

AKTIVITAS IMUNOMODULATOR OLIGOSAKARIDA ALGINAT (OSA) YANG DIHASILKAN DARI ALGINAT ASAL *Sargassum crassifolium*

Imunomodulator Activity of Alginate Oligosaccharides from Alginate Sargassum crassifolium

Subaryono*¹, Rosmawaty Perangiangan¹, Maggy Thenawidjaja Suhartono²,
Fransiska Rungkat Zakaria²

¹Puslitbang Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan, Jl. KS. Tubun Petamburan VI, Tanah Abang, 10620 Jakarta Pusat.

²Departemen Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat.

*Korespondensi: yono_ipn@yahoo.co.id

Diterima: 28 Januari 2017/ Disetujui: 29 Maret 2017

Cara sitasi: Subaryono, Perangiangan R, Suhartono MT, Zakaria FR. 2017. Aktivitas imunomodulator oligosakarida alginat (OSA) yang dihasilkan dari alginat asal *Sargassum crassifolium*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(1): 63-73.

Abstrak

Oligosakarida alginat (OSA) adalah oligosakarida yang dihasilkan dari pemotongan polimer alginat, dan dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh kondisi produksi OSA dan pengaruhnya terhadap produk serta aktivitasnya sebagai senyawa imunomodulator. Produksi oligosakarida alginat (OSA) dilakukan secara enzimatik dengan bantuan enzim alginat lyase yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus megaterium* S245. Variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 2, 4, 6 dan 8 jam dengan konsentrasi penambahan enzim alginat lyase 25, 50, 75 dan 100U. Perlakuan konsentrasi enzim dan lama waktu inkubasi dalam produksi OSA menghasilkan derajat polimerisasi (DP) 2-7. Uji aktivitas secara in vitro menunjukkan OSA mampu menginduksi proliferasi sel limfosit manusia. Jenis sel limfosit yang proliferasinya diinduksi OSA adalah sel CD 8 atau sel T sitotoksik serta sel non CD4/CD8. Kondisi produksi OSA dengan penambahan enzim alginat liase 50 U dan inkubasi selama 2 jam menghasilkan OSA yang memiliki indeks proliferasi limfosit tertinggi yaitu 117,6+3,6% atau meningkat sebesar 43,24% dibandingkan polimer alginatnya.

Kata kunci: *Bacillus megaterium* S245, proliferasi limfosit, rumput laut, sitotoksik

Abstract

Alginate oligosaccharides (AOS) are oligosaccharides produced from depolymerization of the alginate polymer, and is reported to have various biological activities. The study aims is to determine the effect of AOS production conditions and their effects on products and its activities as an immunomodulatory compound. Production of alginate oligosaccharides (AOS) enzymatically carried out with the help of alginate lyase enzyme produced from the bacterium *Bacillus megaterium* S245. Variation of incubation time is 2, 4, 6 and 8 hours at concentrations of alginate lyase enzyme addition of 25, 50, 75 and 100U. Treatment of enzyme concentration and the duration of incubation in the production of AOS produces a degree of polymerization (DP) 2-7. In vitro activity test showed AOS is have ability to induce cell proliferation of human lymphocytes. This type of cell lymphocytes proliferation induced by AOS is a CD 8 cells or cytotoxic T cell and non cell CD4 / CD8. AOS production conditions with the addition of alginate lyase enzyme 50 U and incubation period 2 hours has produce AOS with the highest index of lymphocyte proliferation 117.6+3.6% or an increase of 43.24% compared to the native alginate polymer.

Keywords: *Bacillus megaterium* S245, cytotoxic, lymphocyte proliferation, seaweed

PENDAHULUAN

Imunomodulator merupakan senyawa yang mampu mempengaruhi sistem kekebalan tubuh manusia, dan dapat diperoleh dari bahan alam. Penelitian menggunakan berbagai jenis bahan alam sebagai imunomodulator sudah dilakukan. Penggunaan (1→3)-b-D-Glucans sudah dikenal lama sebagai immunomodulator alami, karena kemampuannya menstimulasi berbagai respon biologi. Anti-kanker, anti-infeksi, penurunan kolesterol darah, anti-Crohn's disease, dan anti-stress selama 40 tahun telah diteliti dari (1→3)-b-D-glucans (Vetvicka *et al.* 2010). Oligosakarida turunan yang dihasilkan dari (1→3)-b-D-Glucans yaitu 4-deoxy-(1→3)-b-D-oligosakaridaglukan menunjukkan aktivitas biologis seperti kemampuan menstimulasi phagocytosis, modulasi ekspresi gen dan aktivitas anti-kanker yang lebih tinggi dibandingkan glucans alaminya (Vetvicka *et al.* 2010). Penelitian tentang senyawa imunomodulator dari bahan alam asal Indonesia antara lain dilakukan dari Aloe vera yang mengandung senyawa acemannan (Manosa yang terasetilasi), berkhasiat sebagai biofarmaka yang mempunyai efek sebagai imunomodulator pada hewan. Efek imunomodulator terlihat dari cepat meningkatkan aktivitas sel-sel efektor seperti limfosit dan makrofag sehingga memproduksi dan melepas sitokin, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12 dan tumor necrosis factor alpha (TNF α). Aktivitas acemannan yang utama adalah dalam meningkatkan maturasi sel limfosit T-helper CD⁴⁺ menjadi sel Th1 dan imunitas non-spesifik dengan meningkatkan sintesis sitokin (Wiedosari 2007). Penelitian lain pemanfaatan bahan alam sebagai imunomodulator adalah penggunaan ekstrak etanol Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) untuk merangsang respon imun mencit, yang mampu meningkatkan aktivitas dan kapasitas sel makrofag (Kusmardi *et al.* 2007).

