

ISOLASI HEPARIN DARI JEROAN IKAN TUNA (*Thunnus sp.*)

Safrina Dyah Hardiningtyas^{1*}, Hanin Bela Kartika,¹ Kustiariyah Tarman^{1,2}

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB University
Jalan Agatis, Lingkar Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia 16680

²Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan (PKSPL), Kampus IPB Baranangsiang,
Jalan Raya Pajajaran No. 1, Bogor, Indonesia 16127

Diterima: 1 April 2023/Disetujui: 31 Agustus 2023

*Korespondensi: safrina_dyah@apps.ipb.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Hardiningtyas, S. D., Kartika, H. B., & Tarman, K. (2023). Isolasi heparin dari jeroan ikan tuna (*Thunnus sp.*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 26(3), 361-369. <http://dx.doi.org/10.17844/jphphi.v26i3.46634>

Abstrak

Ikan tuna merupakan komoditas penting Indonesia dengan nilai produksi yang meningkat setiap tahun. Pengolahan daging ikan tuna menghasilkan limbah 50-70%. Jeroan merupakan limbah yang dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan biomaterial baru, contohnya heparin. Tujuan penelitian adalah untuk menentukan bagian jeroan ikan tuna (hati, lambung, serta usus dan sekum pilorus) yang menghasilkan komponen heparin terbanyak. Ekstraksi heparin dilakukan dengan metode enzimatik menggunakan enzim papain. Ekstrak kasar heparin dipurifikasi lebih lanjut dengan fraksinasi aseton. Gugus fungsi heparin murni dianalisis menggunakan FTIR spektrofotometer dan kandungan heparin ditentukan menggunakan *sulfate GAG assay*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa usus dan sekum pilorus menghasilkan rendemen ekstrak kasar, yaitu $0,66 \pm 0,06\%$ dengan kandungan heparin tertinggi 43%. Heparin murni dari jeroan ikan tuna memiliki gugus fungsi penciri senyawa heparin, yaitu karboksil, asetil, hidroksil, siklus ester, dan atom N tersulfasi. Penelitian ini menunjukkan bahwa jeroan ikan tuna dapat menjadi alternatif sumber heparin.

Kata kunci: biomaterial, enzimatik, limbah, sekum pilorus, usus

Isolation of Heparin from Tuna Viscera (*Thunnus sp.*)

Abstract

Tuna is a valuable commodity in Indonesia and its production value has been increasing annually. Tuna meat processing produces 50-70% waste. The use of viscera waste in the production of novel biomaterials, including heparin, has been documented. The aim of this study was to determine the tuna viscera sections (liver, stomach, intestine, and pyloric caeca) that yield the highest concentrations of heparin components. Heparin extraction was accomplished using an enzymatic technique utilizing papain. Crude heparin extract was subjected to acetone fractionation for further purification. The functional groups of pure heparin were analyzed using a Fourier Transform Infrared (FTIR) spectrophotometer, while the heparin content was determined using a sulfate glycosaminoglycan (GAG) assay. The findings of the study indicated that the intestinal and pyloric caeca had a heparin content of 43% and yielded $0.66 \pm 0.06\%$. Pure heparin tuna viscera comprise various functional groups, including carboxyl, acetyl, hydroxyl, ester cycles, and sulfated N atoms. This research indicates that tuna viscera has the potential to serve as a substitute for heparin.

Keywords: biomaterial, enzymatic, intestine, pyloric caeca, waste

PENDAHULUAN

Tuna, cakalang, dan tongkol (TCT) merupakan komoditas penting di Indonesia dengan nilai produksi 319.325 ton pada tahun 2019 (Pusdatik KKP, 2023). Komoditas TCT telah diolah menjadi berbagai produk oleh industri pengolahan perikanan dan menghasilkan limbah sebanyak 50-70% berupa jeroan, kepala, tulang, sirip, kulit, gonad, dan tetelan daging sisa filet (Villamil *et al.*, 2017). Limbah jeroan sebesar 15% yang terdiri atas lambung, usus, hati, limpa, dan gelembung renang. Jeroan mengandung komponen yang dapat dijadikan biomaterial baru, antara lain heparin, proteoglikan/glikosaminoglikan, kolagen, enzim, dan gelatin.

Heparin merupakan polisakarida linier dengan gugus sulfat yang termasuk dalam kelompok glikosaminoglikan (GAG) dan terkenal sebagai obat antikoagulan (Gandhi & Mancera, 2008). Obat antikoagulan sangat dibutuhkan oleh penderita penyakit akibat trombosis atau penggumpalan darah, yaitu stroke, serangan jantung, dan tromboemboli vena (Raskob *et al.*, 2014). Penyakit stroke di Indonesia menjadi penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung iskemik dengan tingkat kematian 3.572.000 jiwa pada tahun 2019 (WHO, 2020). Kematian dan kecacatan akibat stroke secara global terjadi di negara berpenghasilan rendah dan menengah sebesar 87% (Johnson *et al.*, 2016).

