^{0}C. Inkubasi dilakukan selama 24 jam hingga sel siap untuk diberikan perlakuan fukosantin.

Setelah 24 jam sel tumbuh dengan sempurna langkah selanjutnya adalah pemberian perlakuan fukosantin kepada kultur sel tersebut dengan berbagai macam perlakuan yang meliputi: kontrol (-) , kontrol (+) 125 μM quersetin, perlakuan I 50 μM fukosantin, perlakuan II 100 μM fukosantin, perlakuan III 150 μM fukosantin. Fukosantin maupun quersetin yang ditambahkan ke dalam kultur sel terlebih dahulu dilarutkan dalam larutan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) 0,01 %. Penggunaan larutan DMSO pada kultur sel dikarenakan DMSO mempunyai sifat semi polar yang mempunyai gugus polar dan non polar, dimana larutan DMSO dapat melarutkan senyawa polar dan non polar atau dengan kata lain sebagai emulsiefier antara fukosantin dan juga lemak pada kultur sel (Wikipedia[e], 2012). Langkah terakhir adalah inkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5 % dengan suhu 37^0C. Prosedur pemanenan sel dapat dilihat pada Gambar 9.

3.3.2.4 Uji Fukosantin Terhadap Sel Preadiposit dengan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)*

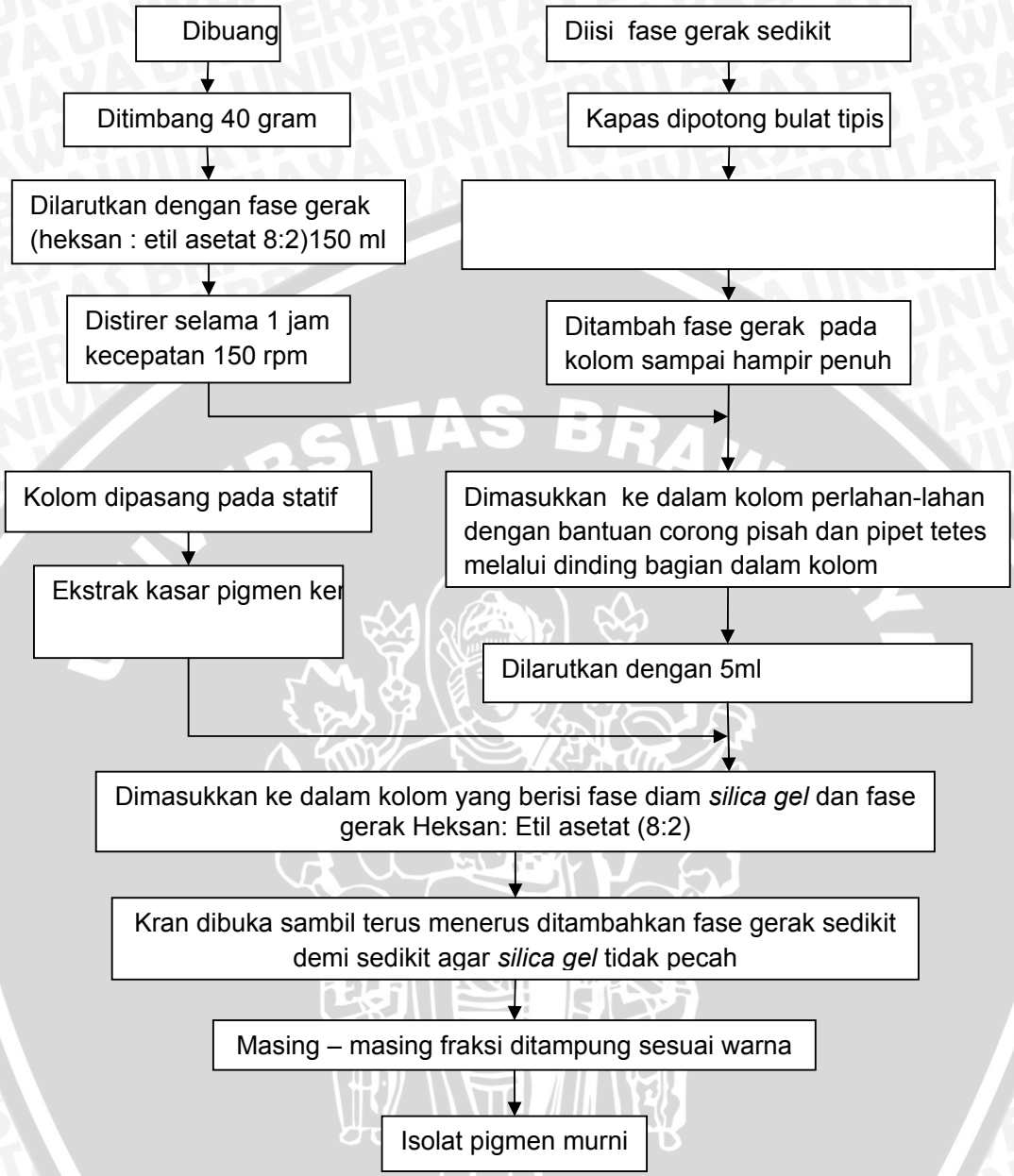
Tujuan Elisa adalah untuk mengetahui kadar TNF-α dalam media sel yang dipapar fukosantin. Prinsipnya ikatan anti gen anti bodi dengan enzim, yang selanjutnya terbaca intensitas warna yang terserap. Pengujian Elisa ini menggunakan metode dari Indra *et al.,* (2010). Langkah pertama yaitu coating antigen dengan coating buffer (1:4000) yang diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Komposisi coating buffer 0,1 mol/L karbonat buffer (0,42 gram dalam 50 ml akuabides) pada pH 9,5. Selanjutnya dicuci dengan PBST (*Phospate Buffer Saline-Tween*) 0,2% sebanyak enam kali. Kemudian ditambahkan dengan antibodi yang ingin diuji, yaitu antibodi primer dalam Assay Buffer BSA (*Buffer Saline Albumine*) dengan perbandingan 1:4000 yang diinkubasi satu sampai dua jam pada suhu ruang dan dishaker elisa plate. Antibodi primer berasal dari Rabbit anti TNF-α. Kemudian dicuci dengan PBST 0,2% sebanyak enam kali. Langkah selanjutnya ditambah antibodi sekunder yang berlabel enzim 1 Gg

Biotin Anti Rabbit (1:8000), kemudian diinkubasi satu jam dan dishaker elisa plate. Antibodi yang kedua ini akan menempel pada antibodi yang pertama. Selanjutnya dicuci dengan PBST 0,2% sebanyak enam kali, kemudian ditambah dengan enzim SA-HRP (*Sreptavidin Horse Radish Peroksidase*) (1:8000) inkubasi selama satu jam dalam suhu ruang. Kemudian dishaker elisa plate lalu dicuci dengan PBST sebanyak enam kali, jika sudah berwarna biru ditambah dengan substrat TMB (*Tetra Metil Benzidine*) (15-20 menit). Substrat TMB ini bersifat kromogenik yang dapat menimbulkan warna tertentu pada saat bereaksi. Selanjunya jika sudah berwarna kuning dihentikan dengan HCL 1 N selama 15 menit, selanjutnya dibaca dengan Elisa Reader dengan panjang gelombang 450-492 nm. Prosedur analisa dengan ELISA dapat dilihat pada Gambar 10.



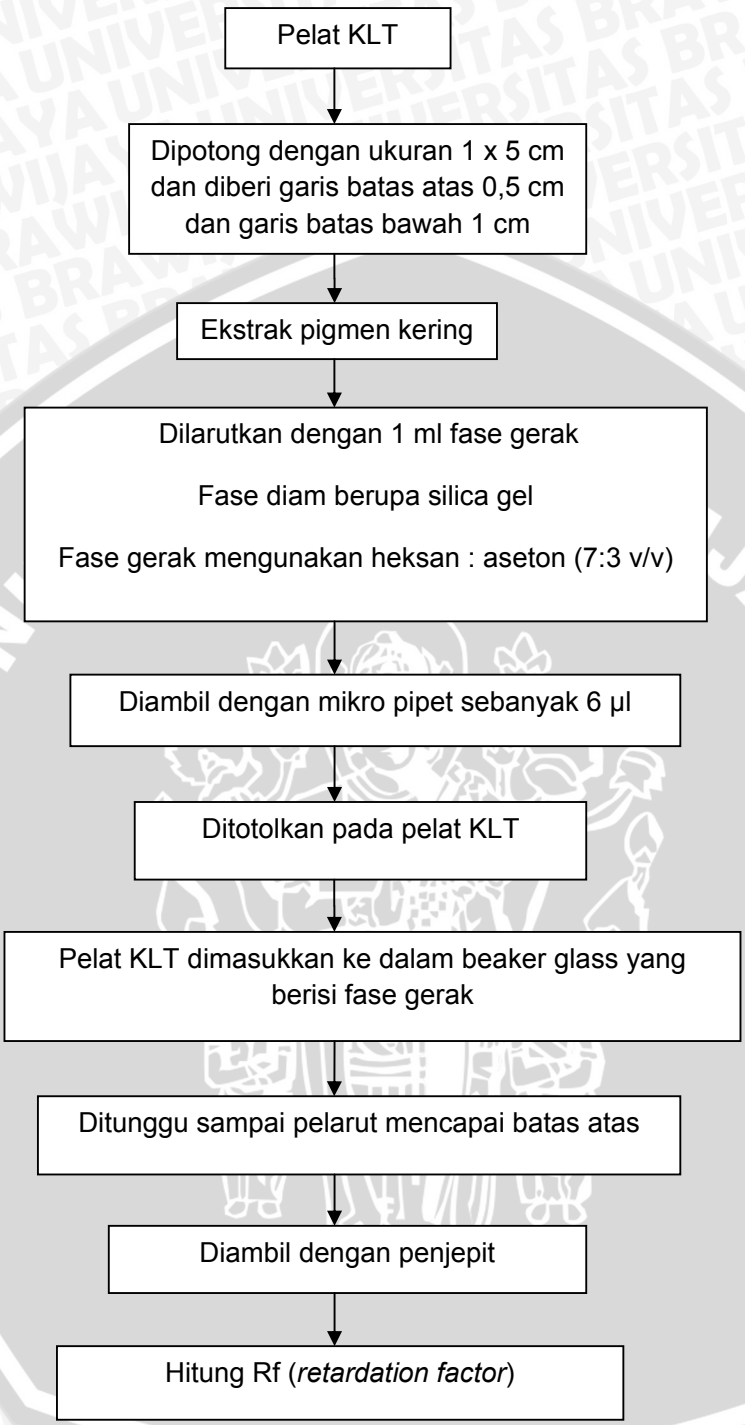
Gambar 4. Ekstraksi dan Fraksinasi Alga Coklat (Pangestuti, *et al*., 2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009)

