

## Aktivitas Antiinflamasi *Crude Extract* Fukoidan dari *Sargassum crassifolium* pada Sel RAW 264.7 yang Diinduksi LPS

### Anti-inflammatory Activity of Fucoidan Crude Extract from *Sargassum crassifolium* Against LPS-induced RAW 264.7 Cells

Pangartika Hikariastri<sup>1\*</sup>, Hendig Winarno<sup>1,2</sup>, Kusmardi<sup>3</sup>, Dian Ratih Laksmiawati<sup>1</sup>, Syamsudin Abdullah<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta, Indonesia

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

\*E-mail: pangar.hikari@gmail.com

Diterima: 23 Maret 2019

Direvisi: 20 Juni 2019

Disetujui: 6 Agustus 2019

#### Abstrak

Inflamasi merupakan respon tubuh yang mendasari berbagai penyakit kronis. Aktivasi makrofag oleh stimulus inflamasi akan memicu pelepasan berbagai mediator inflamasi, sehingga mediator inflamasi menjadi target pengembangan obat antiinflamasi yang menjanjikan. Penelitian terdahulu menunjukkan aktivitas antiinflamasi fukoidan melalui penghambatan berbagai mediator proinflamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antiinflamasi *crude extract* fukoidan dari *Sargassum crassifolium* yang dikumpulkan dari perairan Garut dengan melihat pengaruhnya terhadap sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. Fukoidan merupakan senyawa polisakarida dengan karakteristik beragam yang tergantung pada spesies asal dan metode ekstraksi yang digunakan. Karakteristik tersebut memengaruhi aktivitas farmakologi fukoidan. *Sargassum crassifolium* yang dikumpulkan dari Garut-Jawa Barat diekstraksi dengan larutan HCl 0,1 M dan diendapkan dengan etanol hingga diperoleh *crude extract* fukoidan. *Crude extract* diujikan pada sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS untuk mengevaluasi efek terhadap TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 dengan menggunakan metode ELISA. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak uji menurunkan kadar TNF- $\alpha$  pada pemberian dosis 25 dan 50  $\mu\text{g/ml}$ , serta menurunkan kadar IL-1 $\beta$  dan IL-6 pada dosis 25  $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrak uji dosis 50  $\mu\text{g/ml}$  tidak menurunkan kadar IL-1 $\beta$  dan IL-6. Penelitian ini membuktikan bahwa *crude extract* fukoidan dari *S. crassifolium* pada dosis 25  $\mu\text{g/ml}$  memiliki aktivitas antiinflamasi terhadap sel RAW 264.7.

**Kata kunci:** *Sargassum crassifolium*; *Crude extract* fukoidan; Antiinflamasi; Sel RAW 264.7

#### Abstract

Inflammation is known as the basic mechanism underlying various chronic diseases. Macrophage activation by inflammatory stimulus induces the release of inflammatory mediators, thus the mediators becoming a promising target of anti-inflammatory drug development. Previous studies indicated that fucoidan has anti-inflammatory activity by inhibiting the release of proinflammatory mediators. The aim of this study is determining anti-inflammatory activity of fucoidan crude extract form *Sargassum crassifolium* Garut waters by observing its effect on proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. fucoidan is a polysaccharide substance which has various characteristics, depending on the source and the extraction method which is influencing its bioactivity. *Sargassum crassifolium* collected from Garut-West Java is extracted using diluted HCl 0,1 M and precipitated with ethanol to obtain fucoidan crude extract. The crude extract is tested on LPS-induced RAW 264.7 cells to evaluate its effect on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 level using ELISA method. The result showed that fucoidan crude extract decreased the level of TNF- $\alpha$  by the dose of 25 and 50  $\mu\text{g/ml}$ , and decreased the level of IL-1 $\beta$  and IL-6 by the dose of 25  $\mu\text{g/ml}$ . The dose of 50  $\mu\text{g/ml}$  failed to inhibit IL-1 $\beta$  and IL-6 production. This study showed that fucoidan crude extract derived from *S. crassifolium* has anti-inflammatory activity to RAW 264.7 cells by the dose of 25  $\mu\text{g/ml}$ .