Oligosakarida alginat (OSA) merupakan produk turunan alginat yang mempunyai kelarutan lebih baik di dalam air dan bioaktivitas yang lebih baik dibanding polimernya. Produk metabolit dari fermentasi non digestible oligosakarida seperti OSA dilaporkan mampu menstimulasi sistem

imun tubuh. Oligomer alginat dengan derajat polimerisasi (DP) 7 dan 8 dilaporkan memiliki aktivitas tertinggi dalam menginduksi produksi sitokin seperti IL- α , IL- β dan IL-6. Oligosakarida alginat ini juga memiliki sifat antikanker karena mampu menginduksi sitokin sitotoksik maupun TNF- α (Iwamoto *et al.* 2003; Iwamoto *et al.* 2005). Oligosakarida alginat mampu menurunkan potensi penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen di usus (*Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* dan *Salmonella*). OSA secara *in vitro* juga efektif sebagai bahan prebiotik (Wang *et al.* 2006). OSA termasuk bagian dari serat yang larut air serta mampu menurunkan kandungan kolesterol dalam darah khususnya LDL dan berperan sebagai senyawa antihiperlipidemia (Mao *et al.* 2004).

Potensi pengembangan bahan aktif turunan alginat seperti OSA sebagai senyawa imunomodulator sangat tinggi karena potensi rumput laut coklat penghasil alginat di Indonesia cukup besar yaitu sekitar 300 ton/tahun (Subaryono 2011). Pemanfaatan rumput laut penghasil alginat belum optimal digunakan. Penelitian sebelumnya sudah dilakukan menentukan kemampuan OSA untuk memproduksi berbagai jenis sitokin, yang merupakan senyawa pengatur sistem imun di dalam tubuh (Iwamoto *et al.* 2003; Iwamoto *et al.* 2005), namun penelitian tentang kemampuan OSA dalam meningkatkan proliferasi sel imun belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kemampuan OSA dalam menginduksi proliferasi sel-sel imun sehingga dapat digunakan sebagai senyawa imunomodulator.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alginat hasil ekstraksi dari rumput laut *Sargassum crassifolium* yang diperoleh dari Perairan Binuangen, Provinsi Banten. Ekstraksi alginat dilakukan dengan metode jalur asam alginat. Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini adalah KOH, Natrium Sulfat, HCl, KH₂PO₄, Kalsium karbonat, H₂SO₄, HNO₃, Isopropil Alkohol, NaOH, Na₂CO₃ dan KBr (Merck-millipore). Media Luria-Bertani (LB) dan Bakto Agar

(Difco) digunakan untuk produksi enzim alginat lyase dari bakteri. Pereaksi DNS (*dinitro salicylic acid*), BSA (*bovine serum albumin*), Pereaksi Bradford, Media RPMI, pereaksi MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazoliumbromida) dan FBS (*fetal bovine Serum*) (Sigma-Aldrich) digunakan sebagai bahan untuk uji proliferasi sel limfosit. Anti human CD 4 dan Anti human CD 8 (BD Biosciences-USA) digunakan sebagai reagen spesifik untuk melihat jenis sel limfosit yang berproliferasi. Alat yang digunakan adalah *Fourier transmittance infrared spectrofotometer* (Perkin Elmer Spectrum One), *ELISA reader* (Thermo Scientific Multiscan Go), sentrifuse (Beckman Coulter Microfuge 22 R) dan flow cytometer (*Accuri C6 flow cytometer*).

Metode Penelitian

Alginat yang digunakan sebagai bahan baku dikarakterisasi MG rasio dengan spektrofotometri infra merah/FTIR (Sakugawa *et al.* 2004). Metode produksi OSA dilakukan dengan pengembangan metode Li *et al.* (2011). Produksi OSA dilakukan dengan melarutkan 1 g alginat dalam 100 mL akuades. Enzim alginat lyase yang belum dimurnikan (*crude enzyme*) ditambahkan sebanyak 25, 50, dan 75 U, kemudian campuran enzim-substrat diinkubasi di dalam shaked incubator pada suhu 45°C dengan pengadukan. Inkubasi dilakukan dengan variasi 2, 4, 6 dan 8 jam. Aktivitas enzim alginat lyase dihentikan dengan pemanasan pada air mendidih selama 10 menit. Pengendapan sisa makromolekul yang tidak terpotong oleh enzim alginat lyase ditambahkan etanol 50% (v/v) dan disentrifus 10.000 x g selama 10 menit. Cairan oligosakarida dipisahkan dari endapan yang terbentuk, kemudian dievaporasi pada suhu 40°C, dan dilanjutkan dengan *freeze dry* untuk mendapatkan OSA kering.

Gambaran oligosakarida alginat yang terbentuk dari reaksi enzimatik ini diamati dengan melihat derajat polimerisasinya (DP) menggunakan KLT (kromatografi lapis tipis) dengan silica G 60 sebagai fase diamnya. Sampel OSA sebanyak 25 µL ditotolkan pada lempeng KLT dengan diameter spot tidak lebih dari 1 mm dan dikeringanginkan. Kontrol uji dilakukan dengan menggunakan

fruktooligosakarida (FOS) dengan DP 2-8. Lempeng TLC dimasukkan dalam tabung kromatografi yang sudah dijenuhkan dengan sistem pelarut (1-butanol : asam format : air (4:6:1), dibiarkan hingga pelarut naik ke lempeng KLT selama 40 menit, selanjutnya lempeng KLT dikeringanginkan. Pembentukan warna spot oligosakarida, disemprotkan larutan 10% H₂SO₄ dalam etanol dan dikeringanginkan. Lempeng KLT selanjutnya dipanaskan dalam oven suhu 95°C selama 15 menit sampai muncul spot oligosakarida yang teramati secara visual berwarna kecoklatan.

Produk OSA hasil pemotongan secara enzimatik selanjutnya diuji aktivitas imunomodulatornya dengan MTT assay. Alginat digunakan sebagai kontrol dalam uji aktivitas imunomodulator. Hasil degradasi enzim alginat liase juga digunakan sebagai pembanding terhadap rumput laut *Sargassum crassifolium* untuk membandingkan aktivitas biologis OSA berbahan baku alginat dengan berbahan baku langsung dari rumput laut segar.