Heparin umumnya diperoleh dari jaringan hewan mamalia, yaitu sapi dan babi. Jaringan dari organ dalam, yaitu usus dan paru-paru dari babi dan sapi menjadi sumber utama bahan baku heparin (Fu *et al.*, 2013). Penggunaan hewan mamalia sebagai sumber produksi heparin memungkinkan terdapatnya kontaminan, yaitu spora *bovine encephalitis* yang menyebabkan penyakit sapi gila (Mestechkina & Shcherbukhin, 2010). Bahan baku heparin dari mamalia juga dapat menjadi penghalang dalam penggunaannya untuk beberapa kepercayaan dan agama (Ogden, 2016). Alternatif bahan baku heparin yang lebih aman, murah, dan memiliki ketersediaan melimpah diperlukan. Jeske *et al.* (2007) menyatakan heparin dapat diekstraksi dari kulit ikan tuna. Flengsrud *et*

al. (2010) juga melaporkan bahwa insang dan usus ikan salmon Atlantik yang dibudidaya dapat menjadi sumber bahan baku heparin. Penelitian mengenai ekstraksi heparin dari jeroan ikan tuna belum dilaporkan. Tujuan penelitian adalah menentukan bagian jeroan ikan tuna (hati, lambung, serta usus dan sekum pilorus) yang menghasilkan komponen heparin terbanyak.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Jeroan Ikan Tuna

Ikan tuna didapatkan dari Pelabuhan Perikanan Nusantara, Palabuhan Ratu. Ikan tuna masih dalam kondisi segar sesuai dengan SNI 2729:2021. Jeroan dipisahkan dari tubuh ikan dan disimpan dalam *freezer* bersuhu -20°C. Jeroan dikirim ke Bogor melalui moda transportasi darat dengan menjaga suhu sampel tetap beku. Jeroan yang digunakan pada penelitian, yaitu lambung, hati, usus dan sekum pilorus. Sampel dicuci dengan air mengalir, kemudian direndam dalam larutan aseton teknis selama 10 menit per bagian dengan dua kali pengulangan dan dikeringkan dalam suhu ruang.

Ekstraksi Heparin (Jeske *et al.*, 2007)

Ekstraksi heparin dari jeroan mengacu pada Jeske *et al.* (2007) dengan modifikasi pada jumlah enzim yang digunakan. Jeroan (150 g) masing-masing ditambahkan 750 mL akuades dan dilumatkan menggunakan blender. Lumatan ditambahkan NaCl 2% (Central Kimia) kemudian pH dinaikkan menjadi 8. Enzim papain (30.000 USP-U/mg, Merck) 1 mL ditambahkan lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 6 jam. Sampel direbus selama 10 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik. Sampel yang telah dingin disaring dengan nilon 400 *mesh* untuk mendapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 50 g Amberlite IR900 anion resin makropori (PT Bratacem Bandung) dan disimpan pada suhu ruang selama 12-24 jam. Resin disaring dan dicuci dengan air suhu 50-55°C. Glikosaminoglikan yang terkandung pada resin dielusi menggunakan larutan hangat NaCl 16% (Merck). Eluen selanjutnya dipresipitasi menggunakan isopropil alkohol

(Central kimia) untuk memisahkan senyawa heparin. Hasil presipitasi dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, kemudian ditimbang untuk mengetahui bobot ekstrak kasar heparin. Rendemen ekstrak kasar heparin dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak heparin kasar (g)}}{\text{bobot bahan baku (g)}} \times 100$$

Analisis Konsentrasi Heparin (Zhou *et al.*, 2002)

Analisis konsentrasi heparin yang terkandung pada ekstrak kasar menggunakan metode *sulfate GAG assay* dengan spektrofotometri. Biru metilena (Merck) 25 mg dilarutkan ke dalam 50 mL air demineral, kemudian diambil 5 mL (larutan stok) diencerkan dengan air demineral (Onelab WaterOne) hingga 30 mL. Larutan heparin standar (sodium heparin inviclot 5.000 IU/mL,) dibuat menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/mL Ekstrak kasar heparin kering yang diperoleh ditambahkan air demineral 1 mL, kemudian di-vortex hingga homogen.

Larutan stok sampel atau heparin standar dibuat dengan mencampur 0,25 mL ekstrak heparin kasar ke dalam 0,25 mL air demineral dan ditambahkan larutan stok biru metilena 2,5 mL. Larutan tersebut kemudian didiamkan hingga 2 jam dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* (Thermo Scientific – Multiskan Go) pada panjang gelombang 570 nm. Hubungan konsentrasi larutan heparin standar dan absorbansi dianalisis dengan regresi linear sehingga diperoleh persamaan: $y = bx + a$. Persamaan regresi linear tersebut digunakan untuk menghitung konsentrasi heparin pada sampel.