**Keyword:** *Sargassum crassifolium*; Fucoidan crude extract; Anti-inflammation; RAW 264.7 cells

## PENDAHULUAN

Respon inflamasi merupakan bentuk proteksi tubuh terhadap stimulus tertentu seperti infeksi mikroba dan kerusakan jaringan. Akan tetapi, jika terjadi terus-menerus, respon inflamasi akan merusak jaringan tubuh hingga menyebabkan disfungsi organ terkait (*functio laesa*) dan menimbulkan berbagai penyakit kronis seperti aterosklerosis, diabetes tipe 2, *rheumatoid arthritis*, dan alzheimer.<sup>1,2</sup>

Makrofag merupakan sel imun bawaan yang berperan penting dalam inflamasi. Aktivasi makrofag oleh stimulus inflamasi akan memicu pelepasan berbagai mediator inflamasi, salah satunya sitokin. Sitokin proinflamasi mempercepat progresi inflamasi melalui peningkatan permeabilitas sel endotel dan rekrutmen leukosit, terutama neutrofil, ke titik inflamasi. Berkembangnya pengetahuan mengenai peran inflamasi dalam patofisiologi berbagai penyakit menjadikan mediator inflamasi sebagai target pengembangan obat.<sup>1,3,4</sup>

Fukoidan merupakan senyawa polisakarida kompleks yang ditemukan dalam ganggang cokelat. Secara umum, fukoidan tersusun atas *sulfated fucose* sebagai komponen utama dan monomer karbohidrat lainnya dalam jumlah yang lebih sedikit. Fukoidan dari spesies ganggang cokelat yang berbeda akan memiliki komponen penyusun yang berbeda. Selain itu, karakteristik fukoidan juga dipengaruhi oleh metode ekstraksi yang digunakan. Perbedaan karakteristik tersebut menyebabkan keberagaman aktivitas farmakologis fukoidan. Salah satu aktivitas biologi fukoidan yang banyak diteliti adalah antiinflamasi. Secara molekular, fukoidan diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), penghambatan stimulasi sitokin proinflamasi dan molekul adesi sel, serta penghambatan aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B.<sup>5-8</sup>

Penelitian sebelumnya telah membuktikan aktivitas antiinflamasi

fukoidan dari berbagai spesies ganggang cokelat terhadap sitokin proinflamasi, antara lain *S.horneri*, *Laminaria japonica*, *Fucus vesiculosus*, dan *Undaria pinnatifida*. Akan tetapi belum ada yang meneliti aktivitas *S.crassifolium* terhadap sitokin proinflamasi.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antiinflamasi *crude extract* fukoidan dari *S.crassifolium* yang dikumpulkan dari perairan Garut dengan melihat pengaruhnya terhadap sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. *Sargassum crassifolium* diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi asam, hingga diperoleh *crude extract* fukoidan. Penelitian dilakukan secara *in vitro* menggunakan sel makrofag RAW 264.7 yang distimulasi lipopolisakarida (LPS).

## METODE

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah Universal *microplate reader* (Bio-Tek<sup>®</sup> ELX 800<sup>™</sup>). Bahan yang digunakan antara lain sel RAW 264.7 (ATCC<sup>®</sup>TIB-71<sup>™</sup>), RPMI (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biosera), penisilin-streptomisin (Sigma), trypsin-EDTA (Sigma), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Bio Basic), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma), Lipopolisakarida (LPS) (Sigma), Mouse TNF- $\alpha$ ELISA *kit*, Mouse IL-1 $\beta$  ELISA *kit*, Mouse IL-6 ELISA *kit* (Elabscience).

### Ekstraksi fukoidan

*Crude extract* fukoidan diperoleh dari penelitian sebelumnya, melalui ekstraksi ganggang cokelat *S.crassifolium* yang dikumpulkan dari Pantai Cicalobak, Desa Karang Wangi, Garut, Jawa Barat pada bulan Oktober 2017. *Sargassum crassifolium* diekstraksi dengan larutan HCl 0,1 M, kemudian diendapkan dengan etanol. Endapan dikeringkan dengan

*freeze-dryer*. Crude extract fukoidan yang diperoleh dari penelitian sebelumnya memiliki rendemen sebesar 1,12% dengan kadar fukoidan sebesar 9,44%; kadar sulfat 31,31%; dan kadar total karbohidrat sebesar 21,41%.<sup>9</sup> Sebelum digunakan, crude extract fukoidan disimpan dilemari pendingin pada suhu 4 °C.

### **Kultur sel**

Sel RAW 264.7 ditumbuhkan dalam RPMI dengan suplementasi 10% FBS dan 1% penisilin-streptomisin. Kultur sel diinkubasi pada suhu 37 °C, kondisi *humidified atmosphere* dan 5% CO<sub>2</sub> hingga sel konfluen, kemudian sel dipanen dengan *trypsin*-EDTA.<sup>10</sup>

### **Uji viabilitas**

Uji viabilitas sel dilakukan dengan metode MTT untuk menentukan dosis uji yang tidak bersifat toksik terhadap sel RAW 264. Sebanyak 5 x 10<sup>3</sup> sel RAW 264.7 per *well* ditanam dalam *96-well plate* lalu diinkubasi selama 24 jam. Medium dibuang, kemudian sel diinkubasi dengan bahan uji pada variasi konsentrasi 0; 0,49; 0,98; 1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 µg/mL medium selama 24 jam. Medium dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS.