Uji proliferasi sel limfosit dikembangkan dari metode Fajarningsih *et al.* (2008). Isolasi sel limfosit dilakukan dari darah yang diperoleh dari donor (Wahyuni 2006). Darah dari seorang donor sehat diambil secara steril dan sentrifugasi sampel darah dalam vacutteiner dengan kecepatan 1.000 rpm selama 10 menit. Bagian darah yang berat (sel darah merah) berada di bawah dan plasma darah terpisah di bagian atas. Lapisan *buffy coat* (berisi sel limfosit) yang terletak di antara kedua lapisan diambil kemudian ditambah dengan medium RPMI. Suspensi limfosit tersebut dilewatkan pada larutan ficoll-hypaque secara perlahan hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah. Tabung disentrifugasi lagi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 30 menit. Sel limfosit, monosit, dan platelet berada di lapisan atas permukaan ficoll dan tidak menembus ke bawah, sedangkan granulosit dan sel darah merah terpisah di dasar tabung sentrifugasi. Lapisan yang berisi limfosit, monosit, dan platelet dicuci dengan medium RPMI dan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian pelet dicuci

dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1.500 rpm selama 10 menit sehingga limfosit terpisah dari platelet, monosit, dan ficoll (dalam supernatan). Penghitungan jumlah sel selanjutnya dilakukan dari pelet yang diperoleh dengan hemositometer. Sel limfosit kemudian ditambah medium pertumbuhan RPMI lengkap yang mengandung Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, fungizone 0,5%, Penisilin-Streptomisin 2% dan dihomogenkan.

Uji proliferasi sel limfosit dilakukan dengan mengkultur sebanyak 70 μ L suspensi sel limfosit manusia (2×10^6 sel/mL) pada lempeng 96 *well steril*. OSA/alginat/rumput laut \pm enzim (konsentrasi 500 ppm) sebanyak 20 μ L ditambahkan 10 μ L FCS, dan dengan media RPMI-1640 campuran dijadikan 200 μ L. Kontrol negatif digunakan 20 μ L media RPMI-1640 sebagai pengganti OSA. Inkubasi dilakukan selama 72 jam pada suhu 37°C. Menjelang akhir inkubasi, 10 μ L reagen MTT (0,5 mg/mL) ditambahkan pada tiap sumuran, dan diinkubasi lagi selama 4 jam. HCl-Isopropanol 0,04 N 80 μ L ditambahkan, dicampur merata dan serapan dibaca dengan ELISA reader pada λ 570 nm. Indeks stimulasi dihitung sebagai: IS = OD sampel/OD kontrol.

Uji aktivitas imunomodulator dilakukan dengan melihat proliferasi sel limfosit, serta uji subset untuk melihat sel apa yang berkembang dengan imunokimia menggunakan anti-CD 4 dan anti-CD 8. Uji dilakukan dengan prinsip ELISA, dengan limfosit manusia sebagai bahan ujinya. Suspensi sel limfosit (2×10^6 sel/mL) disiapkan sebanyak 100 μ L dari masing-masing perlakuan (kontrol dan penambahan OSA 50U 2 jam) ke dalam tabung efordorf dan ditambahkan 350 μ L PBS (*phosphate buffer saline*), kemudian ditambahkan pereaksi campuran mouse antibody anti human CD 4 yang dimarker FITC (*Fluorhescsein Isothyocyanate*) dan CD8 yang dimarker PerCP (*Peridinin Chlorophyll*) sebanyak masing-masing 20 μ L ke dalam tabung efordorf dan ditutup dengan parafilm. Sampel dicampur merata dan diinkubasi pada ruang gelap pada suhu kamar selama 20-30 menit dengan pengocokan (*shake*) secara perlahan selama inkubasi. Jumlah sel selanjutnya dibaca dengan *Flowcytometer* dengan jumlah limfosit terbaca 20.000 sel. Analisa proporsi CD4 dan

CD 8 dalam sampel dilakukan dengan melihat proporsi masing-masing sel hasil pewarnaan dalam kuadran yang berbeda. Kuadran 1 berisi sel yang mengikat *antibody anti-human* CD 8 atau sel T sitotoksik, kuadran 2 berisi sel yang mengikat *antibody anti-human* CD 8 maupun *antibody anti-human* CD 4, kuadran 3 berisi proporsi sel yang mengikat *antibody anti-human* CD 4 atau sel T *helper*, dan kuadran 4 berisi sel yang tidak mengikat baik terhadap *antibody anti-human* CD 8 maupun *antibody anti-human* CD 4.