Purifikasi Ekstrak Heparin (Dietrich *et al.*, 1999)

Ekstrak kasar heparin ditambahkan akuades pH 5 dan 0,3 M NaCl (Merck) dengan rasio 1:20 (b/v) dan dihomogenkan. Larutan tersebut ditambahkan aseton 40% dari volume sampel dan disimpan pada suhu 5°C selama 24 jam. Larutan disentrifugasi (Thermo Scientific–SL 8R *centrifuge*) selama 30 menit

dengan kecepatan 3.260xg. Supernatan ditambahkan aseton 55% dari volume larutan sampel kemudian disimpan pada suhu 5°C selama 24 jam. Larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Hasil endapan sentrifugasi dikeringkan suhu 50°C dan dianalisis gugus fungsi menggunakan *fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR).

Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap yang terdiri dari satu faktor, yaitu jeroan ikan tuna. Data yang diperoleh dianalisis dengan metode *one way ANOVA* menggunakan aplikasi SPSS. Data yang menunjukkan pengaruh yang signifikan pada selang kepercayaan 95% ($p < 0,05$) diuji lanjut menggunakan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Heparin

Ketampakan jeroan ikan tuna disajikan pada *Figure 1*. Jeroan mengandung komponen yang dapat dimanfaatkan, yaitu protein, lemak, enzim, dan glikosaminoglikan (GAG). Raghuraman (2013) menyatakan bahwa jeroan ikan hering dan makerel mengandung glikosaminoglikan (GAG) bersulfat.

Rendemen heparin dapat dilihat pada *Figure 2*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan bagian jeroan ikan tuna menghasilkan rendemen ekstrak heparin yang berbeda secara signifikan ($p < 0,05$). Rendemen ekstrak heparin tertinggi diperoleh dari bagian usus dan sekum pilorus sebesar $0,66 \pm 0,06\%$. Rendemen hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan heparin udang dan kerang. Dietrich *et al.* (1999) melaporkan bahwa heparin murni dari kepala dan jeroan udang *Penaeus* sebesar 0,003%. Hasil penelitian Cesaretti *et al.* (2004) menunjukkan bahwa rendemen heparin murni dari kerang *Tapes philippinarum* sebesar 0,214%. Usus menjadi sumber potensial untuk mendapatkan heparin. Heparin yang paling banyak dikomersialisasikan berasal dari usus babi atau sapi. Hal ini karena rendemen heparin usus lebih tinggi dibandingkan dari bagian paru-paru dan hati (Vardayan & Hrubby, 2006; Fu *et al.*, 2013). Valcarcel *et al.* (2017) menyatakan