Sebanyak 10 µL larutan MTT 5 mg/mL ditambahkan ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi kembali selama 4 jam. Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dalam 100 µL DMSO. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm.<sup>11</sup> Viabilitas sel dinyatakan dalam persen dengan membandingkan serapan kelompok bahan uji dengan kontrol. Setiap konsentrasi dilakukan replikasi 3 kali dan data yang disajikan adalah rerata persentase viabilitas ± standar deviasi (SD).

### **Aktivasi inflamasi menggunakan lipopolisakarida**

Sel RAW 264.7 ditanam sebanyak 5 x 10<sup>5</sup> sel per *well* dalam *6-well plate* dan diinkubasi selama 24 jam. Medium

dibuang dan pada sel ditambahkan larutan senyawa uji hingga diperoleh konsentrasi senyawa uji 25 dan 50 µg/mL medium, lalu diinkubasi selama 2 jam. Larutan LPS ditambahkan ke dalam masing-masing *well* hingga diperoleh konsentrasi 1 µg/mL medium, dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Medium diambil dan disentrifugasi pada 2000 x g selama 20 menit pada suhu 2-8 °C. Bagian supernatan diambil dan disimpan pada suhu -80 °C untuk pengukuran kadar TNF-α, IL-1β, dan IL-6.

### **Pengukuran kadar TNF-α, IL-1β, dan IL-6**

Kadar sitokin diukur dengan metode *sandwich* ELISA menggunakan ELISA kit *Elabscience*. Sebanyak 100 µL larutan standar pada berbagai konsentrasi (untuk kurva baku) dan sampel dimasukkan ke dalam masing-masing *well* yang telah dilapisi (*pre-coated*) dengan antibodi spesifik, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 90 menit. Cairan dari setiap *well* dibuang, selanjutnya dengan segera sebanyak 100 µL *biotinylated detection antibody working solution* ditambahkan dan *plate* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Cairan dari setiap *well* dibuang, kemudian dicuci dengan 350 µL larutan *wash buffer* sebanyak 3 kali. Sebanyak 100 µL HRP *conjugate working solution* ditambahkan ke dalam setiap *well*, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C. Cairan kembali dibuang, lalu *well* dicuci dengan 350 µL larutan *wash buffer* sebanyak 5 kali. Sebanyak 90 µL reagen substrat ditambahkan ke dalam setiap *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C terlindung cahaya. Selanjutnya, sebanyak 50 µL *stop solution* ditambahkan ke dalam masing-masing *well*. Nilai *optical density* (OD) setiap *well* diukur dengan segera menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm.<sup>12-14</sup> Pengujian dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan data yang disajikan adalah rerata ± SD.

**Analisis statistik**

Analisis data dilakukan dengan *one way ANOVA* dan uji *post hoc* Duncan, menggunakan program IBM SPSS Statistics versi 25.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Uji viabilitas**

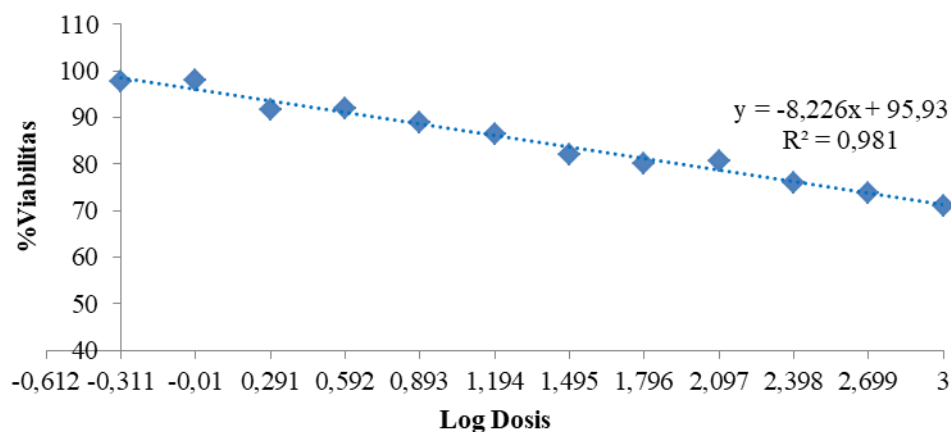
Uji viabilitas sel RAW 264.7 pada pemberian *crude extract* fukoidan menunjukkan adanya penurunan jumlah sel hidup seiring dengan peningkatan dosis. Nilai persentase viabilitas secara berurut dari dosis terkecil adalah  $97,79 \pm 0,36$ ;  $98,02 \pm 4,86$ ;  $91,63 \pm 0,36$ ;  $92,02 \pm 1,43$ ;  $88,78 \pm 1,07$ ;  $86,41 \pm 0,36$ ;  $82,15 \pm 0,83$ ;  $80,09 \pm 0,41$ ;  $80,73 \pm 2,02$ ;  $75,99 \pm 0,83$ ;  $73,78 \pm 1,71$ ; dan  $71,09 \pm 0,63\%$ .