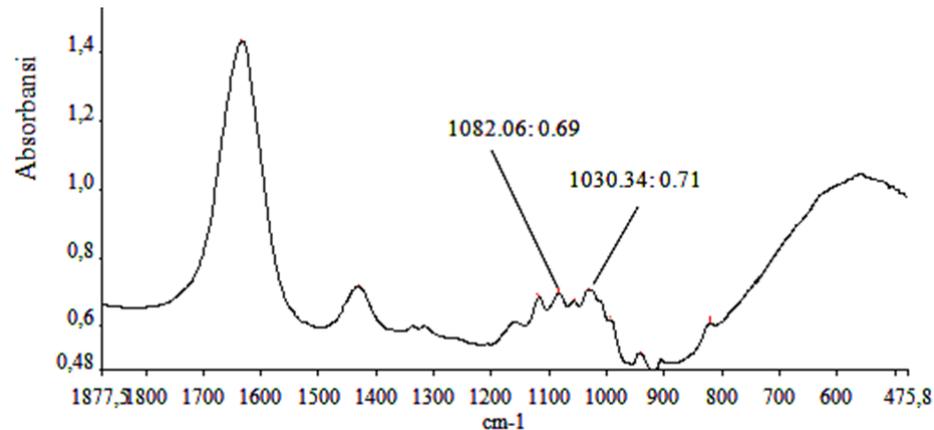
Analisis Data

Penelitian dilakukan dengan 3 kali ulangan. Data indeks stimulasi OSA terhadap proliferasi sel limfosit dianalisa dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Duncan. Uji subset sel CD4 dan CD8 dianalisis dengan uji T berpasangan. Analisa statistik dilakukan dengan bantuan software SPSS 16, pada taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi alginat dilakukan melalui jalur asam alginat karena relatif mudah dan menghasilkan rendemen alginat yang cukup tinggi. Rendemen alginat yang diperoleh dari ekstraksi ini rata-rata $28,33 \pm 3,26\%$. Pengamatan karakterisasi bahan baku menunjukkan bahwa alginat yang dihasilkan memiliki viskositas $162,89 \pm 3,66$ cP. Alginat yang dihasilkan berdasarkan viskositasnya termasuk dalam kelompok viskositas rendah. Viskositas alginat dari *Turbinaria conoides* dilaporkan sebesar 560 cP (pada konsentrasi 2%), demikian pula dengan alginat dari *Turbinaria decurens* yang memiliki viskositas 560 cP (Rasyid 2003a, Rasyid 2003b). Pengamatan pendugaan MG rasio alginat dengan FTIR disajikan pada Gambar 1.

Pendugaan MG rasio dikembangkan dengan metode Shakugawa *et al.* (2004) menggunakan pendekatan rasio absorbansi kalsium alginat pada panjang gelombang 1030/1082. Metode ini merupakan metode yang cukup sederhana tetapi menghasilkan dugaan MG rasio yang cukup akurat. Absorbansi pada λ 1.030 menunjukkan sidik jari polimanuronat, sedangkan absorbansi pada λ 1.082 menunjukkan sidik jari



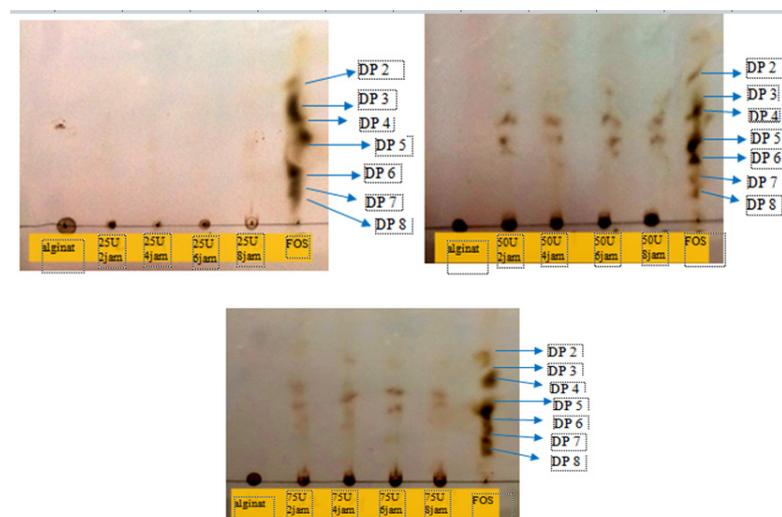
Gambar 1 Profil FTIR kalsium alginat untuk pendugaan rasio polimanuronat dan poliguluronat

untuk poliguluronat. Hasil perbandingan rasio absorbansi pada panjang gelombang 1030/1082 dengan kurva standar campuran MG rasio yang sudah diketahui (proporsi M/G 0%, 25%, 40%, 75% dan 100%), maka MG rasio dalam sampel dapat dihitung.

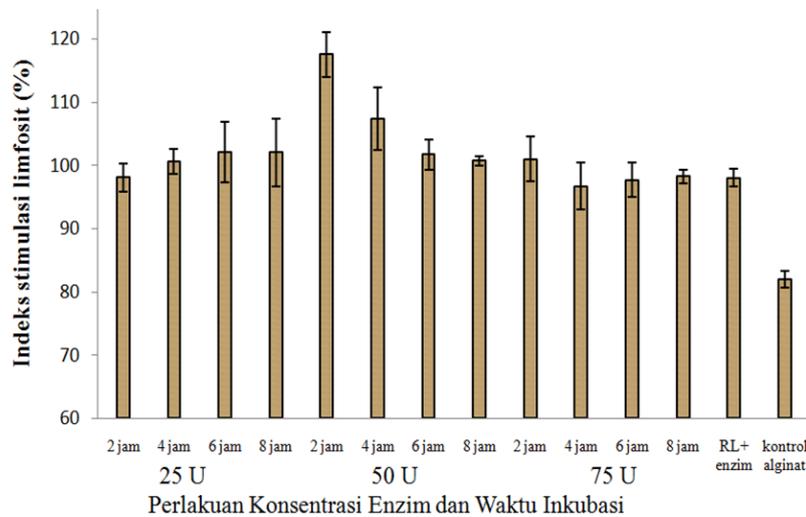
Pengamatan MG rasio dengan FTIR menunjukkan bahwa alginat ini memiliki proporsi polimanuronat $48,84 \pm 1,95$ sedangkan proporsi poliguluronat $51,16 \pm 1,95\%$, maka MG rasio sampel dari hasil perhitungan sebesar $0,92 \pm 0,073$. Data MG rasio tersebut mengindikasikan bahwa monomer penyusun alginat dari *Sargassum crassifolium* ini lebih banyak manuronat dibandingkan guluronat, dan berbeda dengan alginat yang banyak diekstrak dari rumput laut perairan sub tropis yang lebih banyak tersusun oleh manuronat. Hasil penelitian pendugaan MG rasio ini

juga sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa MG rasio alginat dari perairan Indonesia terutama dari *Turbinaria sp.* dan *Sargassum sp.* berada pada kisaran 0,72-0,94 (Subaryono *et al.* 2009).