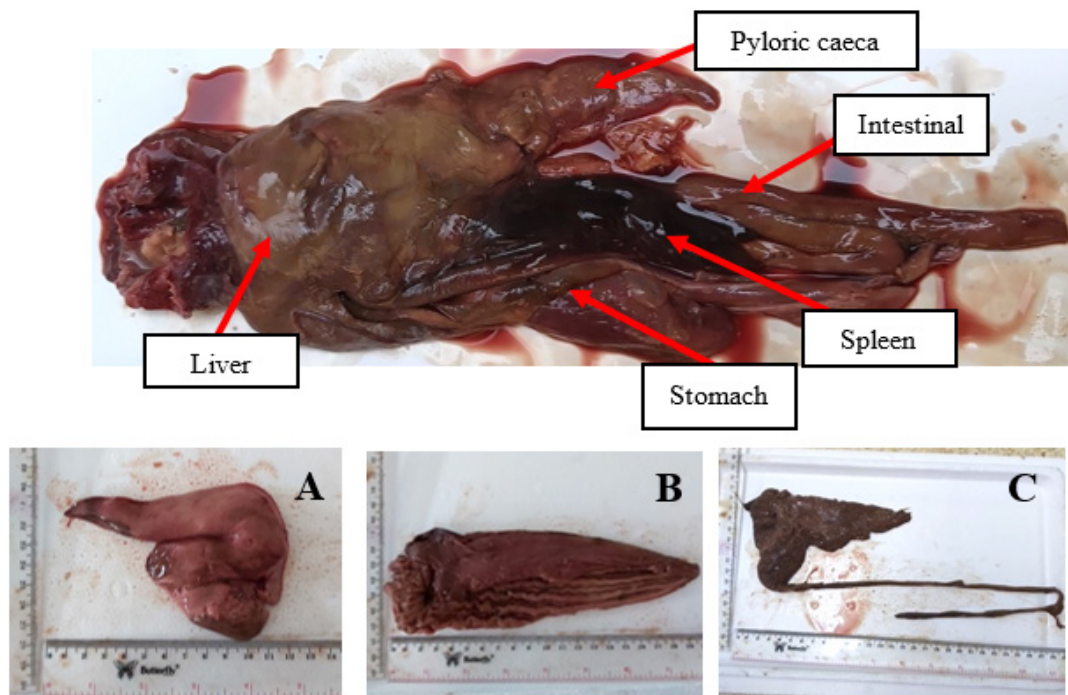


Figure 1 Appearance of tuna liver (A), stomach (B), intestinal and pyloric caeca (C)
 Gambar 1 Ketampakan hati tuna (A), lambung (B), usus dan sekum pilorus (C)

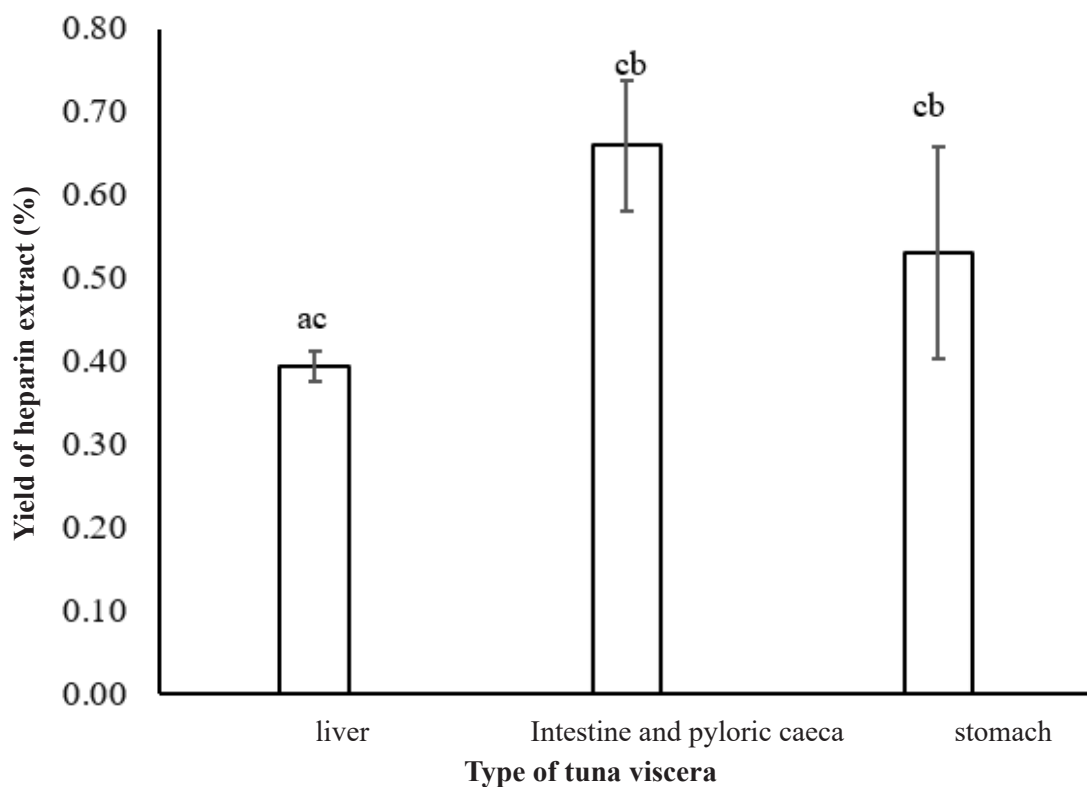


Figure 2 Yield of heparin crude extract from tuna viscera
 Gambar 2 Rendemen ekstrak heparin kasar dari jeroan tuna

bahwa faktor-faktor yang dapat memengaruhi komponen GAG bersulfat pada ikan, yaitu kondisi lingkungan, penyusun matriks, masa otot pada spesies ikan untuk perilaku berenang, bentuk tubuh dan fleksibilitas matriks tulang.

Heparin terdapat pada dinding usus diduga karena adanya pembuluh darah dan *mast cell*. Biosintesis heparin pada jaringan makhluk hidup terjadi di aparatus golgi sel *mast* dan retikulum endoplasma (Onishi *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017). *Mast cell* banyak ditemukan pada jaringan saluran pencernaan (usus), insang, dan kulit (Crivellato *et al.*, 2015). Konsentrasi heparin yang tinggi juga berkaitan dengan fungsi usus sebagai bagian dari mekanisme pertahanan tubuh terhadap pembekuan darah. Usus mengandung pembuluh darah kecil yang dapat mengalami kerusakan akibat paparan zat-zat asing atau bakteri. Kamhi *et al.* (2013) menyatakan *mast cell* pada jaringan usus juga berperan penting untuk merespons infeksi yang umum terjadi dengan cara memproduksi heparin. Heparin berperan dalam menghambat pembekuan darah sehingga mencegah penyumbatan pembuluh darah.