Dosis yang menghasilkan persentase viabilitas dibawah 80% dikategorikan sebagai dosis yang bersifat toksik terhadap sel.<sup>15-17</sup> Uji viabilitas, menunjukkan dosis 0-125 µg/mL merupakan dosis yang aman terhadap sel RAW 264.7 dengan persentase viabilitas di atas 80%; sedangkan dosis 250, 500, dan 1000 µg/mL menghasilkan persentase viabilitas di bawah 80%. Untuk menentukan dosis maksimal yang menghasilkan viabilitas

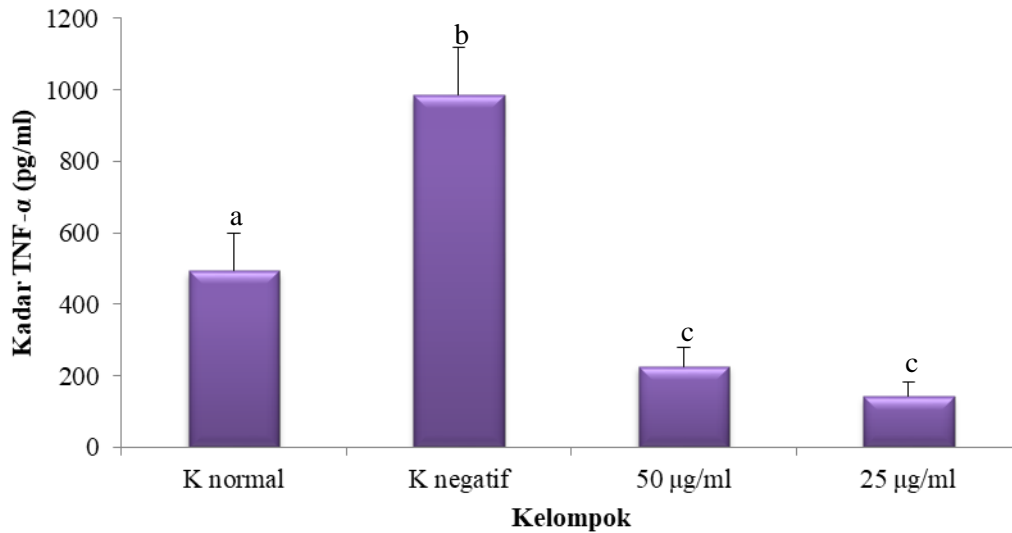
sebesar 80%, dibuat persamaan garis linear antara log dosis sebagai *x* dan persentase viabilitas sebagai *y* (Gambar 1). Nilai 80 dimasukkan sebagai *y* dalam persamaan garis, sehingga diperoleh nilai antilog *x* sebesar 86 µg/mL. Dosis ini merupakan dosis maksimal yang dapat digunakan. Penelitian ini menggunakan dosis 25 dan 50 µg/mL untuk uji antiinflamasi.

**Uji antiinflamasi**

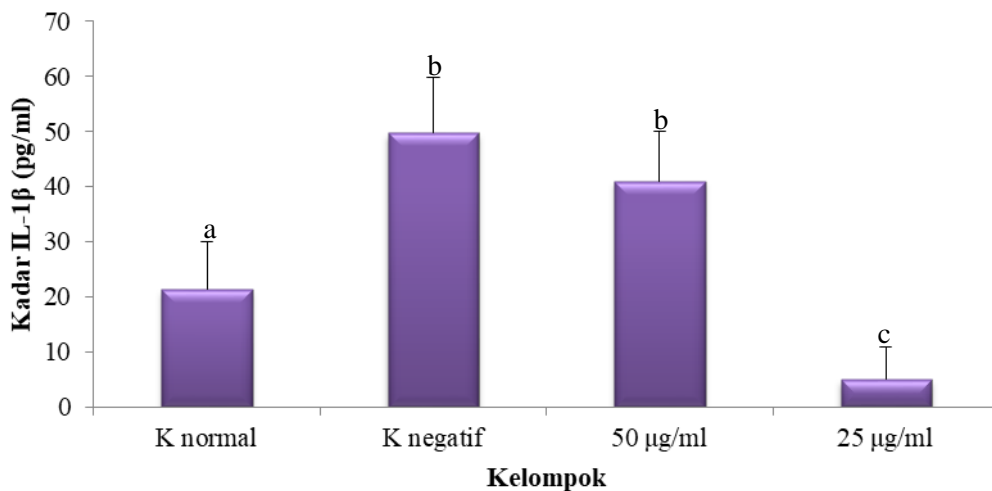
Penelitian ini menunjukkan LPS terbukti meningkatkan kadar TNF-α, IL-1β, dan IL-6 secara signifikan dibandingkan dengan sel RAW 264.7 normal (*p* < 0,05) (Gambar 2-4). Kadar TNF-α pada kelompok yang diberi bahan uji *crude extract* fukoidan secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif (*p* < 0,05) dengan nilai sebesar  $227,27 \pm 51,32$  pg/mL pada kelompok dosis 50 µg/mL dan  $142,17 \pm 39,95$  pg/mL pada kelompok dosis 25 µg/mL. Persentase penghambatan tertinggi diperoleh pada dosis 25 µg/mL yaitu sebesar  $85,57 \pm 4,05\%$ , sedangkan pada dosis 50 µg/mL persentase penghambatan TNF-α yang dihasilkan sebesar  $76,94 \pm 5,21\%$ .