Produksi OSA dilakukan dengan penambahan enzim setara dengan 25, 50 dan 75 U, dan produk hasil OSA yang dihasilkan dikarakterisasi dengan KLT (Gambar 2). Hasil KLT tersebut terlihat bahwa konsentrasi enzim alginat liase dan waktu inkubasi pada pembuatan OSA berpengaruh terhadap derajat polimerisasi produk yang dihasilkan. Pita-pita oligosakarida yang terbentuk pada enzim konsentrasi 25 U masih sangat tipis, yang berarti bahwa oligosakarida yang dihasilkan masih sangat sedikit. Pita oligosakarida dengan penambahan enzim 25 U baru mulai terlihat pada waktu inkubasi 6 dan 8 jam namun



Gambar 2 Hasil KLT oligosakarida alginat dari berbagai perlakuan



Gambar 3 Pengaruh perlakuan produksi OSA terhadap aktivitasnya dalam meningkatkan proliferasi sel limfosit

masih sangat tipis. Konsentrasi enzim 50 U pita-pita oligosakarida ini mulai terlihat nyata, dan paling nyata terlihat pada penambahan enzim 75 U. Hasil uji dengan TLC tersebut juga terlihat bahwa pada konsentrasi enzim 75 U ini proporsi oligosakarida dengan DP yang rendah semakin banyak. Semakin kecil DP senyawa maka dalam TLC akan terbawa oleh larutan pembawa semakin jauh dari titik awal di dasar TLC. Hasil TLC tersebut terlihat bahwa DP oligosakarida ini berada pada kisaran antara DP 2-7.

Parameter yang sering digunakan untuk melihat aktivitas imunomodulator suatu komponen salah satunya adalah kemampuannya dalam menstimulasi proliferasi sel limfosit. Proliferasi pada sel limfosit adalah proses pendewasaan dan perbanyakkan sel melalui pembelahan sel atau mitosis. Proses tersebut menghasilkan sel-sel efektor aktif yang berperan pada respon spesifik dan non spesifik untuk eliminasi mikroorganisme patogen dan zat asing lainnya. Respon proliferasi sel limfosit menggambarkan status imun individu (Zakaria *et al.* 2003). Aktivitas sel limfosit T dan B yang berproliferasi ini dapat diukur melalui nilai indeks stimulasi (IS). Fungsi sel limfosit T dan B penting dalam sistem imun manusia, maka pendekatan aktivitas imunomodulator yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan melihat efek OSA terhadap proliferasi

sel limfosit serta melihat lebih jauh sel limfosit apa yang diinduksi oleh OSA tersebut.

Uji proliferasi sel limfosit dilakukan untuk melihat potensi OSA ini dalam menginduksi sistem imun. Penambahan OSA pada sel limfosit terlihat berpengaruh terhadap proliferasi sel limfosit tersebut (Gambar 3). Perlakuan konsentrasi enzim dan waktu inkubasi pada pembuatan OSA terlihat menghasilkan tingkat proliferasi sel limfosit yang secara statistik berbeda sangat nyata ($p < 0,01$). Perlakuan konsentrasi enzim 50 U dan waktu inkubasi 2 jam memberikan efek proliferasi sel limfosit tertinggi dengan indeks stimulasi sebesar $117,56 \pm 3,58\%$ disusul perlakuan enzim 50 U 4 jam $107,34 \pm 4,97\%$, 25 U 6 jam $102,08 \pm 4,75\%$, 25 U 8 jam $102,04 \pm 5,43\%$ dan 50 U 6 jam $101,73 \pm 0,73\%$. Perlakuan konsentrasi enzim 25U dengan waktu inkubasi 2 dan 4 jam serta perlakuan lainnya memberikan efek proliferasi yang lebih rendah dibanding ke-lima perlakuan di atas, namun secara statistik masih lebih tinggi dibandingkan efek proliferasi limfosit kontrol alginat yang memiliki nilai indeks stimulasi $82,07 \pm 1,33\%$. Bentuk oligosakarida menyebabkan efek terhadap proliferasi limfosit lebih tinggi dibandingkan dalam bentuk polimernya. Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa bentuk oligosakarida cenderung menghasilkan efek proliferasi

Tabel 1 Pengaruh penambahan enzim dan DP OSA serta aktivitas proliferasi limfositnya

Enzim yang ditambahkan (U)	Waktu inkubasi (jam)	DP OSA	Aktivitas proliferasi limfosit
25	2	spot belum terlihat	98,13±2,23 ^a
25	4	spot belum terlihat	100,64±1,98 ^a
25	6	spot terlihat tipis	102,08±4,75 ^{ab}
25	8	spot terlihat tipis (DP 6, 5)	102,04±5,43 ^{ab}
50	2	spot terlihat (DP 5, 4)	117,56±3,58 ^c
50	4	spot terlihat (DP 6, 5, 4, 3)	107,34±4,97 ^{ab}
50	6	spot terlihat (DP 5, 4, 3)	101,73±0,73 ^{ab}
50	8	spot terlihat (DP 5, 4, 3)	100,73±0,73 ^a
75	2	spot terlihat (DP 7,6, 5, 4, 2)	101,00±3,54 ^a
75	4	spot terlihat (DP 7,6, 5, 4, 2)	96,74±3,73 ^a
75	6	spot terlihat (DP 7, 6, 5, 4, 3)	97,75±2,65 ^a
75	8	spot terlihat (DP 5, 4, 2)	98,27±1,35 ^a

Keterangan: Hasil merupakan rerata tiga kali ulangan dan standar deviasinya. Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%

atau imunomodulator yang lebih baik dibandingkan dalam bentuk polimer.