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



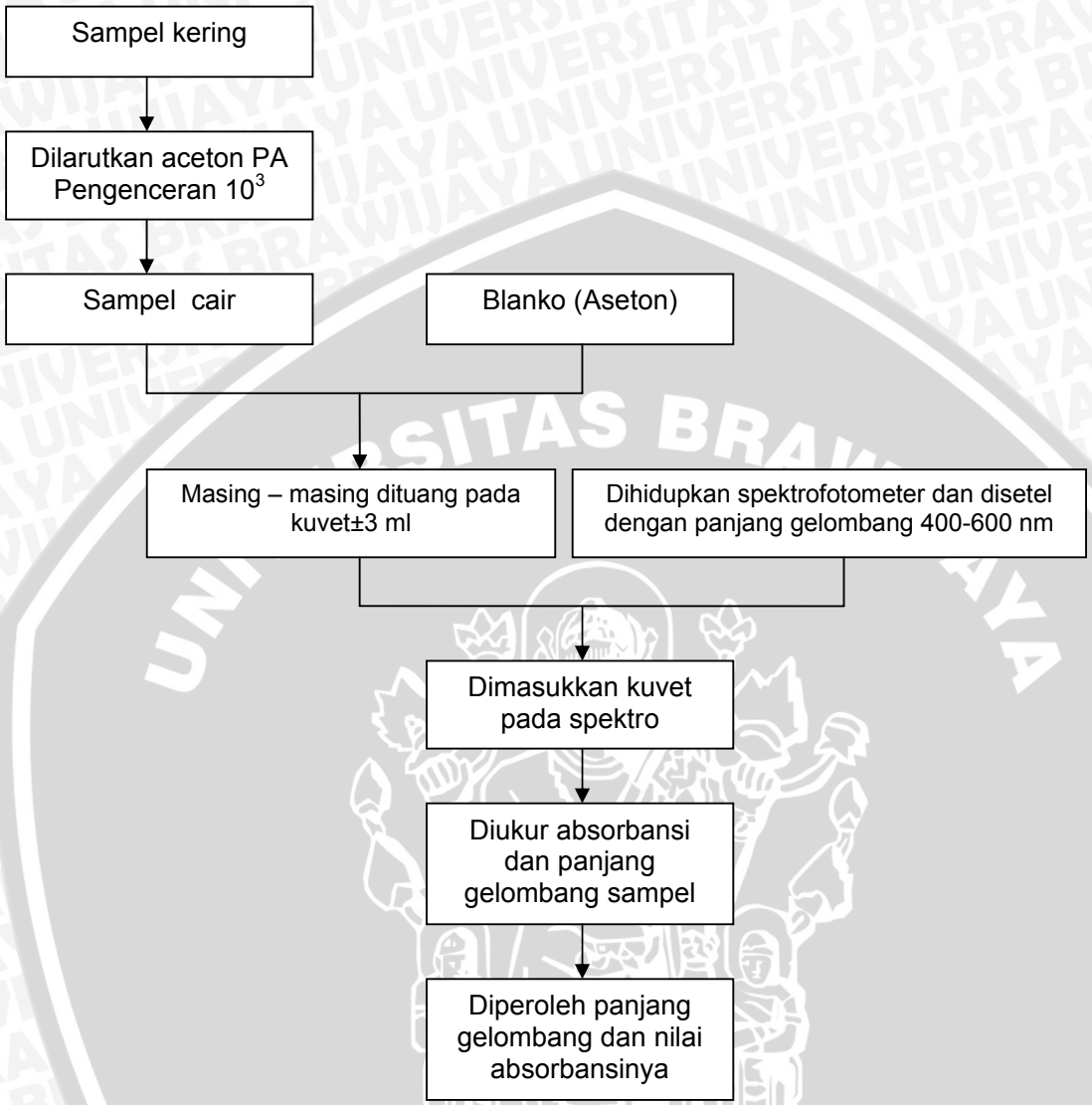
Gambar 5. Isolasi Fukosantin Kromatografi Kolom (Pangestuti, *et al.*, 2007)

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



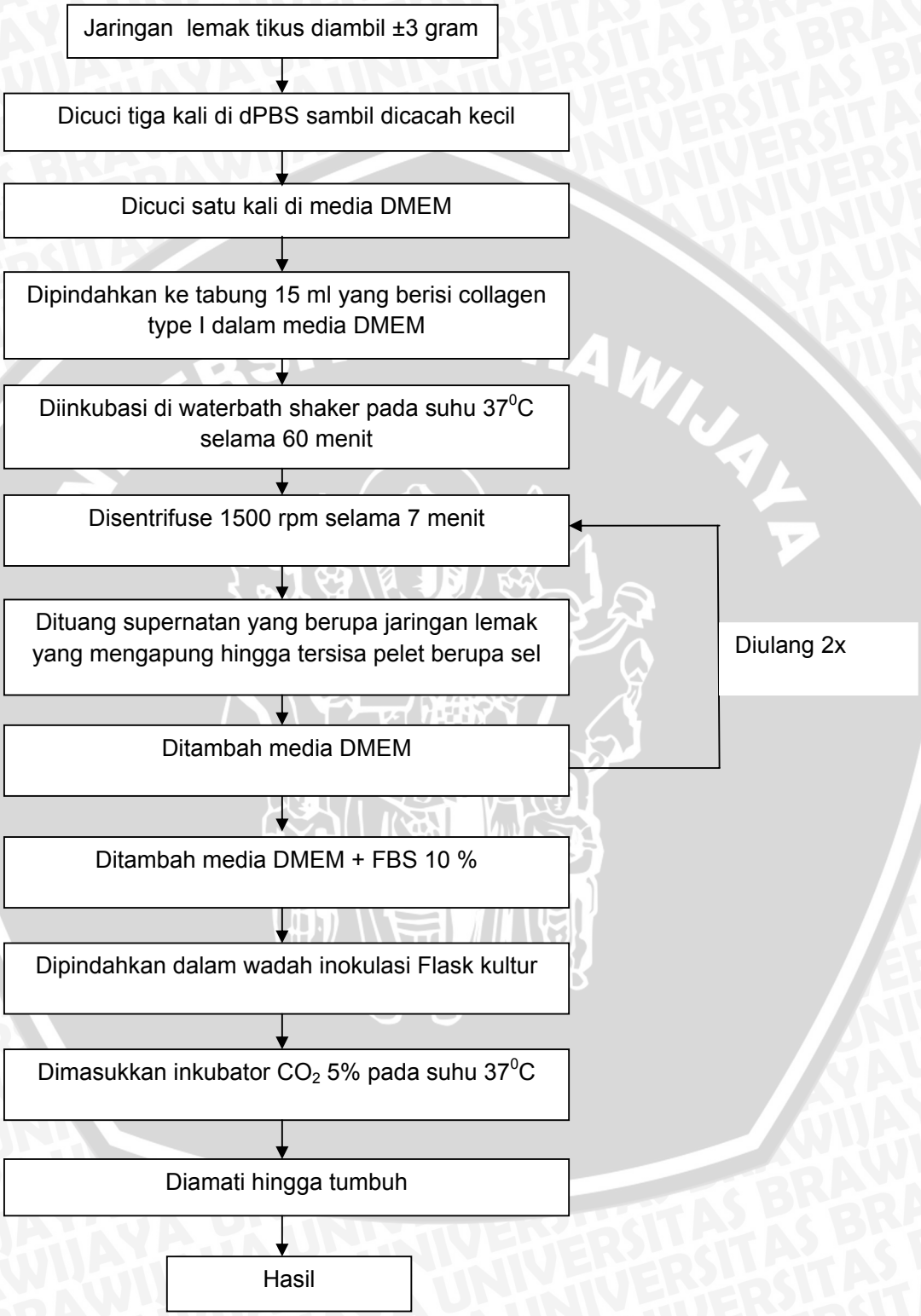
Gambar 6. Proses Kromatografi Lapis Tipis (Yan, *et al*., 1999)

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

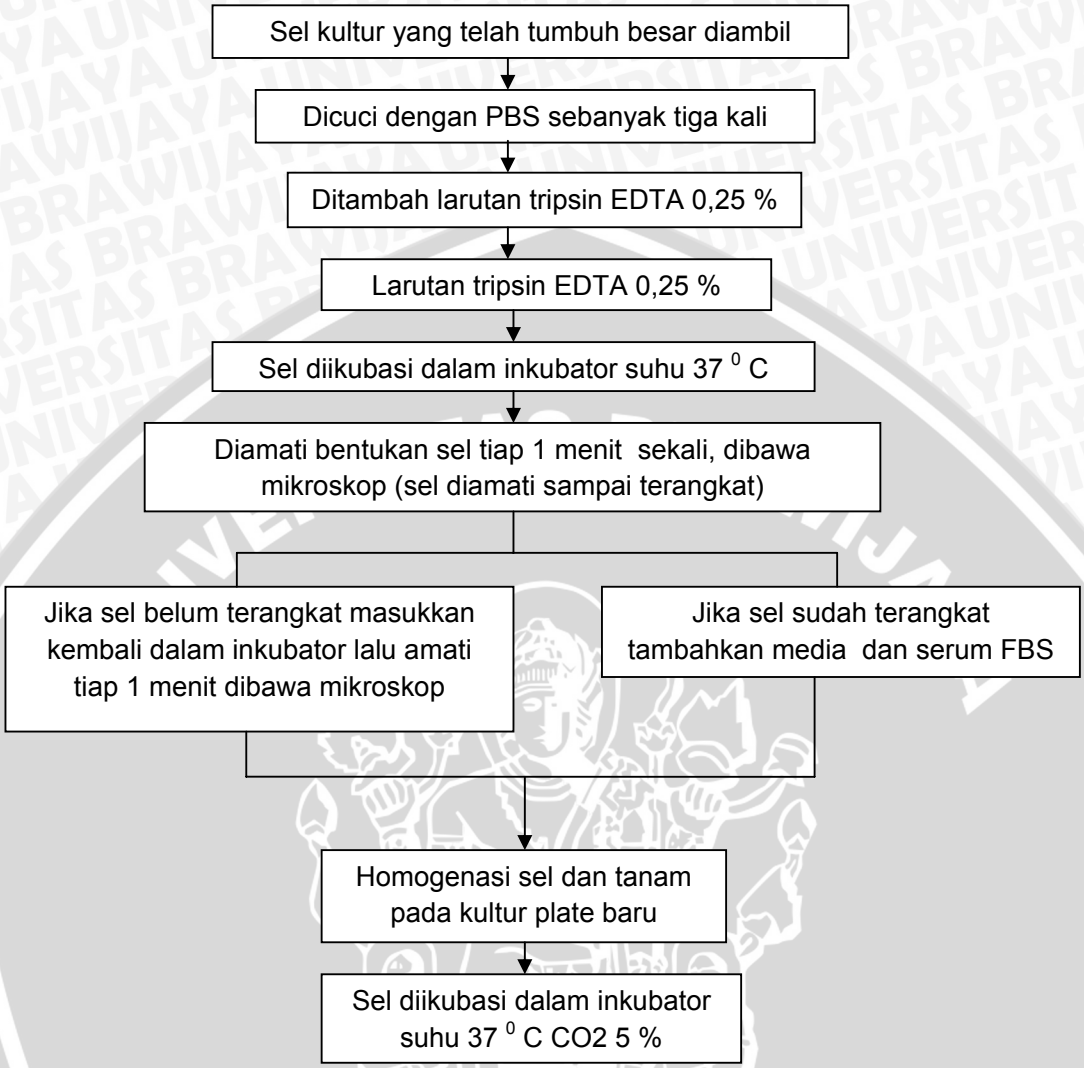


Gambar 7. Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer UV-1601 (Jenie, *et al.*, 1997)