**Gambar 1. Kurva regresi linear antara log dosis dengan persentase viabilitas**



**Gambar 2. Kadar TNF- $\alpha$  pada sel RAW 264.7 normal, sel stimulasi LPS, dan sel stimulasi LPS yang diberi bahan uji dosis 50  $\mu$ g/mL dan 25  $\mu$ g/mL.**

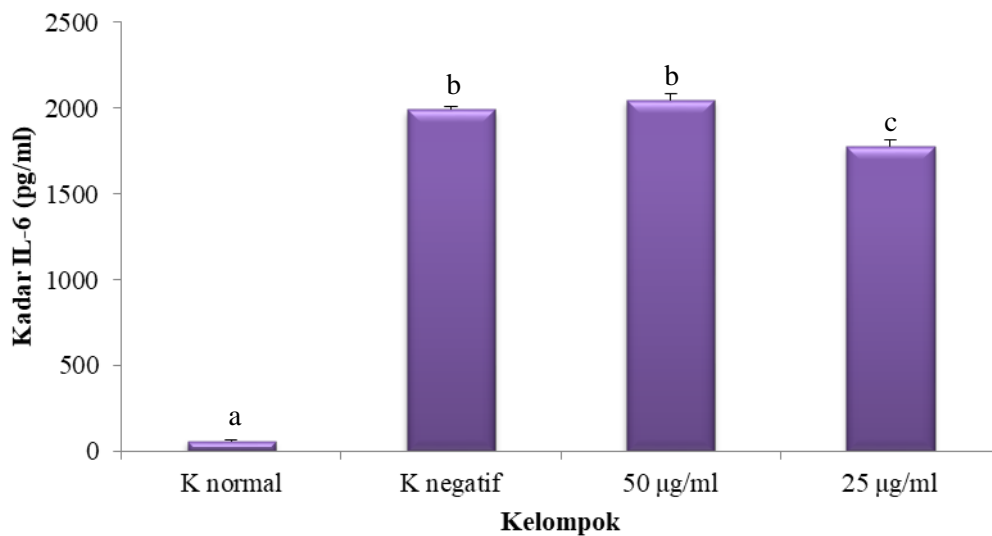


**Gambar 3. Kadar IL- $\beta$  pada sel RAW 264.7 normal, sel stimulasi LPS, dan sel stimulasi LPS yang diberi bahan uji dosis 50  $\mu$ g/mL dan 25  $\mu$ g/mL.**

Pemberian bahan uji dosis 50  $\mu$ g/mL pada sel RAW 264.7 tidak menghasilkan penurunan kadar IL-1 $\beta$  yang signifikan. Pada dosis 25  $\mu$ g/mL, kadar IL-1 $\beta$  secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif ( $p < 0,05$ ), yaitu sebesar  $4,93 \pm 5,99$  pg/mL dengan nilai persentase penghambatan mencapai  $90,08 \pm 12,05\%$ . Kadar IL-6 pada pemberian bahan uji dosis 50  $\mu$ g/mL tidak menunjukkan perbedaan dengan kontrol negatif. Pada dosis 25  $\mu$ g/mL, kadar IL-6 yang dihasilkan sel sebesar  $1779,29 \pm 38,15$  pg/mL dengan persentase

penghambatan sebesar  $10,70 \pm 1,91\%$ . Hasil ini signifikan secara statistik ( $p < 0,05$ ).