Konsentrasi Heparin pada Ekstrak Kasar

Konsentrasi ekstrak heparin kasar diukur dengan *sulfate glycosaminoglycan assay*. Metode ini merupakan metode yang selektif untuk mengukur kandungan heparin. Biru metilena digunakan sebagai indikator keberadaan senyawa heparin pada suatu sampel. Heparin hanya dapat berinteraksi dengan biru metilena karena adanya makro molekul yang saling berikatan, yaitu gugus karboksil dan sulfat. Proses pengikatan terjadi karena adanya tarikan elektrostatis dari heparin dan biru metilena serta gaya van der Waals (Liu & Jiao, 1998). Pembentukan kompleks heparin dan biru metilena ditunjukkan dengan perubahan nilai absorbansi biru metilena (Jiao *et al.*, 1999) Konsentrasi heparin pada ekstrak kasar jeroan tuna dapat dilihat pada *Figure 3*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan heparin pada ekstrak kasar dari beberapa bagian jeroan tuna memiliki nilai yang berbeda signifikan ($p < 0,05$). Konsentrasi heparin tertinggi terdapat pada ekstrak kasar heparin dari usus dan sekum pilorus sebesar $0,43 \pm 0,1$ g/g ekstrak (*Figure 3*). Persentase heparin pada masing-masing

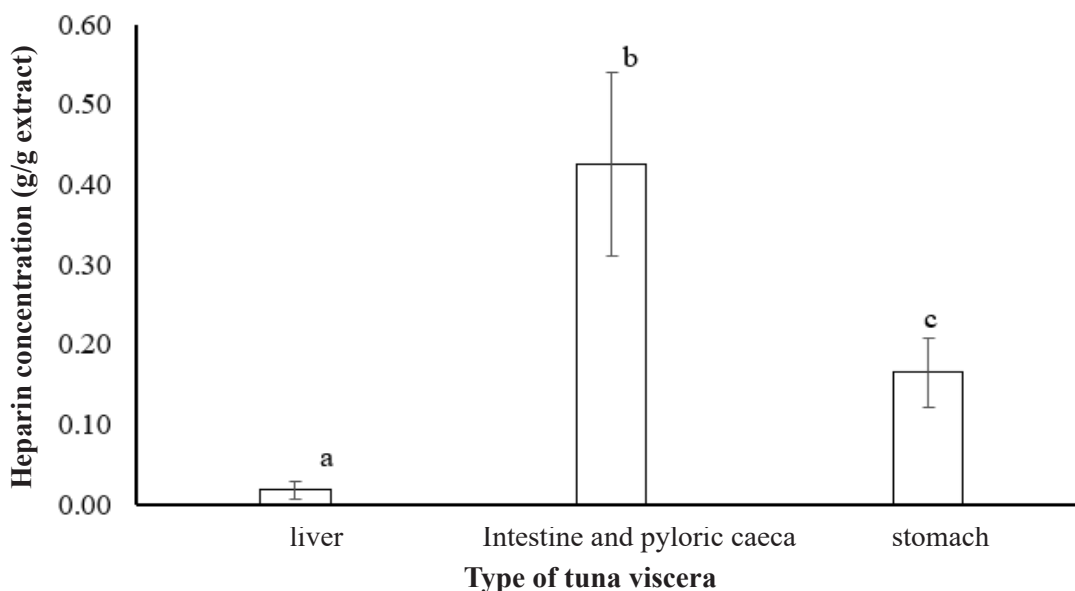


Figure 3 Heparin concentration of tuna viscera crude extract; different superscript letters indicate significant difference ($p < 0.05$)

Gambar 3 Konsentrasi heparin dari ekstrak kasar jeroan tuna; huruf superskrip berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$)

jeroan, yaitu usus dan sekum pilorus sebesar 43%, lambung 17%, dan hati 3%. Ekstrak kasar heparin pada penelitian masih mengandung residu lain, yaitu kristal garam, lemak, dan sisa pelarut, sehingga menambah bobot ekstrak kasar. Tahap purifikasi lebih lanjut diperlukan untuk mendapatkan senyawa heparin murni.

Heparin yang diekstrak dari jaringan hewan memiliki kemurnian dan keberagaman struktur kimia berdasarkan spesies hewan, usia, jenis kelamin, kesehatan, jenis pakan, dan faktor lingkungan lainnya (Qiao *et al.*, 2020). Faktor lain yang memengaruhi keberagaman jumlah heparin khususnya pada ikan, yaitu perbedaan penyusun matriks dan otot yang disebabkan perilaku berenang serta bentuk tubuhnya (Raghuraman, 2013). Perbedaan karakteristik heparin kulit tuna dengan heparin mukosa babi menunjukkan potensi biologis yang bervariasi tergantung pada spesies dan struktur penyusunnya (Jeske *et al.*, 2007).