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

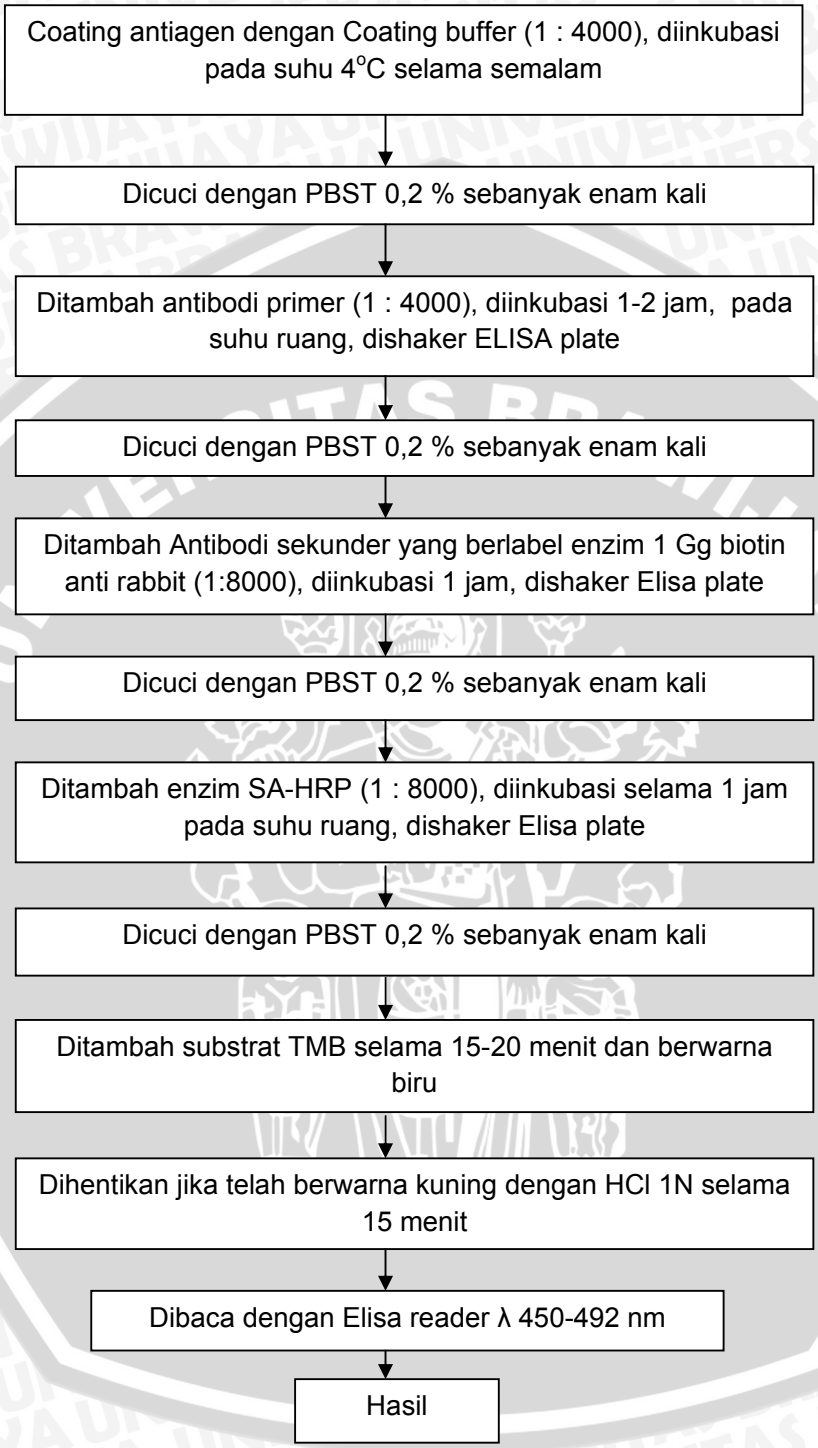


Gambar 8. Pembuatan Kultur Sel Preadiposit (Indra, *et al.*, 2010)



Gambar 9. Pemanenan Sel Preadiposit (Indra, *et al.*, 2010)

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 10. Uji Fukosantin Terhadap Sel Preadiposit dengan ELISA (Indra, *et al.*, 2010)

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Fukosantin hasil isolasi yang berupa rendemen, kromatografi kolom, KLT, dan pola spektra dapat dilihat pada Tabel 4, sedangkan hasil pengujian anti obesitas fukosantin yang ditunjukkan dengan nilai ekspresi TNF-alfa dapat dilihat pada Tabel 5 berikut ini :

Tabel 4. Data Uji Identifikasi Pigmen Fukosantin

No	Parameter Uji	Alat	Hasil	Literatur
1.	Rendemen		12,33 x 10^{-3} %	
2	Kolom	Kromatografi Kolom	Dari 53 tabung isolat, fukosantin diperoleh pada isolat 40 – 46, dengan warna orange	Fukosantin berwarna kuning tua (oranye) (Jeffrey, *et al.,* 1997)
3.	KLT	KLT	Rf yang didapat adalah 0,28	Rf fukosantin 0,25-0,28 Yan, *et al.,*(1999)
4.	Pola spectra	Spektrofotometer UV-VIS 1601 Shimadzu	Dari uji spektrofotometer fukosantin pada pelarut aceton didahasilkan pada panjang gelombang 446,5 nm	Dalam pelarut Aseton (Jeffrey, *et al.,* 1997) panjang gelombang 446.3 nm

Tabel 5. Nilai TNF-α Pada Pengujian Anti Obesitas Fukosantin

No	Perlakuan	Alat	Nilai Rerata TNF alfa
1	Kontrol Negatif (K-)	Elisa Reader	143,389 ± 5,09
2	Kontrol Positif / quercetin dosis 125 µM (K+)	Elisa Reader	148,389 ± 17,82
3	Fukosantin dosis 50 µM (P1)	Elisa Reader	120,056 ± 45,95
4	Fukosantin dosis 100 µM (P2)	Elisa Reader	86,722 ± 28,39
5	Fukosantin dosis 150 µM (P3)	Elisa Reader	163,389 ± 7,51

4.2 Pembahasan

4.2.1 Isolasi Fukosantin

4.2.1.1 Maserasi, Fraksinasi, dan Kromatografi Kolom

Proses isolasi untuk mendapatkan fukosantin dari rumput laut *Sargassum filipendula* diawali dengan proses maserasi secara bertingkat yang dilakukan sebanyak 3 kali proses maserasi. Maserasi pertama dilakukan selama 2 jam, sedangkan maserasi ke dua dan ke tiga masing-masing selama 30 menit. Filtrat yang dihasilkan dari seluruh proses maserasi bertingkat ini berwarna hijau pekat kecoklatan sebanyak 735 ml. Gambar penelitian proses maserasi dapat dilihat pada Lampiran 8.

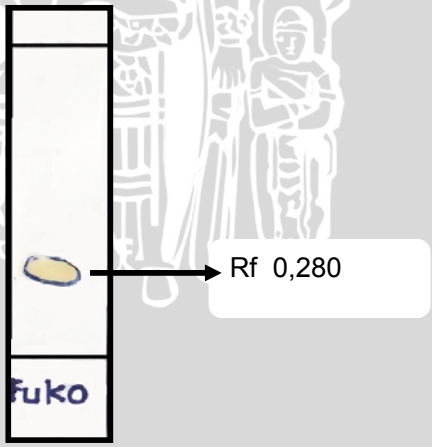
Proses kedua setelah maserasi, yaitu proses fraksinasi atau bisa disebut proses partisi. Fraksinasi ini menggunakan perbandingan antara filtrat : dietil eter : saturasi garam : air ledeng adalah 50 : 25 : 60 : 5 ml. Dari proses fraksinasi diperoleh fase atas dan fase bawah. Fase atas didapatkan sebanyak 405 ml yang merupakan ektrak pigmen fukosantin. Berdasarkan hasil ini dapat diasumsikan bahwa dietil eter yang digunakan mampu mengikat hampir seluruh pigmen. Hasil filtrat yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran 9.

Langkah terakhir dalam proses isolasi fukosantin yaitu pemurnian pigmen fukosantin menggunakan kolom kromatografi. Pigmen fukosantin yang dihasilkan pada kromatografi kolom ditandai dengan pigmen denga pita berwarna kuning tua (oranye). Pada penelitian ini sistem kromatografi kolom yang digunakan adalah "*normal phase*", yaitu fase diam yang digunakan bersifat polar dan fase gerak bersifat lebih nonpolar, sehingga pigmen yang bersifat nonpolar akan keluar terlebih dahulu (Jeffrey, *et al.,* 1997). Dari hasil isolasi yang dilakukan diperoleh 53 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi sesuai warna masing-masing.

Dari hasil isolasi kromatografi kolom isolat yang diyakini merupakan fukosantin murni adalah isolat yang berasal dari tabung 40 – 46, yang masing-masing tabung berisi 15 ml isolat pigmen fukosantin. Isolat ini diyakini sebagai pigmen fukosantin didasarkan pada pigmen warna oranye (kuning tua) yang merupakan ciri khas pigmen fukosantin (Jeffry*, et al.,* 1997). Pigmen fukosantin hasil isolasi dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.2.1.2 Identifikasi Fukosantin dan Rendemen Fukosantin

Untuk menyelidiki bahwa hasil isolasi kromatografi kolom pada alga coklat *Sarggasum fillipendula* adalah pigmen fukosantin, maka perlu dilakukan identifikasi. Identifikasi pertama dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menggetahui nilai *Retradation Factor* (RF). Sedangkan identifikasi kedua menggunakan spektrofotometer UV-VIS untuk mengukur pola spektra. Identifikasi fukosantin ini bersifat kualitatif dimana fraksi yang diduga pigmen fukosantin diuji dengan menggunakan plat kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil pengujian KLT pigmen fukosantin dapat dilihat pada Gambar 11 di bawah ini.