Secara teoritis, fukoidan memiliki aktivitas menekan berbagai rute inflamasi antara lain pembentukan ROS, stimulasi sitokin proinflamasi dan molekul adesi, serta aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B.<sup>5</sup> Penelitian ini membuktikan efektivitas *crude extract* fukoidan dalam menekan jumlah sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 yang dihasilkan oleh sel makrofag pada pemberian dosis rendah yaitu 25  $\mu$ g/mL.



**Gambar 4. Kadar IL-6 pada sel RAW 264.7 normal, sel stimulasi LPS, dan sel stimulasi LPS yang diberi bahan uji dosis 50 µg/mL dan 25 µg/mL**

Beberapa penelitian menunjukkan spesies ganggang cokelat lainnya telah menunjukkan aktivitas yang serupa. Ekstrak polisakarida dari *S. Horneri* yang diekstraksi dengan metode *enzymatic digest* menekan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  dengan pola *dose-dependent* pada model uji yang serupa melalui penghambatan fosforilasi p38 dan ERK pada jalur MAPK dan penghambatan translokasi NF- $\kappa$ B p50 dan p65 ke nukleus.<sup>18</sup>

Penelitian Jeong *et al.* terhadap fukoidan dari *Fucus vesiculosus* (Sigma Aldrich) pada model uji yang sama menunjukkan bahwa fukoidan menghambat transkripsi gen NO, PGE2, COX2, TNF- $\alpha$ , dan IL-1 $\beta$ , yang sejalan dengan penghambatan translokasi nuklear NF- $\kappa$ B.<sup>19</sup> Hwang *et al.*, menunjukkan ekstrak polisakarida dari *S. hemiphyllum* yang diekstraksi dengan air panas dapat menghambat IL-1 $\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$  pada model uji *in vitro* yang sama. Pengujian dengan *western blot* menunjukkan bahwa ekspresi NF- $\kappa$ B p65 terhambat.<sup>20</sup>

Kim *et al.* menyatakan bahwa fukoidan berbobot molekul rendah yang diambil dari ganggang cokelat *Undaria pinnatifida* menekan produksi IL-1 $\beta$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$

pada sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS dengan pola *dose-dependent* melalui penghambatan jalur MAPK. Hal ini ditunjukkan dengan penurunan aktivasi p38 MAPK, ERK2, dan JNK.<sup>21</sup>

Sebagai stimulus inflamasi, LPS bekerja melalui interaksi dengan TLR4 dan menyebabkan stimulasi jalur inflamasi MAPK. Setelah aktivasi MAPK oleh LPS, terjadi fosforilasi I- $\kappa$ B melalui I- $\kappa$ B kinase yang menyebabkan pemecahan kompleks I- $\kappa$ B yang diikuti dengan aktivasi NF- $\kappa$ B. Kemudian NF- $\kappa$ B bertranslokasi ke nukleus dan mengaktifkan transkripsi berbagai gen antara lain COX-2, molekul adesi, TNF- $\alpha$ , iNOS, lipoksigenase, IL-6, IL-1, kemokin, dan mediator proinflamasi lainnya.<sup>4,5,22</sup> NF- $\kappa$ B dan TNF- $\alpha$  memiliki kaitan timbal balik yang positif dan menjadi kunci kondisi inflamasi kronis. Interaksi TNF- $\alpha$  dengan reseptor TNF mengaktifkan jalur inflamasi MAPK. Hal ini menjelaskan kemampuan TNF- $\alpha$  untuk menginduksi sitokin inflamasi lainnya, antara lain IL-6 dan IL-8. IL-6 juga dapat diinduksi oleh interaksi IL-1 $\beta$  dengan reseptor IL-1, yang juga mengaktifkan jalur MAPK.<sup>23</sup> Berdasarkan penelitian sebelumnya, penurunan kadar IL-1 $\beta$ , IL-6,

dan TNF- $\alpha$  sejalan dengan penghambatan aktivitas MAPK dan NF- $\kappa$ B. Diduga pada penelitian ini, sampel *crude extract* fukoidan juga bekerja menghambat aktivasi MAPK dan NF- $\kappa$ B sehingga kadar sitokin yang terukur lebih rendah dibandingkan dengan kondisi inflamasi.

Sementara aktivitas antiinflamasi fukoidan uji pada penelitian ini terlihat pada dosis rendah, dosis tinggi tidak menunjukkan penurunan kadar IL-1 $\beta$  dan IL-6. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan hubungan berbanding lurus antara dosis dengan aktivitas penghambatan sitokin. Diduga hal ini terjadi karena adanya aktivitas imunostimulan pada *crude extract* fukoidan uji seperti yang ditunjukkan dalam penelitian terdahulu.