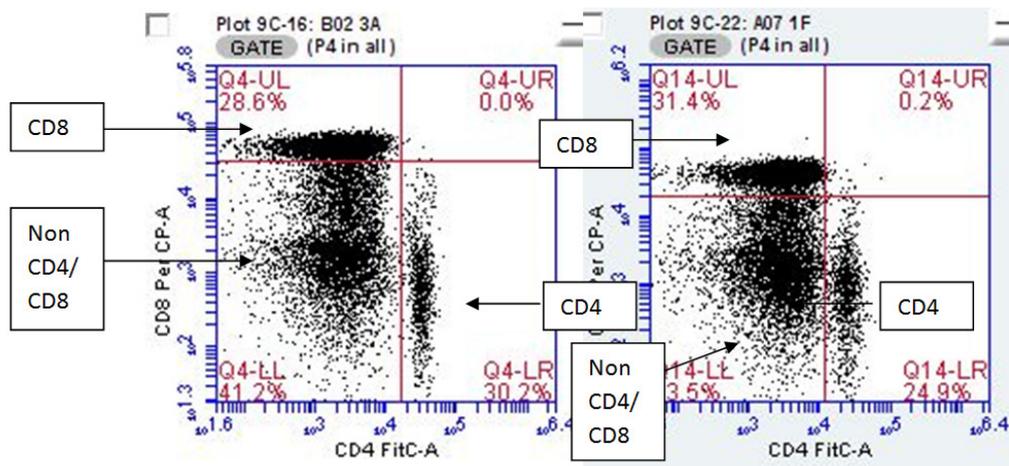
Nilai indeks stimulasi (IS) 100% berarti bahwa sel limfosit yang dikultur secara *in vitro* tersebut tidak mengalami kematian sehingga jumlahnya tetap. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan penambahan OSA tidak bersifat sitotoksik terhadap sel limfosit. Hasil indeks stimulasi dengan penambahan OSA dari semua perlakuan kecuali perlakuan 50U 2 jam menghasilkan IS sekitar 100% (Tabel 1), atau secara umum dapat dikatakan bahwa OSA ini aman terhadap sel limfosit. Hal ini berbeda dengan kontrol polimer alginat yang hanya menghasilkan indeks stimulasi 82,07±1,33%, yang menunjukkan adanya kematian dari beberapa sel limfosit yang dikultur.

Efek proliferasi sel limfosit diduga ditentukan oleh kombinasi oligosakarida yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan. Konsentrasi enzim yang rendah dan waktu inkubasi pendek, diduga oligosakarida yang terbentuk masih sangat sedikit sehingga tidak memberikan efek yang baik terhadap proliferasi sel limfosit. Proliferasi sel limfosit diawali dengan menempelnya mitogen seperti phytohemagglutinin (PHA) dan concanavalin A (con A) pada gugus sakarida spesifik yang terdapat pada permukaan sel. Aktivasi sel limfosit ini dipengaruhi oleh salah satunya

jumlah aktivator yang menempel pada reseptor di permukaan sel tersebut. Sebagai contoh untuk mitogen Con A, proliferasi maksimum baru dapat terjadi jika 16-25% reseptor Con A berikatan dengan Con A (Safai dan Good 2013). Produksi OSA dengan konsentrasi enzim yang rendah dan waktu yang pendek maka konsentrasi oligosakarida yang dihasilkan masih sedikit sehingga jumlahnya belum optimal untuk mengaktifasi sel limfosit.

Perlakuan konsentrasi enzim yang tinggi dan waktu yang lama akan meningkatkan konsentrasi OSA yang terbentuk. Peningkatan konsentrasi OSA tersebut dapat menyebabkan terjadinya kejenuhan pada reseptor di permukaan sel sehingga memberikan efek aktivasi sel yang rendah. Safai dan Good (2013) menyatakan bahwa bahwa aktivasi maksimum sel limfosit akan terjadi jika tidak semua sisi pengikatan (*binding site*) terjenuhkan oleh mitogen. Seperti pada penggunaan mitogen Con A, proliferasi maksimum akan terjadi jika 16-25% reseptor Con A berikatan. demikian pula pada mitogen PHA, dengan jumlah yang lebih sedikit yaitu hanya sekitar 3% PHA-*binding site* berikatan sudah menghasilkan respon proliferasi limfosit yang maksimum.

Pengaruh jumlah enzim yang ditambahkan dan waktu inkubasi terhadap



Gambar 4 Contoh visualisasi uji subset proliferasi sel limfosit dengan flow cytometer (A) Kontrol (B) dengan penambahan OSA

derajat polimerisasi (DP) OSA serta aktivitas proliferasinya disajikan pada Tabel 1. Hasil perlakuan tersebut terlihat bahwa efek proliferasi terbaik dihasilkan pada perlakuan enzim 50U selama 2 jam yang menghasilkan DP 5 dan 4. Iwamoto *et al.* (2005) menunjukkan bahwa oligomer alginat dengan DP antara 7 dan 8 memiliki aktivitas yang paling baik dalam menginduksi sitokin secara *in vitro*. Perbedaan ini disebabkan karena adanya beberapa perbedaan antara lain dalam hal sel yang digunakan untuk uji *in vitro*. Iwamoto *et al.* (2005) menggunakan parameter sitokin yang dilepaskan oleh sel makrofag tikus. Sekresi (IL)-1a, IL-1b, dan IL-6 dari sel makrofag RAW 264,7 digunakan sebagai parameter untuk mendekati efek imunomodulator OSA.

Efek OSA langsung dalam menginduksi proliferasi sel limfosit manusia digunakan sebagai pendekatan sifat imunomodulator OSA. Iwamoto *et al.* (2005) menyatakan bahwa masing-masing OSA dipisahkan dan diujikan secara terpisah, dan berbeda dengan penelitian ini yang menggunakan efek campuran OSA dengan berbagai DP. Perbedaan ini dapat menghasilkan perbedaan aktivitas gabungan karena adanya kemungkinan sifat antagonisme atau sinergisme antar masing-masing DP OSA. OSA dengan DP rendah seperti DP2 atau 1 memberikan efek anti-proliferasi, dan ini dapat mempengaruhi efek imunomodulator OSA campuran.

Penelitian ini merupakan yang pertama melaporkan kemampuan OSA menginduksi proliferasi limfosit secara langsung, sehingga merupakan kebaruan dalam mendekati efek imunomodulator OSA.

