

**POTENSI BIOAKTIF EKSTRAK ALGA MERAH (*Gracillaria verrucosa*)
TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN
HISTOLOGI PARU TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*)
PASCA INDUKSI FORMALIN**

**BIOACTIVE POTENCY OF RED ALGAE (*Gracillaria verrucosa*) EXTRACT
TOWARDS MALONDIALDEHYDE LEVEL AND LUNG HISTOLOGY OF
WHITE RAT (*Rattus novergicus*) AFTER FORMALIN INDUCTION**

**Anggun Tanduwinata, Helmi Auliyah Istiqomah, Jamilah, Ni Luh Kemmy Caesaria,
Rizki Rahmat Saputra, Aulanni'am¹**

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya
email: ¹aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Indonesia merupakan negara megabiodiversitas yang banyak mengandung kekayaan alam, salah satunya alga merah. Alga merah (*Gracillaria verrucosa*) mengandung senyawa fikosianin, fikoeretin dan karotenoid yang berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi bioaktif ekstrak alga merah untuk terapi hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) berdasarkan kadar malondialdehida (MDA) dan gambaran histologi paru. Metode penelitian yang dilakukan meliputi ekstraksi alga merah dan karakterisasi, induksi hewan coba (*R. novergicus*) dengan formalin, kemudian terapi ekstrak alga merah dengan variasi dosis. Berdasarkan uji fitokimia, analisis dengan FTIR dan LCMS, ekstrak alga merah mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, alkaloid, β -karoten, β -apo-8'-karotenal dan α -tokoferol yang berperan sebagai antioksidan. Formalin dapat meningkatkan kadar MDA serta menyebabkan kerusakan sel epitel bronkus dibandingkan dengan keadaan normal. Pemberian terapi dengan dosis yang sesuai akan menurunkan kadar MDA dan memperbaiki keadaan sel epitel bronkus. Berdasarkan pengamatan parameter penelitian, diketahui bahwa dosis optimum yang sesuai untuk terapi kanker paru adalah 100 mg/kg BB.

Kata Kunci: ekstrak alga merah, histologi paru, induksi formalin, kadar MDA

ABSTRACT

Indonesia is a megabiodiversity state that has many natural sources. Red algae (*Gracillaria verrucosa*) as one of the natural sources, contains antioxidant compounds. The aim of this study was to determine the bioactive potency of red algae extract for white rat (*Rattus novergicus*) therapy, based on malondialdehyde (MDA) level and lung histology. The method consists of red algae extraction and characterization, induction of animal model with formalin and therapy with variation dosage. Based on phytochemistry test, FTIR and LCMS analysis, red algae extract contains flavonoid, terpenoid, alkaloid, β -carotene, β -apo-8'-carotenal, and α -tocopherol as antioxidant. Formalin can increase level of MDA and defect the bronchus epithelium cell than the normal condition. Appropriate dosage can decrease the MDA level and repair the bronchus epithelium cell. The optimum dosage is 100 mg/kg body weight.

Keywords: red algae extract, MDA level, lung histology, formalin induction

PENDAHULUAN

Saat ini banyak penyakit yang timbul akibat paparan senyawa karsinogenik. Formalin dikenal sebagai bahan pembunuh hama yang bersifat karsinogenik, sangat berbahaya bila terhirup, tertelan dan mengenai kulit. Akibat yang ditimbulkan berupa reaksi alergi, luka bakar pada kulit, iritasi saluran pernafasan dan bahaya kanker pada manusia (Heryani, 2011).

Antioksidan, salah satunya karotenoid merupakan senyawa yang dapat mencegah proses oksidasi radikal bebas. Pada manusia, reaksi oksidasi didorong oleh spesies oksigen reaktif yang jika tidak dinonaktifkan oleh senyawa antioksidan, akan menyebabkan kerusakan protein dan mutasi DNA sehingga menimbulkan penyakit kardiovaskuler, beberapa jenis kanker, penyakit degeneratif dan penuaan. Senyawa-senyawa antioksidan dapat melindungi jaringan dari kerusakan kimiawi dengan menyerap energi oksidasi singlet oksigen radikal ke dalam rantai karbon penyusunnya (Rao dan Rao, 2007).