Penelitian Decheng *et al.* mengisolasi fukoidan berbobot molekul rendah (<10 kDa) dari *U. pinnatifida*. Fukoidan uji ini meningkatkan kadar NO, TNF- $\alpha$ , dan IL-6 pada sel RAW 264.7. Selain itu, ekspresi mRNA kedua sitokin tersebut juga secara signifikan lebih tinggi, yang terjadi akibat stimulasi aktivasi NF- $\kappa$ B. Jalur persinyalan MAPK juga teraktivasi melalui peningkatan fosforilasi terutama pada p38 MAPK dan JNK.<sup>24</sup>

Ekstrak polisakarida dari *S. fusiforme* menunjukkan aktivitas imunostimulan melalui peningkatan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 pada mencit Balb/c yang diinduksi sel adenokarsinoma paru A549.<sup>25</sup> *Crude extract* dan fraksi polisakarida dari *S. angustifolium* meningkatkan ekspresi gen NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 dan IL-6 melalui peningkatan fosforilasi ERK dan JNK sehingga memicu peningkatan aktivitas faktor transkripsi NF- $\kappa$ B.<sup>26</sup>

Penelitian sebelumnya juga menunjukkan efek bifungsi fukoidan terhadap NO. Fukoidan dari *Laminaria japonica* (Sigma) dosis rendah (10  $\mu$ g/mL) menginduksi iNOS pada sel RAW 264.7, sedangkan pada dosis tinggi ekspresi iNOS tidak berbeda signifikan dengan kontrol normal. Pada sel RAW 264.7 yang diinduksi LPS, fukoidan dosis tinggi

tersebut berhasil menekan ekspresi iNOS. Aktivitas ini tidak melibatkan penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B, melainkan penghambatan pada faktor transkripsi AP-1.<sup>27</sup>

Pada dosis rendah, *crude extract* fukoidan uji menunjukkan aktivitas antiinflamasi melalui penghambatan mediator TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. Sebaliknya pada dosis tinggi, kemungkinan *crude extract* fukoidan uji memberikan aktivitas imunostimulan melalui stimulasi sitokin TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6. *Dual effect* juga dapat ditemukan pada senyawa kurkumin, yaitu sebagai antioksidan dan prooksidan. Salah satu faktor yang memengaruhi aktivitas ganda kurkumin adalah dosis yang digunakan.<sup>28</sup> Dalam strategi pengobatan, efek imunostimulan fukoidan dapat dimanfaatkan sebagai terapi antitumor.<sup>8,29</sup>

Fukoidan memiliki karakteristik yang unik, tergantung pada spesies asal dan metode ekstraksi. Kedua faktor ini memengaruhi karakteristik fukoidan, seperti susunan struktur kimia, kandungan senyawa polisakarida dan non polisakarida, serta bobot molekul. Beberapa penelitian juga telah mencoba menemukan hubungan antara struktur dengan aktivitas fukoidan melalui karakterisasi struktur molekul fukoidan dengan FTIR dan NMR serta modifikasi struktur kimia fukoidan, dan melihat pengaruhnya terhadap aktivitas.<sup>26,30,31</sup> Sampel *crude extract* fukoidan yang digunakan pada penelitian ini belum dilengkapi dengan informasi karakteristik yang memadai, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk memahami kaitan antara komposisi ekstrak dengan aktivitasnya.

## KESIMPULAN

*Crude extract* fukoidan dari *S. crassifolium* perairan Garut - Jawa Barat, yang diekstraksi dengan larutan asam menurunkan kadar TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 pada dosis 25  $\mu$ g/mL.