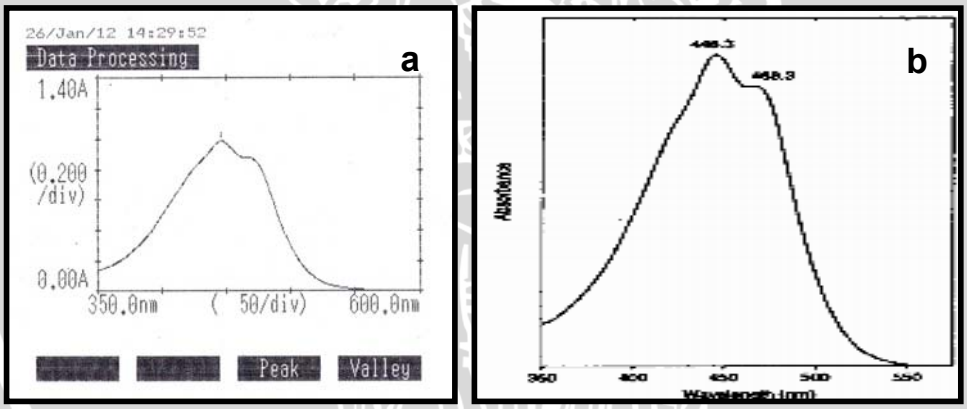


Gambar 11. Hasil KLT Pigmen Fukosantin

Dari gambar di atas diketahui bahwa pengujian KLT menghasilkan satu spot warna oranye, hal ini menunjukan bahwa fraksi yang dihasilkan dari proses kromatografi kolom adalah pigmen fukosantin murni. Hasil ini sesuai dengan

pernyataan Jeffrey *et al*., (1997) bahwa fukosantin mempunyai warna oranye (kuning tua). Untuk memperkuat hasil bahwa pigmen yang dihasilkan adalah benar fukosantin maka dilakukan penghitungan nilai Rf yakni dengan membagi jarak tempuh yang ditempuh oleh fraksi pigmen dengan jarak yang ditempuh pelarut. Dari hasil perhitungan nilai Rf hasil KLT dibandingkan dengan nilai Rf pada literatur menurut Yan *et al*., (1999) nilai Rf fukosantin berkisar antara 0,25-0,28. Dari hasil penelitian ini nilai Rf yang dihasilkan yakni 0,28 karena nilai Rf hasil penelitian berada pada kisaran Rf fukosantin pada literatur hal ini semakin memperkuat bahwa pigmen yang dihasilkan adalah fukosantin murni.

Selanjutnya untuk memperkuat hasil identifikasi fukosantin dengan KLT dilakukan pengujian pola spektra fukosantin dalam pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Pola Spektra Pigmen Fukosantin Hasil Isolasi Dalam Aseton a. Pola Spektra Hasil Penelitian, b. Pola Spektra Literatur (Jeffrey, *et al.*,1997)

Berdasarkan hasil pengukuran hasil isolasi fukosantin menggunakan spektofotometer didapatkan hasil serapan maksimum pada puncak spektra pada pelarut aseton 446,5 nm sedangkan serapan maksimum puncak spektra yang ada pada literatur Jeffrey *at al*., (1997) adalah 446,3 nm. Serapan maksimum yang dihasilkan antara isolasi dan literatur pada pelarut aseton tidak berbeda jauh dengan demikian dapat dikatakan serapan yang dihasilkan pigmen adalah

identik. Menurut Jeffrey, *et al.,* (1997) dan Hirota dan Kumagai (1990) fukosantin memiliki kemiripan yang hampir sama baik dalam pola spektra maupun panjang gelombang, meskipun terdapat pergeseran pada panjang gelombang hal ini mungkin dikarenakan sudah terjadinya perubahan fukosantin menjadi *Cis-trans* fukosantin atau karena kualitas pelarut dan kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa (Toto, *et al*., 2006).

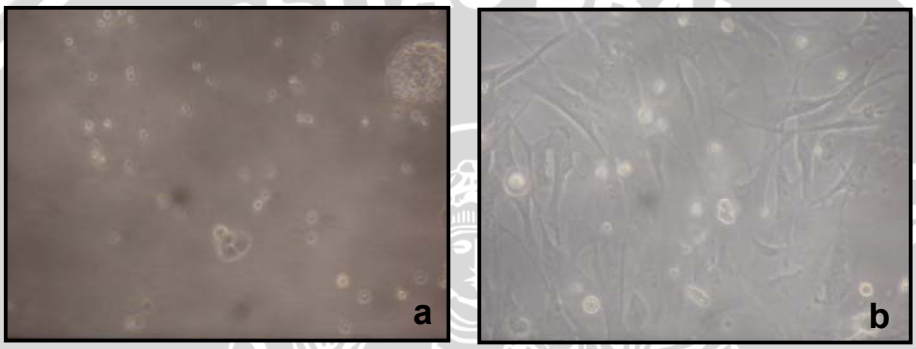
Setelah proses identifikasi fukosantin dilanjutkan dengan perhitungan rendemen. Hasil rendemen fukosantin *Sargassum filipendula* pada penelitian ini sebesar 0,01233 %. Dimana pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wijayanti (2009) didapatkan rendemen fukosantin pada rumput laut jenis *Padina australis* 0,07 % ± 0.00256, dan *Sargassum polycystum* 0.03 % ± 0.00265. Perbedaan rendemen dari fukosantin pada alga coklat disebabkan adanya perbedaan spesies dan habitat alga coklat.

4.2.2 Hasil Fukosantin Sebagai Antiobesitas

4.2.2.1 Kultur Sel Preadiposit

Sel preadiposit pada penelitian ini diisolasi dari sel primer jaringan adipose viseral tikus wistar berkelamin jantan yang telah berumur 1 bulan. Dipilihnya jaringan preadiposit pada tikus wistar ini sebagai sel kultur pada pengujian antiobesitas, dikarenakan preadiposit merupakan tempat terjadinya ekspresi sel secara biomolekuler penyebab terjadinya obesitas seperti ekpresi terjadinya adipositokin yang menghasilkan TNF-alfa dan adiponektin (Miyashita, 2009). Selain itu pemilihan sel preadiposit pada penelitian antiobesitas ini, ditujukan untuk mengetahui pengaruh dosis fukosantin terhadap ekpresi TNF-alfa yang terjadi pada kultur sel preadiposit. Metode kultur sel preadiposit pada penelitian ini menggunakan metode (Indra *et al*,. 2011) Gambar proses isolasi dan penumbuhan sel preadiposit dapat dilihat pada Lampiran 10.

Sel preadiposit yang telah diisolasi dan dikultur serta tumbuh besar dalam wadah Tissue Culture Flask kultur,selanjutnya dilakukan proses pemanenan. Sel kultur yang siap dipanen ditandai dengan ciri sel yang mengembang dimana massa sel semakin membesar dimulai dari hari 0 saat awal proses kultur sel hingga hari ke 7 pada saat sel kultur siap dipanen, berikut ini adalah gambar hasil pengamatan perkembangan sel kultur pada hari ke 0 dan hari ke 7, terlihat pada Gambar 13 berikut ini.



Gambar 13. Perkembangan Sel Kultur Mulai Hari ke 0 Sampai Hari ke 7 a). Sel Preadiposit hari ke 0, b). Sel Preadiposit hari ke 7

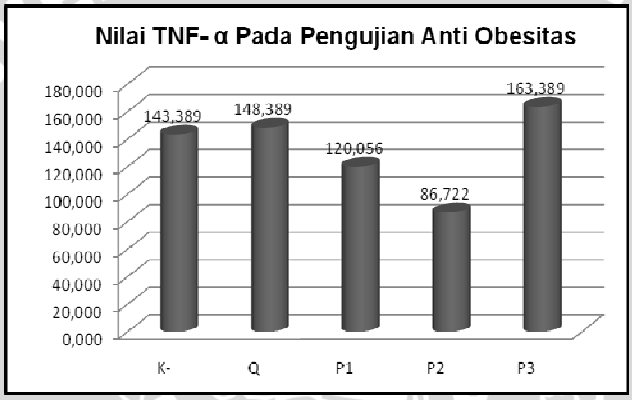
4.2.2.2 Perhitungan Nilai TNF alfa dan Pengamatan Sel Preadiposit

Berdasarkan hasil analisa ragam (anova) dengan tingkat selang kepercayaan 5 %, didapatkan bahwa pemberian fukosantin dengan dosis yang berbeda 50 µM, 100 µM, 150 µM memberikan pengaruh yang nyata terhadap ekspersi TNF-alfa dalam sel preadiposit tikus yang bertidak sebagai sitokin proinflamasi pada penyakit obesitas, dimana nilai $F_{hitung} > F_{Tabel\ 0,05}$; 4,040 > 3,48 (Perhitungan analisa ragam (anova) terlampir. Adapun data rerata hasil pengujian fukosantin terhadap ekspresi TNF-alfa dalam kultur sel preadiposit dengan menggunakan ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* pada Tabel 6.

Tabel 6. Nilai Rata - Rata TNF-α dan Notasi BNT

Perlakuan		Nilai Rata-rata TNF-α
Kontrol Negatif	K	143,389 ± 5,09 [b]
Kontrol Positif / quercetin dosis 125 µM	Q	148,389 ± 17,82 [b]
Fukosantin dosis 50 µM	P1	120,056 ± 45,95 [ab]
Fukosantin dosis 100 µM	P2	86,722 ± 28,39 [a]
Fukosantin dosis 150 µM	P3	163,389 ± 7,51 [b]

Ket : Data merupakan rerata nilai 3 ulangan
Rerata yang diikuti oleh huruf yang berbeda berarti berbeda nyata α =0,05



Gambar 14. Grafik Rerata Nilai TNF – α

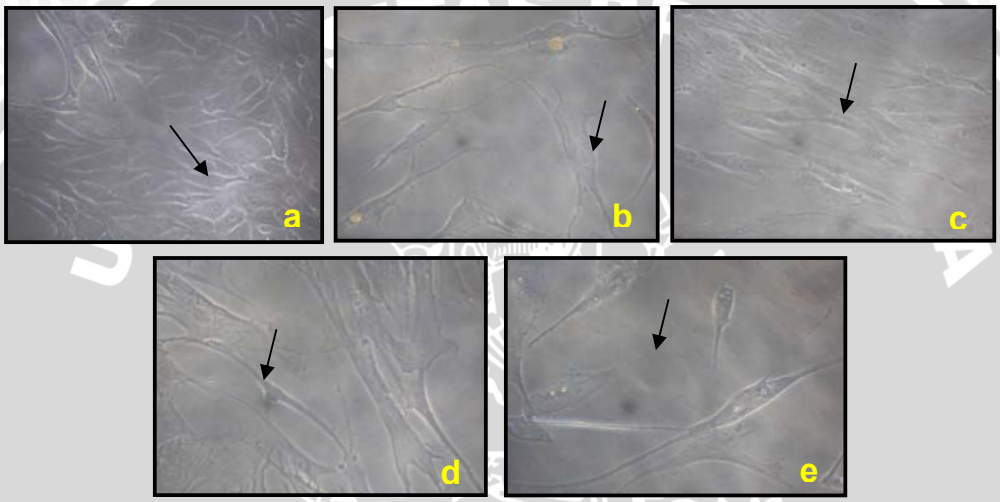
Berdasarkan grafik pada Gambar 15, dapat kita ketahui bahwa pemberian dosis fukosantin dosis 50 µM (P1) dan 100 µM (P2), mengalami grafik penurunan dan kemudian mengalami peningkatan nilai TNF–alfa pada dosis fukosantin 150 µM (P3). Perlakuan dosis fukosantin jika dibandingkan dengan kontrol positif (quersetin dosis 125 µM) ternyata fukosantin dosis 100 µM, lebih efektif didalam menekan terjadinya ekpresi dari TNF-alfa dalam hal terjadinya obesitas, hal ini ditunjukan dengan nilai TNF-alfa pada pengujian, lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif quersetin, dimana fukosantin dosis 100 µM (P2) (86,722 ± 28,39) dan kontrol positif (Q) (148,389 ± 17,82) sedangkan pada kontrol negatif (K-) (143,389 ± 5,09).