Alga atau rumput laut merupakan hasil laut yang berlimpah. Indonesia merupakan pengeksport rumput laut terbesar kedua setelah Filipina (Khotimah, dkk, 2013). Alga merupakan salah satu penghasil karotenoid terbesar dengan banyak keragaman struktur. Betakaroten merupakan golongan karotenoid yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi sehingga mampu mengurangi risiko penyakit jantung, stroke, kanker paru-paru, payudara, prostat dan semua penyakit kardiovaskular (Fretes dkk, 2012). Alga Merah (*Gracillaria verrucosa*) merupakan jenis rumput laut yang banyak dibudidayakan di Indonesia dengan kondisi air payau (Sugiyatno, dkk, 2013).

Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu marker yang menunjukkan

derajat stress oksidatif sel. MDA dalam sel dihasilkan dari proses peroksidasi lipid oleh radikal bebas/ROS dan biosintesis prostaglandin. Meningkatnya kadar MDA dipengaruhi oleh peningkatan produksi ROS (Bruch dan Janet, 2002).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi bioaktif ekstrak alga merah untuk terapi hewan coba tikus yang diinduksi formalin. Paparan formalin sebagai zat karsinogenik dapat meningkatkan spesies oksigen reaktif sehingga meningkatkan kadar MDA (Yustika, dkk, 2013) dan merusak jaringan paru. Setelah dilakukan terapi dengan ekstrak alga merah, diduga kadar MDA turun dan keadaan jaringan paru menjadi lebih baik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). 25 ekor tikus jantan galur Wistar (*R. norvegicus*) dibagi menjadi 5 kelompok dan diberi perlakuan sebagai berikut:

1. Kelompok 1 (kontrol negatif): Tikus sehat digunakan sebagai pembanding ;
2. Kelompok 2 (kontrol positif): Tikus dipapar uap formalin (1300 mg/L) ;
3. Kelompok 3: Tikus dipapar uap formalin (1300 mg/L). Diberi 2 mL/hari ekstrak alga merah dosis 100 mg/kg BB selama 2 minggu ;
4. Kelompok 4: Tikus dipapar uap formalin (1300 mg/L). Diberi 2 mL/hari ekstrak alga merah dengan dosis 200 mg/kg BB selama 2 minggu ; dan
5. Kelompok 5: Tikus dipapar uap formalin (1300 mg/L). Diberi 2 mL/hari ekstrak alga merah dosis 350 mg/kg BB selama 2 minggu.

Alat

Alat yang digunakan diantaranya blender, neraca analitik, kertas saring, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator vacuum*, botol vial, instrumen FTIR dan LCMS, obat nyamuk elektrik, seperangkat

alat bedah, spektrofotometer UV-visibel, mikroskop cahaya Olympus CX31, jarum sonde, vacutainer, mortar, vortex, *microtube*, penangas air, mikropipet, *sentrifuge*.

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain formalin (10%, 37%), NaOH 10%, CHCl₃, NH₃ 0,05 M, H₂SO₄ pekat, H₂SO₄ 2 M, pereaksi Wagner, stok MDA, TCA 4%, HCl 1 N, Na-Thio 1 %, xilol (1,2,3), etanol absolut dan etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, dan 70%), HE, PBS, FBS, PBS-Azida (pH 7,4), NaCl 0,9 %, entellan, aquades, aquadem. Pada penelitian ini menggunakan alga merah (*G. verrucosa*) dan tikus putih (*R. norvegicus*) galur Wistar.

Pembuatan Ekstrak Alga Merah

Ekstraksi alga merah dilakukan secara maserasi dalam pelarut etanol 96% selama 3 hari. Ekstrak disaring dan dipekatkan.

Karakterisasi Ekstrak Alga Merah

1. Uji Fitokimia

Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak alga merah dengan NaOH 10 %, dan HCl 2 N. Larutan berubah warna dari kuning kecoklatan menjadi kuning muda.