Profil Gugus Fungsi Heparin Murni

Analisis gugus fungsi menggunakan FTIR spektrofotometer bertujuan untuk mengetahui profil senyawa heparin yang diperoleh dari jeroan tuna. Spektrum FTIR heparin murni dari jeroan tuna disajikan pada *Figure 4*.

Heparin dari jeroan tuna yang berbeda memiliki titik lembah transisi yang sama. Hal ini menunjukkan gugus fungsi khas dari senyawa heparin. Devlin *et al.* (2019) menyatakan bahwa senyawa heparin memiliki beberapa gugus fungsi penciri yang diinisiasi oleh penyusun polisakaridanya, yaitu peregangan gugus karboksil, gugus N-asetil dengan peregangan C=O dan N-H, peregangan atom nitrogen (N) dan oksigen (O) yang tersulfasi, serta deformasi C-O-C yang berhubungan dengan karbohidrat dan terletak disekitar ikatan glikosidik. Spektrum FTIR sesuai *Figure 4* menunjukkan bahwa heparin jeroan tuna memiliki beberapa

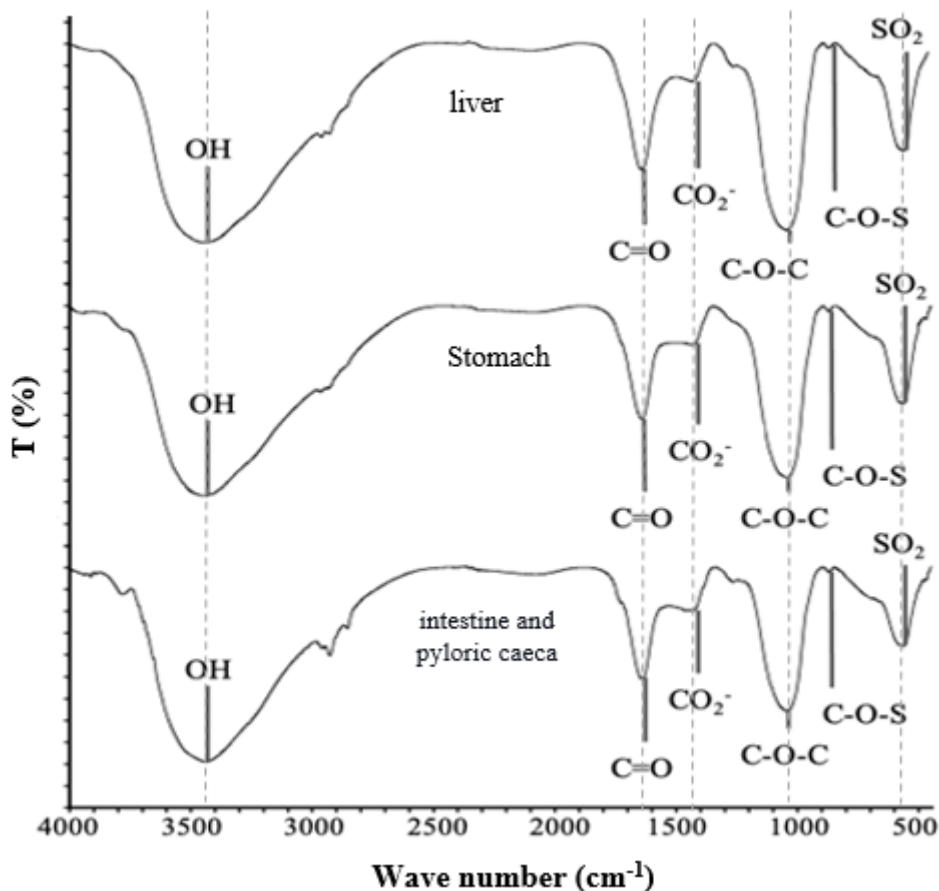


Figure 4 FTIR spectrum of pure heparin from tuna viscera

Gambar 4 Spektrum FTIR heparin murni dari jeroan tuna

puncak inframerah pada bilangan gelombang, antara lain 3.432-3.443 cm^{-1} , 1.641-1.646 cm^{-1} , 1.432-1.435 cm^{-1} , 1.041-1.051 cm^{-1} , dan 564-567 cm^{-1} . Puncak tersebut merupakan gugus penciri dari heparin.