Kombinasi perlakuan konsentrasi enzim 50 U dan waktu inkubasi 2 jam memberikan efek proliferasi tertinggi yaitu menghasilkan indeks stimulasi limfosit $117,56 \pm 3,58\%$, sedangkan kontrol alginat yang hanya memberikan indeks stimulasi $82,07 \pm 1,33\%$ (Gambar 3). Peningkatan efek stimulasi limfosit ini secara matematis yaitu $43,24\%$. Hal ini diduga kuat karena adanya efek oligosakarida alginat yang memiliki ukuran lebih kecil, dan lebih sesuai dengan *binding site* sel limfosit manusia, sehingga memberikan efek proliferasi yang lebih baik. Oligosakarida alginat juga memberikan efek induksi sitokin maupun tumor nekrosis faktor (TNF α) yang lebih baik dibandingkan dalam bentuk polimer alginatnya (Iwamoto *et al.* 2005). Efek proliferasi ekstrak *Turbinaria* sp. terhadap sel limfosit menunjukkan adanya proliferasi $99,29-193,19\%$ dengan angka paling tinggi diperoleh dari hasil ekstraksi fraksi etanol (Fajarningsih *et al.* 2008).

Efek proliferasi rumput laut yang ditambahkan enzim alginat liase menghasilkan indeks stimulasi lebih tinggi dan berbeda nyata ($98,08 \pm 1,35\%$) dibandingkan kontrol alginat dengan indeks stimulasi ($82,07 \pm 1,33\%$). Hasil uji menunjukkan adanya efek proliferasi yang

Tabel 2 Pengaruh penambahan enzim dan DP OSA serta aktivitas proliferasi limfositnya

Perlakuan	Jenis Sel limfosit		
	CD 4 (%)	CD 8 (%)	Non CD4/CD8 (%)
Kontrol	30,13±0,21 ^a	28,53±0,06 ^a	41,3±0,17 ^a
Penambahan OSA	24,03±0,75 ^b	31,47±0,31 ^b	44,33±0,76 ^b

Keterangan: Hasil merupakan rerata tiga kali ulangan dan standar deviasinya. Notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%

diberikan oleh senyawa-senyawa aktif lain selain alginat yang terdapat dalam rumput laut. Kar *et al.* (2011) menyatakan bahwa senyawa fucoidan dilaporkan memiliki efek imunomodulator terhadap sel makrofag maupun terhadap pelepasan T *helper* 1 dan T *helper* 2. Perlakuan kontrol alginat justru menekan proliferasi limfosit, hingga indeks proliferasi limfositnya hanya 82,07±1,33% (Gambar 3). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sebagian limfosit mengalami kematian selama inkubasi 24 jam. Alginat merupakan salah satu polimer yang diketahui memiliki kemampuan menekan fungsi limfosit. Mai *et al.* (1993) melaporkan bahwa alginat yang dihasilkan *P. aeruginosa* mampu menekan fungsi limfosit dan netrofil. Proliferasi limfosit yang ditambahkan kontrol alginat dapat tertekan juga disebabkan karena efek beberapa impurities yang ada. Senyawa atau pengotor yang terdapat dalam alginat seperti flavonoid dan senyawa polifenol diduga berperan dalam menekan proliferasi sel limfosit tersebut. Senyawa fucoidan, fucan dan fukosantin dapat terpisahkan pada proses ekstraksi alginat yang melalui jalur asam alginat, tetapi beberapa senyawa fenolik dan flavanoid diduga masih terikut dalam alginat. Metabolit sekunder dari rumput laut coklat diketahui bersifat anti-tumor, dan juga bisa bersifat sitotoksik terhadap sel limfosit. Sheu *et al.* (1999) mempublikasikan 9 senyawa fucosterol yang diisolasi dari alga coklat *Turbinaria conoides*, empat senyawa di antaranya memiliki bioaktivitas terhadap beberapa sel lestari tumor. Alginat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alginat yang belum dimurnikan sehingga keberadaan metabolit sekunder ini kemungkinan besar masih cukup tinggi. Faktor lain yang kemungkinan dapat menyebabkan kematian beberapa sel limfosit dengan penambahan

alginat ini adalah adanya impuritis bahan kimia yang digunakan selama proses ekstraksi alginat. Proses ekstraksi alginat tersebut, diduga masih terdapat residu dari proses penambahan alkohol (isopropil alkohol) untuk mengendapkan sodium alginat dari larutan.

Visualisasi hasil uji subset untuk melihat sel limfosit jenis apa yang berproliferasi disajikan pada Gambar 4. Hasil uji subset sel limfosit tersebut terlihat bahwa sel CD4 atau sel T *helper* pada kontrol secara nyata lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan penambahan OSA, dan sebaliknya sel CD8 atau sel T sitotoksik kontrol lebih rendah dibandingkan perlakuan penambahan OSA. Hal ini mengindikasikan bahwa proliferasi sel limfosit yang diinduksi oleh penambahan OSA ini cenderung meningkatkan sel T sitotoksik. Hasil perhitungan proporsi peningkatan sel CD8 disajikan pada Tabel 2. Peningkatan sel T sitotoksik ini dari 28,53±0,06% menjadi 31,47±0,31%. Sel T sitotoksik atau CD8 sel adalah sel T yang bertanggung jawab untuk cell-mediated cytotoxicity, yang akan membunuh sel yang telah diinfeksi oleh antigen spesifik, menunda hipersensitivitas dan membunuh sel tumor dan sel jaringan transplantasi. Sel T sitotoksik mampu mengenali dan merusak sel target yang terinfeksi antigen spesifik menggunakan reseptor antigen yang ada padanya. Iwamoto *et al.* (2005) menunjukkan bahwa OSA mampu menginduksi beberapa jenis sitokin, salah satunya TNF α . Sitokin ini berperan terhadap mekanisme pertahanan tubuh salah satunya melawan sel-sel yang tidak normal seperti tumor dan kanker. Sitokin ini juga menginduksi aktivasi sel T sitotoksik, karena fungsinya yang saling mendukung untuk melawan sel-sel tumor atau kanker (Takao *et al.* 2005). Hal ini

mungkin dapat menjelaskan mekanisme sel yang berproliferasi dengan penambahan OSA ini adalah sel CD8 atau T sitotoksik.