Uji terpenoid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan CHCl₃ lalu ditambah H₂SO₄ pekat, terbentuk warna merah kecoklatan di antara muka 2 lapisan larutan.

Uji alkaloid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak dengan CHCl₃ dan NH₃ 0,05 M. Lalu dicampur H₂SO₄ 2 M, terbentuk 2 lapisan. Ditambah pereaksi Wagner, terbentuk endapan coklat.

2. Analisis FTIR

Serapan NaCl window diukur sebagai blanko, kemudian diukur serapan ekstrak alga merah.

3. Analisis LCMS

Ekstrak dipreparasi dengan dilarutkan dalam heksana, diambil supernatan dan dilarutkan dalam larutan acetonitril : metanol (50:50) ditambah BHT 0,01%, lalu dianalisis.

Penentuan Kadar MDA

1. Pembuatan Kurva Baku

Larutan stok MDA ditambahaquades, TCA 4 %, HCl 1 N, Na-Thio 1% dan divortex. Kemudian disentrifugasi, diambil supernatannya. Lalu diinkubasi dan didinginkan. Larutan MDA 4 µg/mL diukur pada λ 500-570 nm untuk menentukan λ_{maks} . Selanjutnya masing-masing larutan MDA diukur pada λ_{maks} . Dibuat kurva baku hubungan konsentrasi dengan absorbansi.

2. Pengukuran Kadar MDA

Organ paru digerus dan ditambah NaCl 0,9 % dingin. Homogenat disentrifugasi, lalu supernatan, ditambah aquades, TCA, HCl 1N, dan Na-Thio. Disentrifugasi kembali dan diambil supernatan. Supernatan diinkubasi dan didinginkan. Lalu diukur absorbansinya pada λ_{maks} .

Gambaran Histologi Paru

Pengamatan histologi paru diawali dengan pembuatan preparat dengan pewarnaan HE, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Ekstrak Alga Merah

1. Uji Fitokimia

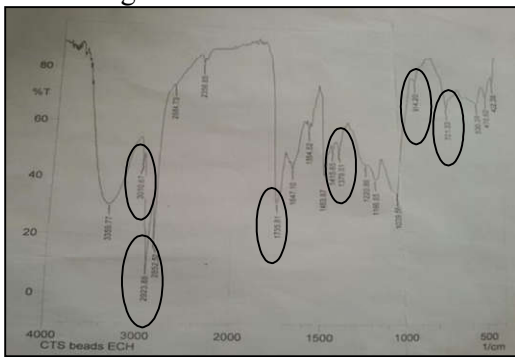
Berikut ini merupakan hasil uji fitokimia:

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia

Jenis Senyawa	Perubahan Warna	Hasil Uji
Flavonoid	Kuning muda	Positif
Terpenoid	Merah kecoklatan	Positif
	diantara muka 2 lapisan	
Alkaloid	Kecoklatan, terbentuk endapan	Positif

2. Analisis FTIR

Analisis FTIR dilakukan untuk mengetahui vibrasi gugus-gugus fungsi dari senyawa, berikut ini spektrum IR ekstrak alga merah:



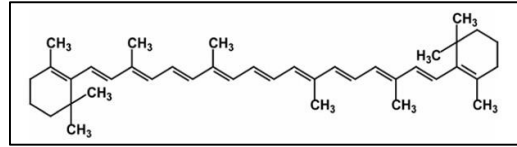
Gambar 1. Spektrum FTIR Ekstrak Alga Merah

Dari spektrum FTIR tersebut, diketahui vibrasi gugus fungsi dalam ekstrak alga merah yang ada pada tabel berikut:

Tabel 2. Gugus Fungsi dalam Ekstrak Alga Merah

Bil. Gel. (cm ⁻¹) Teoritis	Bil. Gel. (cm ⁻¹) Percobaan	Vibrasi Gugus
3000-3100	3010.67	C-H alkana
2850-3000	2923.88; 2852.52	C-H alkana
1600-1680	1735.81	C=C alkana
1375-1450	1379.01	C-H (CH ₃) alkana
650-1000	914.20; 721.33	C-H alkana