Menurut Kersshaw and Flier (2004) dan Linna *et al.,* (2011), tingginya nilai TNF-alfa pada sel preadiposit dalam pengujian antiobesitas menunjukkan tingkat kegemukan atau obesitas, dimana TNF-alfa, merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang memicu timbulnya obesitas. Pada orang gemuk (obesitas) nilai TNF-alfa akan meningkat dan menyebabkan menurunnya adiponektin (anti-inflamasi), sebaliknya penurunan TNF-alfa akan menyebabkan meningkatnya adiponektin yang berakibat semakin rendahnya tingkat obesitas. Jadi semakin rendahnya nilai TNF-alfa yang dihasilkan pada pengujian antiobesitas ini maka semakin baik kemampuan dari fukosantin didalam menghambat ekspresi adipositokin TNF-alfa dalam terjadinya obesitas.

Nilai TNF-alfa terendah dari pengujian ini didapatkan pada perlakuan P2 (fukosantin dengan dosis 100 μM) sebesar 86,722 dan nilai TNF-alfa tertinggi diperoleh pada perlakuan P3 (fukosantin dengan dosis 150 μM) sebesar 163,389. Dari ketiga perlakuan pemberian dosis fukosantin yang berbeda dapat diberikan notasi berdasarkan uji lanjut BNT 5% (46,86, pada tabel 4), bahwasannya perlakuan dosis fukosantin 100 μM (P2) tidak berbeda nyata dengan dosis fukosantin 50 μM (P1) tetapi berbeda nyata dengan perlakuan K (kontrol positif) dan P3 (fukosantin dosis 150 μM) didalam menurunkan nilai kadar TNF-alfa pada sel preadiposit tikus.

Tinggi rendahnya nilai TNF-alfa yang dihasilkan pada pengujian ini dipengaruhi oleh dosis fukosantin, dimana dosis fukosantin yang bebeda berpengaruh terhadap kemampuan dari fukosantin didalam menghambat ekpresi TNF-alfa yang dihasilkan oleh adipositokin, menurut Hosokawa *et al* (2010) dijelaskan kemampuan fukosantin didalam menghambat ekspresi sitokin seperti MCP1, TNF-alfa dan IL6 disebabkan oleh kandungan dari fukosantin pada bahan pengujian dalam hal ini kandungan fukosanti tinggi atau rendah berpengaruh terhadap ekpresi sitokin. Semakin rendah nilai TNF-alfa maka semakin baik

fukosantin sebagai antiobesitas. Nilai TNF-alfa ini juga berhubungan dengan hasil pengamatan sel kultur yang dihasilkan. Dimana nilai TNF-alfa yang rendah akan diikuti dengan ukuran sel yang tampak mengecil atau diduga sel mengalami proses apoptosis (*pada penelitaian tidak dilakukan pengujian apoptosis sel*), sedangkan nilai TNF-alfa yang tinggi maka sel yang diamati mengalami pengembangan ukuran atau membesar. Adapun gambar hasil pengamatan sel dari penelitian ini dapat kita lihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Pengamatan Sel Preadiposit Pembesaran 1000 x a). Kontrol (-), b). Kontrol (+), c).Fukosantin 50 µM,d). Fukosantin 100 µM, e).Fukosantin 150 µM

Pada Gambar 16 hasil pengamatan sel preadiposit, didapatkan bahwa Tinggi rendahnya nilai TNF-alfa yang didapat akan berkolerasi dengan hasil pengamatan sel. Pada hasil pengamatan sel preadiposit tampak bahwa kontrol negatif, sel mengalami pertumbuhan yang baik dimana sel tumbuh membesar dan memanjang (ditandai dengan tanda panah, pada gambar 15.a), pada kontrol positif sel tampak mengalami pembengkakan sel dan jumlah selnya berkurang (ditandai dengan tanda panah, pada gambar 15.b), pada perlakuan fukosantin 50 µM, sel sudah mulai mengecil dan memanjang (ditandai dengan tanda panah, pada gambar 15.c), pada perlakuan fukosantin 100 µM, sel sudah tampak mengecil dibanding kan dengan perlakuan yang lain (ditandai dengan tanda

panah, pada gambar 15.d). dan pada perlakuan fukosantin 150 μM, sel preadiposit mengalami kematian sel dengan jumlah sel yang mulai berkurang (ditandai dengan tanda panah, pada gambar 15.e)

Pada hasil pengamatan sel untuk perlakuan fukosantin dosis 50 dan 100 μM sel preadiposit mengalami pengecilan sel, hal ini berkolerasi dengan nilai TNF-alfa yang didapatkan pada kedua dosis tersebut lebih rendah dari nilai TNF-alfa kontrol negatif (tanpa perlakuan), ini diduga dikarenakan kerja dari fukosantin didalam menghambat ekpresi dari TNF-alfa yang terjadi sehingga pertumbuhan sel yang berlebih (sel tumbuh membesar) dapat ditekan dan ditandai dengan adanya bagian sel preadiposit yang mulai mengempis atau mengecil. Sedangkan pada perlakuan dosis 150 μM, jumlah sel mulai berkurang dimana sel preadiposit sudah menjadi satu dengan media kulturnya atau dengan kata lain sel preadiposit mengalami kematian selain itu sel juga tampak tumbuh membesar dan jumlahnya berkurang. Hal ini diduga pada dosis 150 μM fukosantin tidak lagi berfungsi didalam menghambat terjadinya ekpresi TNF-alfa pada sel preadiposit melainkan sudah bersifat toksik terhadap sel preadiposit. Hal ini berkolerasi dengan nilai TNF-alfa yang dihasilkan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan dosis fukosantin lainnya.

Menurut Mi-Ji-Yin *et al*., (2011) dan Maeda *et al*., (2007) yang melakukan penelitian serupa didapatkan bahwa fukosantin dan turunanya (amarouciax anthin) pada dosis `10 μM dan fukosantinol pada pengujian kultur sel 3T3-L, bertindak sebagai sebagai antiobesitas dengan cara menghambat terjadinya diferensiasi sel preadiposit menjadi adiposit pada jaringan adiposa, dimana hal ini akan menyebabkan pembesaran sel lemak pada jaringan adipose. Kemamp uan antiobesitas fukosantin dan turunannya ditandai dengan adanya pengecilan sel kultur pada pengujian dibandingkan dengan sel kontrol. Hal ini memiliki kemiripan hasil dengan penelitian ini dimana fukosantin pada dosis 100 μM,

memiliki nilai TNF-alfa yang rendah dan diikuti dengan terjadinya pengempesan/pengecilan sel kultur yang diuji.

Selama proses terjadinya obesitas akan menyebabkan terjadinya infiltrasi makropage WAT (*White Adipose Tissue)* sehingga meningkatkan regulasi dari pro inflamasi adipositokin seperti TNF-alfa dan menurunkan regulasi anti-inflamasi seperti adiponektin. Terjadinya perubahan regulasi adipositokin ini disebabkan oleh adanya dukungan media pro-inflamasi seperti Nitrit okside (NO) dan Prostaglandin E_2 (PGE_2) yang disintesis dari enzim Induksi Nitrit okside sintase (iNOS) dan Ciklosigenase 2 (COX-2), atau dapat dijelaskan bahwa iNOS dan COX-2 merupakan enzim yang berhubungan dengan inflamasi dimana enzim tersebut memproduksi mediator NO dan PGE_2. Selain itu peningkatan regulasi adipositokin juga disebabkan oleh stimulasi asam lemak jenuh seperti asam palmitat sebagai mediator umum penyebab obesitas dan adanya asam palmitat akan mengaktifkan produksi TNF alfa pada WAT (Miyashita, 2009 dan Hosokowa, *et al.,* 2010).

Kemampuan fukosantin pada dosis 100 µM yang lebih efektif didalam menurunkan nilai TNF Alfa yang dihasilkan oleh adipositokin pada sel preadiposit tikus dibandingkan dengan fukosantin dosis 50 µM dan dosis 150 µM serta kontrol positif, disebabkan karena adanya reaksi dan ekpresi biomolekuler dari stuktur fukosantin yang bertindak sebagai antiobesitas, dimana fukosantin secara alami memiliki kromatofor polien yang mengandung ikatan alenik dan 2 gugus hidroksil pada fukosantin dan metabolit turunannya (Miyashita, *et al.*, 2011).

Fukosantin yang merupakan senyawa karotenoid alam yang memiliki ikatan alenik, epoksi dan asetil mampu menekan terjadinya obesitas serta diabetes dengan cara mengatur regulasi perubahan produksi adipositokin pada WAT atau dengan kata lain menghambat produksi mediator inflamasi. Obesitas secara umum berhubungan dengan komplikasi metabolisme lemak dan stres

oksidatif. Selain itu penderita obesitas juga mengalami hiperplasi dan hipertropi sel adiposa yang menyebabkan produksi sitokin oleh jaringan adiposa meningkat. Umumnya terjadinya penumpukan machrophage pada jaringan lemak yang akan diikuti dengan peningkatan pelepasan sitokin TNF alfa, TNF alfa sendiri merupakan sitokin proinflamasi dan dimodulasi oleh adanyanya sters oksidatif, dimana TNF alfa dapat menginduksi atherosklerosis dalam metabolisme lemak dan memicu proses insulin resisten pada penderita obesitas. Proses inflamasi sendiri merupakan indikator aktivitas sistem imun tubuh. Salah satu substansi immun tubuh adalah antioksidan. Fukosantin dapat bertindak sebagai antiinflamasi pada terjadinya proses obesitas dengan menghambat Radikal bebas juga mengahmbat stress oksidasi ROS dan berperan dalam modulasi ekpresi gen termasuk menghambat TNF alfa.

Berdasarkan penelitian Jaswir dan Mansyor (2011) dan Hasokawa, *et al*., (2010) didapatkan hasil bahwa kemampuan fukosantin didalam mengatur pro-inflamasi adipositokin seperti TNF-alfa, MCP-1, dan IL-6 pada WAT dengan cara bertindak langsung menekan terjadinya infitrasi makrofag di WAT sehingga menurunkan regulasi ekspresi mRNA adipositokin (TNF-alfa dan adiponektin). Fukosantin mampu mengambat ekspresi mRNA (adipositokin) dengan cara menghambat regulasi enzim COX-2 penghasil PGE_2 serta kemampuan anti radikal bebas fukosantin didalam menghabat Nitite Okside (NO) yang diproduksi oleh enzim iNOS. Kemampuan fukosantin didalam menghambat NO dan PGE_2 menyebabkan fukosantin berfungsi sebagai antiobesitas.