Karimzadeh (2018) menyatakan bahwa karakteristik atom N tersulfasi ditunjukkan pada bilangan gelombang 600-520 cm^{-1} , dengan getaran yang dihasilkan dari SO_2 . Bilangan gelombang pada kisaran 3.640-3.160 cm^{-1} menandakan peregangan gugus hidroksil (OH) dengan intensitas kuat pada heparin. Socrates (2001) menjelaskan bahwa gugus asetil (C=O) yang berikatan dengan atom N pada monosakarida glukosamin teridentifikasi pada bilangan gelombang 1.680-1.630 cm^{-1} . Gugus karboksil (CO_2^-) dalam monosakarida asam uronat teramati pada rentang panjang gelombang 1.440-1.335 cm^{-1} . Gugus siklus eter yang mencirikan monosakarida karbohidrat pada glikosaminoglikan jenis heparin teramati dengan panjang gelombang 1.270-1.030 cm^{-1} . Atom O yang tersulfasi juga telah teramati dengan rentang panjang gelombang 1.020-850 cm^{-1} . Bilangan gelombang dan profil gugus fungsi heparin jeroan tuna dapat dilihat pada *Table 1*.

Rantai polisakarida heparin terbentuk dari N-asetil-D-glukosamin dan residu asam uronat yang dihubungkan melalui ikatan glikosidik α -(1 \rightarrow 4) (Oduah *et al.*, 2016). Residu utama glukosamin pada heparin terdiri

dari atom N yang terdeasetilasi, atom N yang tersulfasi pada gugus amina, gugus hidroksil yang tersulfasi pada atom karbon (C) keenam, serta yang jarang terjadi molekul sulfat yang dapat terletak pada atom C ketiga. Asam uronat pada heparin terbentuk dari residu α -L-asam iduronat dengan molekul sulfat pada atom C kedua serta β -D-asam glukuronat epimerik pada atom C kelima (Mestechkina & Shcherbukhin, 2010). Komposisi residu asam uronat pada heparin umumnya 90% L-asam idopiranosiluronat (L-asam iduronat) dan 10% D-asam glukopiranosiluronat (D-asam glukuronat) (Gandhi & Mancera, 2008).

KESIMPULAN

Heparin berhasil diisolasi dari jeroan tuna. Usus dan sekum pilorus merupakan bagian jeroan yang paling banyak mengandung heparin. Heparin murni dari jeroan tuna memiliki gugus fungsi penciri senyawa heparin.

DAFTAR PUSTAKA

- Beni, S., Limtiaco, J. F. K., & Larive, C. K. (2011). Analysis and characterization of heparin impurities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 527–539. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4121-x>.
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N. (2004). Isolation and characterization of

Table 1 Functional group profiles of pure heparin from tuna viscera

Tabel 1 Profil gugus fungsi heparin jeroan tuna

Wave number (cm^{-1})			Range of wave number (cm^{-1})	Functional group	Note
Liver	Stomach	Intestine and pyloric caeca			
3,443	3,432	3,435	3,640–3,160 ¹	Hydroxyl	Stretching -OH
1,641	1,642	1,646	1,680–1,630 ²	Amide II	C=O
1,435	1,432	1,434	1,440–1,335 ²	Carboxylate	CO_2^- ; Symmetric O=C–O–
1,044	1,051	1,041	1,270–1,030 ²	Cyclic ether	Symmetric C–O–C
873	873	872	1,020–850 ²	Hydroxyl sulfated	Asymmetric S–O–CH ²
564	567	564	600–520 ²	SO_2 –NH	Vibration SO_2 –NH

¹Karimzadeh (2018); ²Socrates (2001)