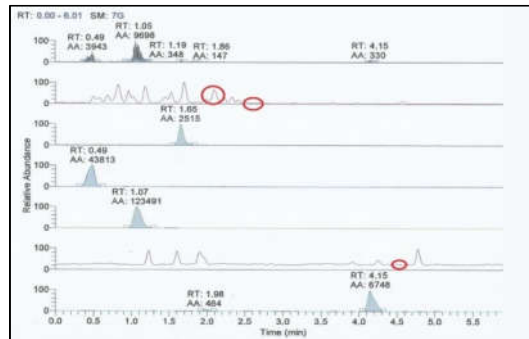
Sehingga dapat dimungkinkan dalam ekstrak alga merah terdapat senyawa β-karoten dengan struktur:



Gambar 2. Struktur β-karoten

Analisis LCMS

Analisis LCMS dilakukan untuk mengetahui komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak alga merah.

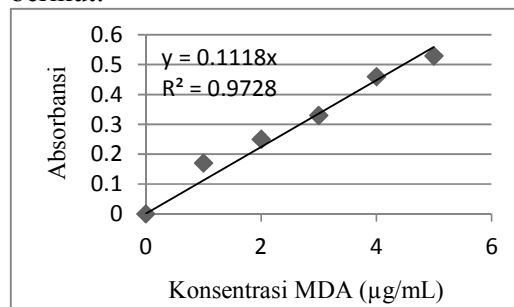


Gambar 3. Spektrum LCMS Ekstrak Alga Merah

Dari analisis LCMS, diketahui bahwa ekstrak alga merah mengandung β-karoten (waktu retensi 4,53) namun jumlahnya kecil. Diperkirakan β-karoten kurang maksimal terekstrak dengan pelarut etanol. Pada ekstrak juga terdapat β-apo-8'-carotenal (waktu retensi 1,73) dan α-tokoferol (waktu retensi 2,54) yang juga berperan sebagai antioksidan.

Analisis Kadar MDA

Dari penentuan panjang gelombang maksimum diperoleh λ maks pada 530 nm (A = 0,465). Dari pengukuran absorbansi larutan stok MDA diperoleh kurva baku berikut:



Gambar 4. Kurva Baku Larutan MDA

Tabel 4. Perbandingan Kadar MDA

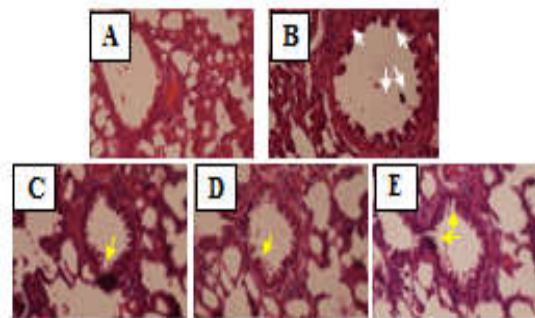
Kelompok	Absorbansi Rata-rata	Rata-rata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	% Peningkatan	% Penurunan
I (-)	0,176	$1,586 \pm 1,032$	-	-
II (+)	0,545	$4,912 \pm 2,549$	68	-
III (Terapi 1)	0,419	$3,782 \pm 0,841$	-	23
IV (Terapi 2)	0,461	$4,153 \pm 1,104$	-	15
V (Terapi 3)	0,522	$4,700 \pm 0,927$	-	4

Hasil pengukuran kadar MDA organ paru tikus dengan metode TBA diperoleh data yang ditunjukkan pada **Tabel 4**. Dari hasil pengukuran, kadar MDA tikus yang diinduksi formalin lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol sehat, dengan peningkatan kadar MDA sebesar 68%. Kadar MDA yang tinggi disebabkan oleh meningkatnya aktivitas radikal bebas dalam tubuh (Yustika, dkk., 2013).