Menurut Anggraeni *et al* (2009) dan D'Orazio *et al* (2012) Obesitas secara umum berhubungan dengan komplikasi metabolisme lemak (pelepasan/produksi energi) dan stres oksidatif. Peran fukosantin sebagai antiobesitas tidak terlepas dari kemampuannya sebagai antioksidan, dimana pada penderita obesitas terjadi peningkatan TNF alfa, terjadi akibat sitokin bereaksi berlebih menghasilkan

sitokin proinflamasi yang di modulasi oleh adanya stess oksidatif dalam tubuh kondisi ini menyebabkan sitem imun tubuh menjadi tidak seimbang. Fukosantin salah satunya dapat berperan menghambat terjadinya peningkatan TNF alfa dengan cara menghambat terjadinya stess oksidatif pada tubuh, salah satu penyebab stess oksidatif adalah terjadinya lipid hidroperoksida dan juga senyawa radikal ROS (Reactive Oxygen Species) yang ditandai dengan meningkatnya aktifitas Nitite Okside Sitase (NOS) pada gejala inflamasi.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarakan penelitian mengenai studi pengaruh dosis fukosantin yang berbeda terhadap ekspresi TNF-α dalam kultur preadiposit sebagai antiobesitas diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Nilai ekspresi TNF-α untuk masing-masing perlakuan pada kultur sel preadiposit adalah kontrol negatif (-) (143,389 ± 5,09), kontrol positif quersetin dosis 125 μM (148,389 ± 17,82), perlakuan I fukosantin dosis 50 μM (120,056 ± 45,95), perlakuan II fukosantin dosis 100 μM (86,722 ± 28,39) dan perlakuan III fukosantin 150 μM (163,389 ± 7,51). Dilihat dari hasil keseluruhan yang didapatkan terlihat tidak ada perubahan, jadi fukosantin yang diberikan pada perlakuan bukan fukosantin murni.

5.2 Saran

Sebaiknya untuk penelitian selanjutnya mengenai aplikasi fukosantin perlu dilakukan analisa gugus-gugus aktif fukosantin terlebih dahulu sebelum melakukan analisa berikutnya, untuk memperoleh fukosantin dengan tingkat kemurnian yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2009[a]. Penstrep. www.itis.gov. Diakses Tanggal 26 Juni 2010

_____ . 2010[b]. Natrium Bikarbonat. www.scribd.com. Diakses Tanggal 20 Juni 2010

_____ . 2011[c]. L-Glutamin. www.infogue.com. Diakses Tanggal 20 Januari 2011

_____ . 2011[d]. Elisa. www.google.com. Diakses Tanggal 20 Januari 2011

Agustina D. R. Nurcahyanti. K. Timotius. 2007. Fukosantin Sebagai Antiobesitas. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol XVIII. No 2.

Anggraeni. H, E. Sutjiati, M.Rasyad Indra, 2009. Pemberian quersetin terhadap perubahan kadar TNF- Alpha pada serum tikus wistar dengan diet tinggi karbohidrat. Jurnal Kesehatan Vol. 7 No.2 Hal 67-73.

Atmadja, W. 2002. Apa rumput laut Itu sebenarnya?. http://www.coremap.or.id/print/article.php?id=264, diakses Tanggal 31 juli 2010

Borrow, C. and F. Shahidi. 2008. *Marine Nutraceutical and Functional Foods.* CRC Press. London. New York

Bio-Rad. 2012. *Basic Cell Culture.* http : www.bio-rad.com/genomics. Diakses Tanggal 20 Mei 2012.

BPOM. 2006. Info POM Sibutramin. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. ISSN : 1829-9334. Vol 7. No 4.

Butler M. 2004. *Animal Cell Culture and Technology*. Cornwall UK : Bios Scientific Publishers.

D'Orazio Nicolantonio, Maria A.G, Eugenio G., Massimo De'G, Salvatore. C, dan Graziano. R, 2012. *Marine Bioactives : Pharmacological Properties adn Potential Aplplications Against Inflammatory Diseases*. Journal Marine Drugs 2012 edition 10.

Ensikolpedia. 2009. Algae-*algae and Their Characteristic, Types of Algae, Ecological Relationship, Factors Limiting The Productivity of Algae.* www.science.jrank.org. Diakses Tanggal 4 Juni 2009

Eva. 2008. Budidaya rumput laut. www.w3.org. Diakses Tanggal 15 Februari 2009

Even M. S, Sandusky C. B, Barnard N. D. 2006. *Serum-free Bybridoma Culture*: *Ethical, scientific and safety considerations*. *Journal of Biotechno*. Vol. 24 Hal : 105-108

Freshney RI. 2006. *Culture of Cells for Tissue Engineering*. New York: John Wiley and Sons Inc.

Fidianingsih I. 2009. Sel lemak dan peranannya dalam penyakit. Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta

Gross, J. 1991. *Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids.* An Avi Book. New York

Hadi,H, 2005. Beban ganda masalah gizi dan implikasinya terhadap kebijakan pembangunan kesehatan Nasional, Pidato pengukuhan Guru Besar, FK UGM, http://www.gizi.net/cgibin/berita/fullnews.cgi/news*id1109302893, 75841*

Hanum, T. 2000. Ekstraksi dan stabilitas zat pewarna alami dari katul beras ketan hitam (*O. sativa glutinosa*). Buletin Teknologi dan Industri Pangan.

Hirota, Nozomu dan Akiki Kumagai. 1990. *Pigmen Composition of Cholrophyll-Protein Compex and Seasonal Variason of Pigmen in the brown Algae Hizikia Fusiformis.*

Hosokawa M. Miyashita T. Nishikawa Sho. Emi Shingo. Tsukui T. Beppu F. Okada T. Miyashita Kazuo. 2010. *Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK-Ay mice.* Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan.

Indra R. M. Hernowati E. T. Satuman. Widodo E. 2010. Kultur adiposit dan pemeriksaan adipositokin Jilid II. Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Jaswir dan Mansyor. 2011. *Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review*. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(33), pp. 7146-7154

Jeffrey, S. W. R. F. C Mantoura, and S. W Wright. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography.* (Dalam Pangestuti R, L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. Kandungan dan aktivitas antioksidan fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201-209

Jenie, B. S. L., K. D Mitrajanty dan S. Fardiaz. 1997. Produksi konsentrat dan bubuk pigmen angkak dari *Monascus purpureus*. Buletin Teknologi dan Industri Pangan No.7

Jochems C. E. A. Jan B. F Van Der Valk, Stafleu F. R. Baumans V. 2003. *The use of fetal bovine serum:* Ethical or scientific problem? Atla 30:122.

Junianto, 2006. Rendemen dan kualitas algin hasil ekstraksi alga (*Sargassum sp.*) dari Pantai Selatan Daerah Cidaun Barat. Jurnal Bionatura Vol 8 No. 2. Hal : 152-160

Kersshaw E. E., Flier J.S., 2004. *Adipose Tissue as an Endocrine Organ,* The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism Willey and Son Publishing.

Lenny, S. 2006. Isolasi dan uji bioaktivitas kandungan kimia utama puding merah dengan Metode Uji Brine Shrimp. USU repository

Linna Y. I. Patellongi, G. S Lawrence, A. Wijaya, S. As'ad, 2011. Korelasi antara adiponektin dengan tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) pada pria Indonesia obes non-Diabetes. Majalah Kedokteran Indonesia, Vol. 61, No.1.

Maeda H, Hosokawa M, Sashima T. and Miyashita K. 2007. *Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay mice.* J. Agric Food Chem. Vol. 55. Hal : 7701-7706.

Mangoenprasodjo, A.S. 2005. *Seberapa Perlu Diet Seberapa Berat Proses yang Harus Dijalani*. Yogyakarta: Thinkfresh

Mi-Jin Yim, M. Hosokawa, Y. Mizushina, H. Yoshida, Y. Saito, dan K. Miyashita, 2011 *Suppressive Effects of Amarouciaxanthin A on 3T3-L1 Adipocyte Differentiation through Down-regulation of PPARγ and C/EBPr mRNA Expression.* J. Agric. Food Chem. Vol. 59. Hal : 1646–1652

Miyashita K, 2009. *The Carotenoid Fucoxanthin from Brown Seaweed Affects Obesity*. Vol. 21, No. 8/9 DOI 10.1002/lite.200900040.

Miyashita, S. N. Ishikawa, F. Beppu, T. Tsukui, Mi Abe and M. A. Hosokawa, 2011. *The Allenic Carotenoid Fucoxanthin, A Novel Marine Nutraceutical F Rom Brown Seaweeds*. J Sci Food Agric. Vol.91. Hal : 1166 – 1174

Muamar, H. A. 2009. Termostabilitas pigmen fukosantin, klorofil *a* dan ekstrak kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* terhadap suhu dan lama pemanasan yang berbeda. Skripsi Program Studi THP. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.

Mutisari A. 2011. Efek pemberian ekstrak daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan Sel-sel otak besar anak tikus secara *In Vitro*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.

Nadinah. 2008. Kinetika inhibisi ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens L.*) dan fraksinya terhadap enzim xanthin oksidase serta penentuan senyawa aktifnya. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Ninghayu. C. 2008. Peran adiponektin, inflamasi, resistensi insulin terhadap kejadian dislipidemia aterogenik. Forum Diagnosticum. Vol. 4 Hal : 1-7.

Nugroho. A. E. 2009. Review Hewan Percobaan Diabetes Mellitus : Patologi Dan Mekanisme Aksi Diabetogenik Animal Models Of Diabetes Mellitus : *Pathology And Mechanism Of Some Diabetogenics*. Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Jurnal Biodiversitas. Vol. 7, No. 4. 378-382

Nurcahyanti dan Limantara. 2007. Fukosantin sebagai antiobesitas. Jurnal Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang. Vol. 112.

Nurcahyo. H. 2011. Diklat Bioteknologi. Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Yogyakarta.

Orazio N. Gammone A. M. Gemello. E. Girolamo. M. Cusenza S. 2012. *Marine Bioactives* : *Pharmacological Properties and Potential Applications against Inflammatory Diseases*. Journal Marine Drugs. Vol 10. 812-833

Permana Hikmat. Sel Adiposit sebagai Organ Endokrin. F. K Universitas Padjadjaran RS Dr Hasan Sadikin. Bandung.

Pangestuti, R. L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. Kandungan dan aktivitas antioksidan fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh**.** Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami. Hal : 201- 209.

Price P. J, Gregory E. A. 1982. *Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. In Vitro*. Vol. 18 Hal : 576-584.

Purwono. 2011. Penatalaksanaan Obesitas. www.Medisinesia.com. Diakses Tanggal 1 Agustus 2012

Ratnawati. R, T. E. Hernowati, Tinny, dan Satuman, 2010. Respon proliferasi, diferensiasi dan ekspresi C/EBPα akibat paparan quercetien pada kultur preadiposit tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar secara *in vitro*. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing Tahun II. Universitas Brawijaya. Malang.