## SARAN

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui jalur penghambatan sitokin proinflamasi. Selain itu, penelitian dapat dilakukan terhadap *crude extract* fukoidan dosis tinggi untuk menggali potensinya sebagai imunomodulator.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Simlitabmas Kemenristek-DIKTI melalui Hibah Tim Pasca Sarjana yang telah membiayai penelitian ini.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Science*. 2013;339(6116):166–72.
2. Ahmed AU. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Front Biol China*. 2011;6(4):274–81.
3. Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2014;35(27):1782–91.
4. Castaneda OA, Lee SC, Ho CT, Huang TC. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. *J Food Drug Anal*. 2017;25(1):111–8.
5. Phull AR, Kim SJ. Fucoidan as bio-functional molecule: Insights into the anti-inflammatory potential and associated molecular mechanisms. *J Funct Foods*. 2017;38:415–26.
6. Fitton JH, Stringer DN, Karpinić SS. Therapies from fucoidan: An update. *Mar Drugs*. 2015;13(9):5920–46.
7. Shen P, Yin Z, Qu G, Wang C. 11 - Fucoidan and Its Health Benefits. *Bioactive Seaweeds for Food Applications*. Elsevier Inc.; 2018. 223-238 p.
8. Ale MT, Meyer AS. Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *R Soc Chem*. 2013;3:8131–41.
9. Suryani A. Uji aktivitas antiplatelet fukoidan dari rumput laut coklat (*Sargassum crassifolium*) yang diperoleh dari perairan Garut dengan waktu panen yang berbeda. [Skripsi] Fak Farm Univ Pancasila. 2018;34–41.
10. Sandhiutami NMD, Moordiani M, Laksmiawati DR, Fauziah N, Maesaroh M, Widowati W. In vitro assesment of anti-inflammatory activities of coumarin and indonesian cassia extract in RAW264.7 murine macrophage cell line. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(1):99–106.
11. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ. *Cell Viability Assays. Assay Guid Man*. 2016;1–31.
12. Elabscience. ELISA KIT USER MANUAL Mouse IL-1 $\beta$ . Vol. 7. 2017. 1-11 p.
13. Elabscience. ELISA KIT USER MANUAL Mouse IL-6. Vol. 7. 2017. 1-11 p.
14. Elabscience. ELISA KIT USER MANUAL Mouse TNF- $\alpha$ . Vol. 7. 2017. 1-11 p.
15. Muniandy K, Gothai S, Badran KMH, Kumar SS, Esa NM, Arulselvan P. Suppression of Proinflammatory Cytokines and Mediators in LPS-Induced RAW 264 . 7 Macrophages by Stem Extract of *Alternanthera sessilis* via the Inhibition of the NF-  $\kappa$  B Pathway. *J Immunol Res*. 2018;2018:1–12.
16. Wu J, Liu K, Shi X. The anti-inflammatory activity of several flavonoids isolated from *Murraya paniculata* on murine macrophage cell line and gastric epithelial. *Pharm Biol*. 2016;54(5):868–81.
17. Soonthornsit N, Pitaksutheepong C, Hemstapat W, Utaisincharoen P, Pitaksuteepong T. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Morus alba* L . Stem Extract in LPS-Stimulated RAW 264 . 7 Cells. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2017;2017:1–8.
18. Sanjeewa KKA, Fernando IPS, Kim EA, Ahn G, Jee Y, Jeon YJ. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of brown seaweed *Sargassum horneri* in RAW 264.7 cells. *Nutr Res Pract*. 2017;11(1):3–10.
19. Jeong J, Hwang SJ, Han MH, Lee D, Yoo JS, Choi I. Fucoidan inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages



- and zebrafish larvae. *Mol Cell Toxicol.* 2017;13:405–17.
20. Hwang P, Chien S, Chan Y, Lu M, Wu C, Kong Z, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses by Sargassum hemiphyllum Sulfated Polysaccharide Extract in RAW 264.7 Macrophage Cells. *J Agric Food Chem.* 2011;59:2062–8.
  21. Kim K, Yoon K, Lee B. Low molecular weight fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses inflammation by promoting the inhibition of mitogen-activated protein kinases and oxidative stress in RAW264.7 cells. *Fitoterapia.* 2012;83(8):1628–35.
  22. Killeen MJ, Linder M, Pontoniere P, Crea R. NF-kb signaling and chronic inflammatory diseases: exploring the potential of natural products to drive new therapeutic opportunities. *Drug Discov Today.* 2014;19(4):373–8.
  23. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(4):453–72.
  24. Decheng B, Yu B, Han Q, Lu J, White WL, Lai Q. Immune activation of RAW264.7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*. *J Agric Food Chem.* 2018;66(41):10721–8.
  25. Chen X, Nie W, Yu G, Li Y, Hu Y, Lu J, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3–4):695–700.
  26. Borazjani NJ, Tabarsa M, You S, Rezaei M. Purification, molecular properties, structural characterization, and immunomodulatory activities of water soluble polysaccharides from *Sargassum angustifolium*. *Int J Biol Macromol.* 2017;
  27. Li P, Wang H, Shao Q, Kong B, Qu XUN. Fucoidan modulates cytokine production and migration of THP - 1 - derived macrophages via colony - stimulating factor - 1. *Mol Med Rep.* 2017;15:2325–32.
  28. Ramirez-tortosa M. Curcumin and Health. *Molecules.* 2016;21(264):1–22.
  29. Shen P, Yin Z, Qu G, Wang C. Fucoidan and Its Health Benefits. *Bioactive Seaweeds for Food Applications.* Elsevier Inc.; 2018. 223-238 p.
  30. Cho M, Lee D, Kim J, You S. Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*. *Carbohydr Polym.* 2014;113:507–14.
  31. Zhang Z, Till S, Jiang C, Knappe S, Reutterer S, Scheiflinger F, et al. Structure-activity relationship of the pro- and anticoagulant effects of *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Thromb Haemost.* 2014;111:429–37.