Tikus kelompok terapi memiliki kadar MDA lebih rendah dibandingkan kelompok tanpa terapi. Penurunan kadar MDA terbesar pada kelompok 1 (23%), sehingga dosis efektif adalah 100 mg/kg BB.

Gambaran Histologi Paru

Berikut ini merupakan gambar preparat organ paru dengan perbesaran 400x dengan pewarnaan HE:



Gambar 5. Gambaran Histologi Paru

Keterangan : A= organ paru tikus kontrol
 B= organ paru tikus induksi formalin
 C= organ paru tikus terapi 1
 D= organ paru tikus terapi 2
 E= organ paru tikus terapi 3

Gambar diatas menunjukkan perbandingan kondisi jaringan organ paru pada bagian epitel bronkus tikus. Pada kelompok tikus yang terpapar formalin, terlihat kerusakan sel epitel bronkus (ditandai panah putih) lebih banyak dibandingkan tikus kelompok terapi (ditandai panah kuning). Tikus yang terpapar formalin mengalami kerusakan sel-sel epitel yaitu strukturnya berubah menjadi tidak beraturan dan terjadi pelepasan epitel dari membran basalis.

Sedangkan epitel bronkus tikus kelompok kontrol terlihat normal, sel-sel epitel masih kompak dan berbentuk silindris bertingkat bersilia. Dari perbandingan kelompok terapi diketahui bahwa kerusakan epitel tikus pada kelompok terapi 1 lebih sedikit dan strukturnya terlihat lebih rapat daripada kelompok terapi yang lain.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa ekstrak alga merah

mengandung senyawa flavanoid, alkaloid, terpenoid, β -karoten, β -apo-8'-carotenal dan α -tokoferol. Senyawa tersebut berperan sebagai antioksidan penangkal radikal bebas. Kadar MDA tikus yang diinduksi formalin paling tinggi yaitu $(4,912 \pm 2,549) \mu\text{g/mL}$ dengan peningkatan sebesar 68% dari tikus sehat. Tikus terapi (I, II, III) mengalami penurunan kadar MDA sebesar 23%, 15%, 4%. Gambaran histologi paru tikus yang terpapar formalin menunjukkan kerusakan sel-sel epitel. Tikus kelompok terapi memiliki tingkat kerusakan sel lebih rendah dan mendekati tikus kelompok sehat. Dosis optimum pemberian terapi ekstrak alga merah adalah 100 mg/KgBB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DIKTI yang telah memberikan dana hibah untuk penelitian dalam program PKM-P tahun usulan 2014 untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bruch, C.G. and D.P. Janet, 2002, Oxidative Stress In Critically Ill Patients, *American Journal of Critical Care*, 11(6):543-551.
- Frete, H.D., Susanto, A.B., Prasetyo, B., dan Limantara, L., 2012, Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae : Potensi Kesehatan Aplikasi Dan Bioteknologi, *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 23(2): 221-228.
- Heryani, L.G.S.S., 2011, Paparan Formalin Menghambat Proses Spermatogenesis pada Mencit, *Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana, Denpasar-Bali*, 12(3): 214-220.
- Khotimah, K., dan Bambang, Sasmito, B.B., 2013, Uji Aktivitas Senyawa Aktif Alga Coklat (*Sargassum Fillipendulla*) Sebagai Antioksidan Pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*), *THPi Student Journal*, 1(1): 10-20.
- Rao AV, and Rao LG, 2007, Carotenoids and Human Health, *Pharmaco Res*, 55(0): 207-216.
- Sugiyatno, 2010, Manajemen Budidaya dan Pengolahan Pasca Panen *Glacillaria verrucosa* (Hudson) Papenfus. Study Kasus: Tambak Desa Mororejo, Kecamatan Kaliwungu, Kabupaten Kendal, *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 21(2): 42-50.
- Yustika, A.R., Aulanni'am, dan Sasangka P., 2013, Kadar Malondialdehid (MDA) dan Gambaran Histologi Pada Ginjal Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Pasca Induksi Cylosporine-A, *Kimia Student Journal*, 1(2): 222-228.