Riyacumala V. 2010. Kultur in vitro sel-sel otak besar (cerebrum) anak tikus. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor

Shenti K. J. 1999. *The Role of TNFα in adipocyte metabolism.* Seminars in Cell & Developmental Biology, Vol. 10. Hal : 19-29

Sulastry. F. 2006. Uji toksisitas akut yang diukur dengan penentuan LD50 ekstrak daun pegagan (*Centellaasiatica*) terhadap mencit BALB/C. Laporan Akhir Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang

Singagerda, L.K. 2009. Hewan uji dalam eksperimen farmakologi. "Metode Farmkologi dan Toksikologi". Program pasca sarjana, sekolah farmasi ITB. http://www.scribd.com/doc/55081717/Hewan-Uji-Dalam Eksperimen-Farmakologi. Diakses Tanggal 20 Mei 2012

Sulistyoningrum, E. 2010. Tinjauan molekular dan aspek klinis resistensi insulin. Mandala of Health. Vol. 4. No. 2

Surakhmad W. 1998. Metodologi Reseach III. Yogyakarta : Yayasan Penerbit Fakultas Psikologi UGM

Toto, Z. A. D, P. Rahayu, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2006. Identifikasi dan isolasi pigmen karotenoid berbagai jenis kuning telur unggas. Organsime. Vol. 2 Hal : 100-110

Triskayani W. 2010. Peranan sitokin pada proses destruksi jaringan periosdonsium. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara Medan

Valk JVD et al. 2004. *The human collection of fetal bovine serum and possibilities for Serum-free cell and tissue culture.* Toxicol *In Vitro.* Hal : 18:112

Widjayanti. L. 2009. Studi komposisi pigmen dan kandungan fukosantin pada alga coklat (*Sargassum duplicatum, Sargassum polycystum, Sargassum filipendula, Padina australis,* dan *Turbinaria conoides*). Skripsi. Program Studi THP Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang

Wikipedia. 2011[a]. Kultur Sel. http://www.wikipedia.org. Diakses Tanggal 10 Januari 2011 pukul 12.45 WIB

_____. 2011[b]. DMEM. http://www.wikipedia.org. Diakses Tanggal 10 Januari 2011 pukul 12.45 WIB

_____. 2011[c]. L-Glutamin. http://www.wikipedia.org. Diakses Tanggal 10 Januari 2011 pukul 12.45 WIB

_____. 2011[d]. Fetal bovine serum. http://www.wikipedia.org. Diakses Tanggal 10 Januari 2011 pukul 12.45 WIB

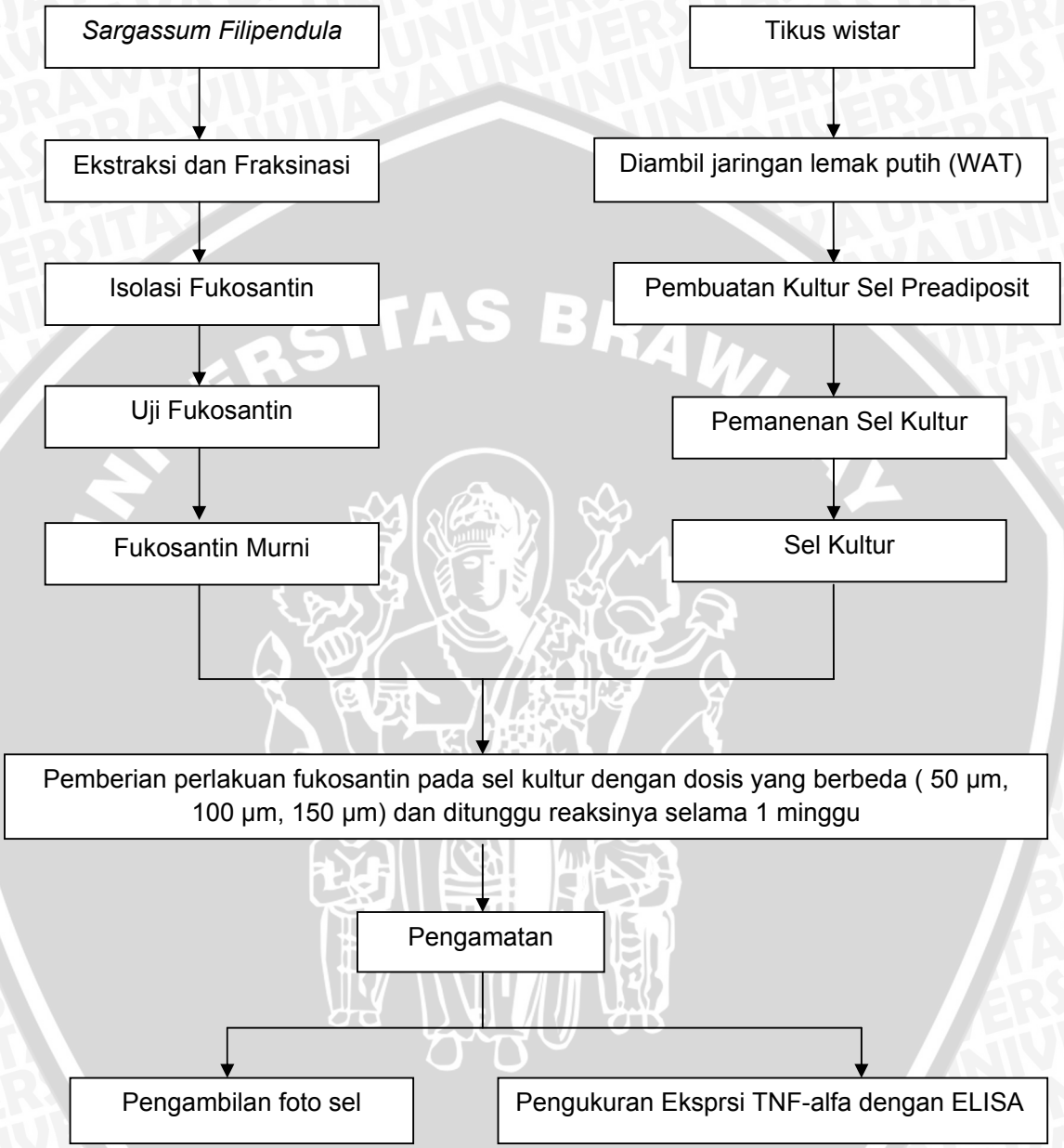
_____. 2012[e]. DMSO dan Emulsifier. http://www.wikipedia.org. Diakses Tanggal 11 Agustus 2012 pukul 10.11 WIB

Yan, X. Y. Chuda, M. Suzuki and T. Nagata. 1999. Fucoxanthina as The Mayor Antioxidant in *Hijika fujiformia*, a Commom Edible Seaweed. Biochem Vol. 63(3). Hal : 605-607

Yun, W. J. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature- A review. Phytochrmistry. Vol. 71. Hal : 1625-1641

Zipcodezoo. 2010. Klasifikasi *Sargassum filipendula*. www.zipcodezoo.com. Diakses Tanggal 16 Agustus 2010.

Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian



Lampiran 2. Komposisi dan Perhitungan Pembuatan Media Cair dan Media Kultur Lengkap

a. **Media cair**

Stok media cair yang akan dibuat sebanyak 80 ml

Komponen	Komposisi
DMEM	1,08 gram
Pen-Strep	1 ml
Natrium Bikarbonat	4 ml
L-Glutamin	0,720 ml
Akuabides	80 ml

***Catatan : DMEM 13,5 gram untuk stok media 1 liter**

DMEM = $\frac{13,5}{1000}$ **x 80 = 1,08 gram**

b. **Media Kultur Lengkap**

Komponen	Komposisi
FBS 10%	1,5 ml

***Catatan : Pembuatan FBS 10% akan diampur 15 ml DMEM**

FBS 10 % = $\frac{10}{100}$ **x 15 = 1,5**

Lampiran 3. Data dan Perhitungan Kadar Fukosantin

Alga Coklat	Berat Sampel (gram)	Absorbansi	Kadar Fukosantin (µg fukosantin/g)
Sargassum filipendula	100	0,9883	0,8391

Perhitungan Kadar Fukosantin (Gross, 1991)

$$\mu g \text{ fukosantin/g} = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times G}$$

dimana : A = Absorbansi tertinggi

V = Total volume pelarut yang ditambahkan saat pengenceran

G = Berat sampel

$A_{1cm}^{1\%}$ = Koefisien absorbansi (ketetapan)

$A_{1cm}^{1\%}$ aceton = 1060, $A_{1cm}^{1\%}$ methanol = 2500, $A_{1cm}^{1\%}$ etanol = 1140

Absorbansi 0,9883

$$\mu g \text{ fukosantin/g} = \frac{0{,}9883 \times 9 \times 10^6}{1060 \times 100 \times 100} = 0{,}839123$$

Lampiran 4. Data dan Perhitungan Rendemen Fukosantin

Alga Coklat	Berat Sampel (gram)	Volume Ekstrak (ml)	Kadar Fukosantin (µg fukosantin/g)	% Rendemen
Sargassum filipendula	100	735	0,839123	0,01233

Perhitungan Rendemen Fukosantin (Gross, 1991)

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{kadar } \textit{crude} \text{ fukosantin x fp x volume ekstrak}}{\text{berat sampel}} \text{ x } 100\,\%$$

fp = faktor pengenceran

Rendemen

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{0{,}839123\ \mu g/g \times 20 \times 735\ ml}{100 \times 10^6\ \mu g} \times 100\% = 0{,}01233\ \%$$

Lampiran 5. Pembuatan Larutan

Larutan Ekstraksi

Metanol : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 300 ml

Metanol $= \frac{7}{10} \times 300 = 210$ ml

Aseton $= \frac{3}{10} \times 300 = 90$ ml

Larutan Kolom

- Heksan : Etil Asetat (8 : 2 v/v) dalam 200 ml

Heksan $= \frac{8}{10} \times 200 \text{ ml} = 160 \text{ ml}$

Etil Asetat $= \frac{2}{10} \times 200 \text{ ml} = 40 \text{ ml}$

- Heksan : Etil Asetat (7 : 3 v/v) dalam 200 ml

Heksan $= \frac{7}{10} \times 200 \text{ ml} = 140 \text{ ml}$

Etil Asetat $= \frac{3}{10} \times 200 \text{ ml} = 60 \text{ ml}$

- Heksan : Etil Asetat (6 : 4 v/v) dalam 200 ml

Heksan $= \frac{6}{10} \times 200 \text{ ml} = 120 \text{ ml}$

Etil Asetat $= \frac{4}{10} \times 200 \text{ ml} = 80 \text{ ml}$

- Heksan : Etil Asetat (5 : 5 v/v) dalam 200 ml

Heksan $= \frac{5}{10} \times 200 \text{ ml} = 100 \text{ ml}$

Etil Asetat $= \frac{5}{10} \times 200 \text{ ml} = 100 \text{ ml}$

Larutan KLT

- Heksan : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 5 ml

Heksan $= \frac{7}{10} \times 5 \text{ ml} = 3{,}5 \text{ ml}$

Aseton $= \frac{3}{10} \times 5 \text{ ml} = 1{,}5 \text{ ml}$

Lampiran 6. Data Kromatografi Kolom

Tabung Ke-	Menit	Warna	Pelarut	ml Pelarut	Jumlah Pelarut Tiap Tabung	Senyawa
(9/01/12) 1	09.10	Bening	Heksan : Etil asetat 8 :2	100 ml	15 ml	
2	09.34	Bening			15 ml	
3	09.59	Bening			15 ml	
4	10.30	Bening			15 ml	
5	10.53	Bening kuning			15 ml	
6	11.09	Kuning			15 ml	
7	11.17	Kuning			15 ml	
8	11.19	Kuning muda			15 ml	
9	12.02	Kuning bening			15 ml	
10	12.14	Kuning bening			15 ml	
11	12.39	Hijau bening	Heksan : Etil asetat 7:3	200 ml	15 ml	
12	13.04	Hijau bening			15 ml	
13	13.27	Bening			15 ml	
14	13.54	Bening			15 ml	
15	14.23	Bening			15 ml	
16	14.55	Bening			15 ml	
17	15.23	Hijau muda			15 ml	
18	15.56	Hijau			15 ml	
19	16.33	Hijau kebiruan			15 ml	
20	17.05	Hijau kebiruan			15 ml	
21	17.29	Hijau kebiruan			15 ml	
22	18.01	Hijau kebiruan			15 ml	
23	18.10	Hijau kebiruan			15 ml	
24	18.21	Hijau kebiruan			15 ml	
25	18.33	Hijau kebiruan			15 ml	
26	18.45	Hijau muda kekuningan	Heksan : Etil asetat 6:4		15 ml	
(10/1/12) 27	09.00	Hijau muda kekuningan			15 ml	