Penambahan OSA juga meningkatkan secara nyata persentase sel limfosit non CD4 dan CD8. Persentase sel limfosit non CD4 dan non CD8 ini dari $41,3 \pm 0,17\%$ pada kontrol menjadi $44,33 \pm 0,76\%$ pada perlakuan penambahan OSA. Sel limfosit non CD4 dan CD8 yang kemungkinan ikut berproliferasi ini salah satunya adalah sel B. Safai dan Good (2013) mekanisme aktivasi sel limfosit oleh antigen dan mitogen tidak terdapat perbedaan yang besar, sehingga mitogen ini tidak hanya menyebabkan proliferasi sel T tetapi juga dapat menginduksi proliferasi sel B.

KESIMPULAN

Produksi oligosakarida alginat (OSA) secara enzimatik dari rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* berhasil dilakukan dengan bantuan enzim yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus megaterium* S245. Perlakuan konsentrasi enzim dan lama waktu inkubasi dalam produksi OSA menghasilkan derajat polimerisasi produk berada di kisaran DP 2-7. Uji aktivitas produk OSA sebagai imunomodulator menunjukkan bahwa oligomer ini mampu menginduksi proliferasi sel limfosit manusia. Uji lanjut menunjukkan bahwa jenis sel limfosit yang diinduksi proliferasinya adalah sel CD 8 atau sel T sitotoksik serta sel non CD4/CD8. Kondisi produksi OSA dengan penambahan enzim alginat lyase 50 U dan inkubasi selama 2 jam menghasilkan OSA yang memiliki indeks proliferasi limfosit tertinggi yaitu $117,6 \pm 3,6\%$ atau meningkat sebesar $43,24\%$ dibandingkan polimer alginatnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Fajarningsih ND, Nursid M, Wikanta T. 2008. Bioaktivitas ekstrak *Turbinaria decurrens* sebagai antitumor (HeLa dan T47D) serta proliferasi limfosit. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 3(1): 21-27.
- Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T. 2005. Structure-activity relationship of alginat oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 579(20):4423-4429.
- Iwamoto Y, Hidaka H, Oda T, Muramatsu T. 2003. A study of tryptophan fluorescence quenching of bifunctional alginat lyase from a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain No. 272 by acrylamide. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 67(9): 1990-1992.
- Kar S, Sharma G, Das PK. 2011. Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and -resistant strains of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage-derived oxidants. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 66(3): 618-625.
- Kusmardi, Kumala S, Triana EE. 2007. Efek imunomodulator ekstrak daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. *Makara Kesehatan*. 11(2): 50-53.
- Li L, Jiang X, Guan H, Wang P. 2011. Preparation, purification and characterization of alginat oligosaccharides degraded by alginat lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216. *Carbohydrate Research*. 346(6): 794-800.
- Mao WJ, Li BF, Gu QQ, Fang YC, Xing HT. 2004. Preliminary studies on the chemical characterization and antihyperlipidemic activity of polysaccharide from the brown alga *Sargassum fusiforme*. *Hydrobiologia*. 512(1): 263-266.
- Muchmore AV, Decker JM, Blaese RM. 1980. Evidence that specific oligosaccharides block early events necessary for the expression of antigen-specific proliferation by human lymphocytes. *Journal of Immunology*. 125(3): 1306-1311.
- Rasyid A. 2003^a. *Turbinaria conoides* as one of alternative raw materials of sodium alginat processing in Indonesia. Papers International Seminar on Marine and Fisheries. p210-212.
- Rasyid A. 2003^b. Utilization of *Turbinaria decurrens* as one of raw material of sodium alginat. Papers International Seminar on Marine and Fisheries. p213-215.

- Safai B, Good RA. 2013. Immunodermatology. New York: Pelum Medical Book Company.
- Sakugawa K, Ikeda A, Takemura A, Ono H. 2004. Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR. *Journal Applied Polymer Science*. 93: 1372-1377.
- Sheu JH, Wang GH, Sung PJ, Duh CY. 1999. New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. *Journal of Natural Products*. 62(2): 224-227.
- Subaryono, Peranginangin R, Fardiaz D, Kusnandar F. 2009. Sifat fisiko-kimia alginat dari rumput laut *Sargassum filipendula* dan *Turbinaria decurrens* dari Perairan Binuangeun. Prosiding Seminar Nasional Kelautan V. Universitas Hang Tuah 23 April 2009. (II): 529-536.
- Subaryono. 2011. Potensi dan Peluang Pemanfaatan Rumput Laut Coklat di Indonesia. *Squalen*. 6(2): 55-62.
- Takao T, Kumagai C, Hisakawa N, Matsumoto R, Hashimoto K. 2005. Effect of 17 β -estradiol on tumor necrosis factor- α -induced cytotoxicity in the human peripheral *T lymphocyte*. *Journal of Endocrinology*. 184(1): 191-197.
- Vetvicka V, Baigorri R, Zamarreno AM, Garcia-Mina JM, Yvin JC. 2010. β -glucan and humic acids: Synergistic effects on the immune system. *Journal Medical Food*. 13(4): 863-869.
- Wahyuni, S. 2006. Aktivitas Kitoooligomer Hasil Reaksi Enzimatik Terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Sel Kanker. [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Wang Y, Han F, Hu B, Li J, Yu W. 2006. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*. 26(1): 597-603.
- Wiedosari E. 2007. Peranan imunomodulator alami (Aloe vera) dalam sistem imunitas seluler dan humoral. *Wartazoa*. 17(4): 165-171.
- Zakaria FR, Nurahman, Prangdimurti E, Tejasari. 2003. Antioxidant and Immunoenhancement Activities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extracts and Compounds *in vitro* and Vivo Mouse and Human System. *Nutraceutical Foods*. 8(1): 96-104.