- a heparin with high anticoagulant activity from the clam tapes phylippinarum: evidence for the presence of a high content of antithrombin III binding site. *Glycobiology*, 14(12), 1275–1284. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh128>.
- Crivellato, E., Travan, L., & Ribatti, D. (2015). The Phylogenetic Profile of Mast Cells. Di dalam: Hughes MR, McNagny KM, editor. *Mast Cells: Methods and Protocols Second Edition*. Volume ke-1220. Humana Press.
- Devlin, A., Mycroft-West, C. J., Turnbull, J. E., Guerrini, M., Yates, E. A., & Skidmore, & M. A. (2019). Analysis of solid-state heparin samples by ATR-FTIR spectroscopy. *bioRxiv*, 1(1), 1–20. <https://doi.org/10.1101/538074>.
- Dietrich, C. P., Paiva, J. F., Castro, R. A. B., Chavante, S. F., Jeske, W., Fareed, J., Gorin, P. A. J., Mendes, A., & Nader, H. B. (1999). Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1428(2–3), 273–283. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00087-2).
- Flengsrud, R., Larsen, M. L., & Odegaard, O. R. (2010). Purification, characterization and in vivo studies of salmon heparin. *Thrombosis Research*, 126(6), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.07.004>.
- Fu, L., Li, G., Yang, B., Onishi, A., Li, L., Sun, P., Zhang, F., & Linhardt, R. J. (2013). Structural characterization of pharmaceutical heparins prepared from different animal tissues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(5), 1447–1457. <https://doi.org/10.1002/jps.23501>.
- Gandhi, N. S., & Mancera, R. L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, 72(6), 455–482. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x>.
- Jeske, W. P., McDonald, M. K., Hoppensteadt, D. A., Bau, E. C., Mendes, A., Dietrich, C. P., Walenga, J. M., & Coyne, E. (2007). Isolation and characterization of heparin from tuna skins. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Sage Journals*, 13(2), 137–145. <https://doi.org/10.1177/1076029606298982>.
- Jiao, Q. C., Liu, Q., Sun, C., & He, H. (1999). Investigation on the binding site in heparin by spectrophotometry. *Talanta*, 48(5), 1095–1101. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00330-0).
- Johnson, W., Onuma, O., Owolabi, M., & Sachdev, S. (2016). Stroke: A global response is needed. *Bulletin of The World Health Organization*, 94(9), 634A–635A. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.181636>.
- Kamhi, E., Joo, E. J., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2013). Glycosaminoglycans in infectious disease. *Biological Reviews*, 88, 928–943. <https://doi.org/10.1111/brv.12034>.
- Karimzadeh, K. (2018). Anticoagulant Effects of Glycosaminoglycan Extracted from Fish Scales. *International Journal of Basic Science in Medicine*, 3(2), 72–77. <https://doi.org/10.15171/ijbsm.2018.13>.
- Liu, Q., & Jiao, Q. (1998). Mechanism of methylene blue action and interference in the heparin assay. *Spectroscopy Letters*, 31(5), 913–924. <https://doi.org/10.1080/00387019808003271>.
- Mestechkina, N. M., & Shcherbukhin, V. D. (2010). Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(3), 267–273. <https://doi.org/10.1134/S000368381003004X>.
- Oduah, E. I., Linhardt, R. J., & Sharfstein, S. T. (2016). Heparin: Past, present, and future. *Pharmaceuticals*, 9(38), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ph9030038>.
- Ogden, J. (2016). Religious constraints on prescribing medication. *Prescriber*, 27(12), 47–51. <https://doi.org/10.1002/psb.1524>.
- Onishi, A., St Ange, K., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2016). Heparin and anticoagulation. *Front Biosci – Landmark*, 21(7), 1372–1392. <https://doi.org/10.2741/4462>.
- Pusdatik. (2023). Pengolahan Data Produksi Kelautan dan Perikanan. <https://statistik.kkp.go.id/home>.

- php?m=total&i=2#panel-footer.
- Qiao, M., Lin, L., Xia, K., Li, J., Zhang, X., & Linhardt, R. J. (2020). Recent advances in biotechnology for heparin and heparan sulfate analysis. *Talanta*, 219, 121–270. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121270>.
- Raghuraman, H. (2013). Extraction of Sulfated Glycosaminoglycans from Mackarel and Herring Fish Waste. Dalhousie University.
- Raskob, G. E., Angchaisuksiri, P., Blanco, A. N., Büller, H., Gallus, A., Hunt, B. J., Hylek, E. M., Kakkar, T. L., Konstantinides, S. V., & McCumber, M., *et al.* (2014). Thrombosis: A major contributor to global disease burden. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(7), 724–735. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1390325>.
- Socrates, G. (2001). Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. John Wiley and Sons Ltd.
- Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pérez-Martín, R. I., Reis, R. L., & Vázquez, J. A. (2017). Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. *Biotechnology Advances*, 35(6), 711–725. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.008>.
- Vardanyan, R. S., & Hruby, V. J. (2006). 24 - Anticoagulants, Antiaggregants, Thrombolytics, and Hemostatics. Editor(s): R.S. Vardanyan, V.J. Hruby. *Synthesis of Essential Drugs*, 323–335. <https://doi.org/10.1016/B978-044452166-8/50024-8>.
- Villamil, O., Váquiro, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>.
- World Health Organization. (2020). Global Health Estimates 2019: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019.
- Yu, Y., Chen, Y., Mikael, P., Zhang, F., Stalcup, A. M., German, R., Gould, F., Ohlemacher, J., Zhan,g H., & Linhardt, R. J. (2017). Surprising absence of heparin in the intestinal mucosa of baby pigs. *Glycobiology*, 27(1), 57–63. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww104>.
- Zhou, S. G., Jiao, Q. C., Chen, L., & Liu, Q. (2002). Binding interaction between chondroitin sulfate and methylene blue by spectrophotometry. *Spectroscopy Letters*, 35(1), 21–29. <https://doi.org/10.1081/SL-120013130>.