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

28	09.10	Hijau muda kekuningan			15 ml	
29	09.20	Hijau muda kekuningan			15 ml	
30	09.29	Hijau muda kekuningan			15 ml	
31	09.31	Hijau kuning muda			15 ml	
32	09.42	Hijau kuning muda			15 ml	
33	09.50	Hijau kuning muda			15 ml	
34	10.01	Hijau kuning muda			15 ml	
35	10.10	Hijau kuning muda			15 ml	
36	11.07	Kuning bening	Heksan : Etil asetat 5:5	100 ml (1)	15 ml	
37	11.15	Kuning bening			15 ml	
38	11.25	Kuning bening			15 ml	
39	11.37	Kuning-agak orange			15 ml	
40	**11.49**	**Orange**			**15 ml**	
41	**12.00**	**Orange**			**15 ml**	
42	**12.15**	**Orange**			**15 ml**	
43	**12.25**	**Orange**	**Heksan : Etil asetat 5:5**	**100 ml (2)**	**15 ml**	
44	**12.42**	**Orange**			**15 ml**	
45	**12.57**	**Orange**			**15 ml**	
46	**13.09**	**Orange**			**15 ml**	
47	13.20	Kuning tua			15 ml	
48	13.32	Kuning tua			15 ml	
49	13.43	Kuning tua			15 ml	
50	13.58	Kuning tua			15 ml	
51	14.14	Kuning tua	Heksan : Etil asetat 5:5	100 ml (3)	15 ml	
52	14.30	Kuning			15 ml	
53	14.47	Kuning muda			15 ml	

Lampiran 7. Pembuatan Dosis Fukosantin pada Pengujian Antiobesitas

Fukosantin = 20 mg

Stok Fukosantin 300 mM = 300.000 µM

$$300 \text{ mM} = \frac{\text{berat fukosantin}}{\text{BM fukosantin}} \times \frac{1000}{\text{ml}}$$

$$300 \text{ mM} = \frac{20}{658,92} \times \frac{1000}{ml}$$

300 x 658,92 x ml = 20 x 1000

$$\text{Ml} = \frac{20.000}{197676}$$

= 0,1012 ml

Stok Quersetin 125 mM = 125.000 µM

$$125 \text{ mM} = \frac{mg}{BM\ Quercetin} \times \frac{1000}{ml}$$

$$125 \text{ mM} = \frac{mg}{338,27} \times \frac{1000}{0,1\ ml}$$

125 x 338,27 x 0,1 = mg x 1000

$$mg = \frac{4228,4}{1000}$$

= 0,0042 gram

= 0,0042 mg

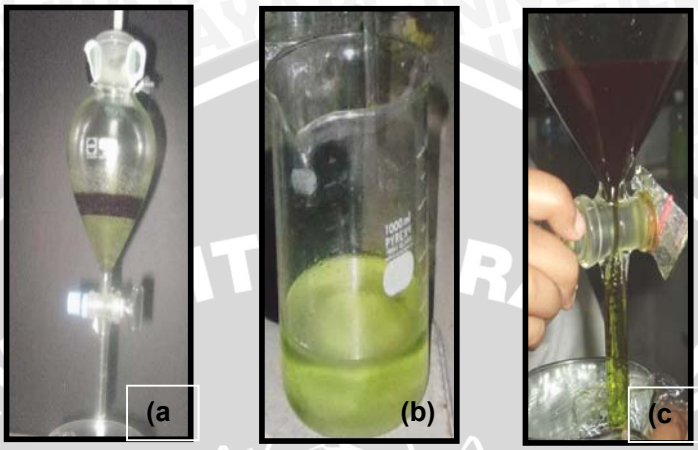
Perlakuan control (+) **Quercetin = 125 µM** $M_1V_1 = M_2V_2$ $125.000 \times V_1 = 125 \times 2000$ µl $V_1 = \frac{125 \times 2000}{125.000}$ = 2 µl (3x)	Control (-) Sel adiposit tanpa perlakuan
Fukosantin = 50 µM $M_1V_1 = M_2V_2$ $300.000 \times V_1 = 50 \times 2000$ $V_1 = \frac{50 \times 2000}{300.000}$ = 0,33 µl (3x)	**Fukosantin = 100 µM** $M_1V_1 = M_2V_2$ $300.000 \times V_1 = 100 \times 2000$ $V_1 = \frac{100 \times 2000}{300.000}$ = 0,66 µl (3x)
Fukosantin = 150 µM $M_1V_1 = M_2V_2$ $300.000 \times V_1 = 150 \times 2000$ $V_1 = \frac{150 \times 2000}{300.000}$ = 1 µl (3x)	

Lampiran 8. Proses Isolasi Fukosantin

Proses Ekstraksi Fukosantin dengan Metode Maserasi
a). Pencucian Rumput Laut , b) Pengeringan Rumput Laut, c) Pemotongan Rumput Laut, d) Penghalusan Rumput Laut, e) Pencapuran dengan pelarut, f) maserasi, g) Penguapan Pelarut dengan *rotarry evaporator*, h) Pengeringan dengan Nitrogen

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 9. Hasil Fraksinasi & Pigmen Fukosantin Hasil Isolasi Kromatografi



Gambar Proses Fraksinasi
a.Dua Fase Yang Terbentuk, b. Hasil Fase Atas, c. Hasil Fase Bawah

Gambar Pigmen Fukosantin Hasil Isolasi Kromatografi Kolom

Lampiran 10. Isolasi Sel Preadiposit Tikus, Kultur Sel Preadiposit dan Pemanenan Sel

a). Pembedahan tikus, b). Sel Preadiposit, c). Pencucian Sel Preadiposit, d). Penumbuhan Sel Preadiposit Pada Media kultur, e). Penumbuhan pada inkubator CO_2, f).Pengamatan Sel Preadiposit, g) Pemanenan Sel Preadiposit, h) Pemberian perlakuan pada Sel Preadiposit

repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 11. Analisa Data Nilai TNF-alfa

10.1. Absorbansi TNF-alfa

kode	Nilai Ulangan Absorbansi TNF Alfa					SD
	1	2	3	total	rata-rata	
K-	137,833	144,500	147,833	430,166	143,389	5,092
Q	127,833	157,833	159,500	445,166	148,389	17,821
P1	167,833	116,167	76,167	360,167	120,056	45,957
P2	59,500	84,500	116,167	260,167	86,722	28,399
P3	171,167	156,167	162,833	490,167	163,389	7,515
Jumlah				1985,833		

FK	262902,2
JK total	17363,61
JK Perlakuan	10726,61
JK galat	6637,002

10.2. Tabel Anova

SK	db	JK	KT	Fhitung	F 5 %	F 1 %
Perlakuan	4	10726,61	2681,653	4,040	3,48 *	5,99
Galat	10	6637,00	663,700			
Total	14	17363,61				

Keterangan:

^{tn} = Tidak berbeda nyata

*** = Beda nyata**

**** = Beda sangat nyata**

Anova: Single Factor

SUMMARY

Groups	*Count*	*Sum*	*Average*	*Variance*
K-	3	430,16	143,388	25,9263
Q	3	445,16	148,388	317,5963
P1	3	360,16	120,055	2112,005
P2	3	260,16	86,7223	806,4913
P3	3	490,16	163,389	56,4818

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	10726,61	4	2681,653	4,040459	0,033362	3,47805
Within Groups	6637,002	10	663,7002			
Total	17363,61	14				

10.3. Uji Lanjut Beda Nyata Terkecil

BNJ 5% = Q $_{(perlakuan,dbGalat)}$ X $\sqrt{\frac{KT\ galat}{Ulangan}}$ = 46,86867

Perlakuan	**Rerata Perlakuan**					Notasi
	P2 (86,722)	**P1** (120,056)	**K-** (143,389)	**Q** (148,389)	**P3** (163,389)	
P2 (86,722)	0					a
P1 (120,056)	33,334	0				ab
K- (143,389)	56,667	23,333	0			b
Q (148,389)	61,667	28,333	5	0		b
P3 (163,389)	76,667	43,333	20	15	0	b

Lampiran 12. Glosarium

Disfungsi adiposit	Gejala kelainan fungsi kerja dari adiposit (jaringan lemak) yang menyebabkan tergangunya sistem kerja dari jaringan adiposit
Epidemi	epidemi (dari bahasa Yunani epi- pada + demos rakyat) adalah penyakit yang timbul sebagai kasus baru pada suatu populasi tertentu manusia, dalam suatu periode waktu tertentu dn merupakan istilah umum menyebutkan suatu kejadian penyebaran penyakit pada daerah yang luas dan pada orang yang luas
Mediator inflamasi	Merupakan sarana atau media yang memicu terjadinya inflamasi misalnya media Ciklosigenase 2 (COX-2) dan enzim Induksi Nitrit okside sintase (iNOS) pada terjadinya inflamasi pada penderita obesitas
Mekanisme molekular	Suatu kondsi sistem kerja yang melibatkan komponen atau interaksi molekul baik itu sifat atau struktur molekul ditinjau dari fokus kajian kimia maupun fisika
Nutrigenom	Ilmu yang mempelajari hubungan antara interaksi makanan dengan gen dalam tubuh
Patologis	Merupakan cabang bidang kedokteran yang berkaitan dengan ciri-ciri dan perkembangan

	penyakit melalui analisis perubahan fungsi atau keadaan bagian tubuh.
Sel kultur preadiposit	Kultur sel jaringan lemak yang diambil dari jaringan lemak fibroblas
Sindroma metabolik	Keadaan klinis dimana pada seseorang terdapat sekumpulan kelainan metabolik, antara lain kelainan kadar lipid, peningkatan kadar glukosa, peningkatan kadar asam urat, peningkatan tekanan darah, dan kegemukan
Tumor Necrosis Factor-Alpha	Sitokin utama yang berperan dalam proses imunomodulator dan respon inflamasi yang disekresikan oleh makrofag dan sel adiposa
White Adipose Tissue (WAT)	Jaringan lemak putih yang berisi tetes lemak yang banyak sehingga penampakan terlihat nucleus terdesak ke tepi. Menyimpan terutama trigliserid dan kolesterol ester