

Uji Kemampuan Antioksidan Ekstrak Etanol dan Kloroform Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* melalui Penghambatan Peroksidasi Lipid Homogenat Hepar Mencit (*Mus musculus*)

Cholilia Abadiatul Masruroh¹ dan Sri Widyarti^{1)*}

¹Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan biologi, Universitas Brawijaya, Malang

Email: ^{1)*}swid@ub.ac.id

ABSTRAK

Rumput laut *Gracilaria verrucosa* merupakan tumbuhan dengan kandungan polifenol yang tinggi seperti rumput laut jenis yang lain sebagai salah satu sumber antioksidan alami untuk menangkap, menghambat dan mencegah aktivitas radikal bebas berlebih di dalam tubuh. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kemampuan antioksidan ekstrak etanol dan kloroform rumput laut *Gracilaria verrucosa*. Penentuan kadar fenolik dilakukan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Analisis kemampuan antioksidan melalui penghambatan peroksidasi lipid secara *in vitro* pada homogenat hepar menggunakan uji TBA. Kemampuan antioksidan ekstrak *G. verrucosa* dibandingkan dengan antioksidan sintetik asam askorbat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar fenolik pada ekstrak etanol dan ekstrak kloroform *G. verrucosa* yaitu 155,94 dan 146,95 ppm. Kemampuan penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak etanol dan ekstrak kloroform yaitu 13,59 % dan 12,54 %, sedangkan asam askorbat yaitu 32,54 %.

Kata kunci: *Gracilaria verrucosa*, peroksidasi lipid, TBA

ABSTRACT

Gracilaria verrucosa seaweed is a plant with a high content of polyphenols like other kinds of seaweed as a source of natural antioxidants to arrest, inhibit and prevent excessive free radical activity in the body. The purpose of this study was to determine the antioxidant capacity of ethanol and chloroform extracts *G. verrucosa* seaweed. Determination of phenolic using Folin-Ciocalteu reagent. Analysis of the ability of antioxidants through inhibition of lipid peroxidation *in vitro* in liver homogenates using the TBA test. Ability of antioxidant *G. verrucosa* extracts compared with synthetic antioxidants ascorbic acid. The results showed that the phenolic content of the ethanol and chloroform extract of *G. verrucosa* are 155.94 and 146.95 ppm. Ability of lipid peroxidation inhibition by ethanol extract and chloroform extract is 13.59 % and 12.54 %, while 32.54 % yatiu ascorbic acid.

Kata kunci: *Gracilaria verrucosa*, lipid peroxidation, TBA

PENDAHULUAN

Perairan Indonesia sebagai daerah tropis memiliki sumberdaya rumput laut yang cukup besar sebagai sumberdaya plasma nutfah dengan kurang lebih 555 jenis rumput laut. dari berbagai jenis tersebut, yang telah banyak dibudidayakan adalah *Euchema* sp. dan *Gracilaria* sp. sehingga komoditasnya sangat tinggi. Rumput laut khususnya jenis *Gracillariae* merupakan tumbuhan dengan kandungan polifenol yang tinggi sebagai salah satu sumber antioksidan alami untuk menangkap, menghambat dan mencegah aktivitas radikal bebas berlebih di dalam tubuh [1].

Kandungan antioksidan banyak terdapat pada makanan berbahan dasar tanaman seperti

karotenoid, α - dan β -karoten, lycopene, dan lain-lain. Peran utama mereka dalam tanaman berkaitan dengan pemanfaatan cahaya sebagai komponen tambahan dan menangkal molekul reaktif, seperti oksigen singlet, yang mungkin terbentuk selama fotosintesis. Senyawa fenolik juga terdapat pada makanan berbahan dasar tanaman [2]. Salah satu tumbuhan penghasil antioksidan adalah rumput laut.

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya berkaitan dengan analisis antioksidan seperti pada ekstrak rumput laut *Exophyllum wentii*, *Gracilaria coronopifolia* [3], dan ekstrak rumput laut *Gracilaria changii* [4]. Berdasarkan beberapa penelitian tersebut dapat diketahui bahwa pengujian kemampuan antioksidan pada rumput laut *Gracilaria*

verucosa belum ada sehingga perlu adanya penelitian untuk memperkaya data yang telah ada.

Radikal bebas merupakan molekul atau atom-atom yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas yang baru melalui reaksi berantai yang terus berkembang dan pada akhirnya jumlahnya akan terus meningkat. Radikal bebas ini dibentuk melalui mekanisme metabolisme normal [5]. Bentuk radikal bebas diantaranya adalah oksigen reaktif (ROS), termasuk radikal superoksidaanion (O_2^-), radikal hidroksil (OH), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2) dan nitrat oksida (NO) yang dapat berkontribusi pada proses penuaan manusia dan degradasi DNA selular ketika berada pada jumlah berlebihan atau pada saat sistem pertahanan antioksidan mengalami penurunan [6].

Antioksidan didefinisikan sebagai suatu substansi dimana ketika terdapat pada konsentrasi rendah dibandingkan substrat yang teroksidasi maka secara signifikan akan mencegah atau menunda proses oksidasi substrat tersebut. Substrat yang teroksidasi mencakup setiap jenis molekul yang ditemukan secara *in vivo* [7].

Penentuan kemampuan antioksidan melalui penghambatan peroksidasi lipid pada berbagai media dengan uji TBA dilakukan untuk mengukur jumlah [8]. Metode ini didasarkan atas reaksi TBA dengan MDA yang merupakan salah satu produk aldehyd lipid peroksidase. Sampel dipanaskan dengan TBA dibawah kondisi asam, MDA akan membentuk suatu produk yang berwarna pink yang nantinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Peroksidasi lipid diinduksikan pada jaringan/mitokondria dengan ferrous sulfate [9]. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui penghambatan peroksidasi lipid pada homogenat hepar mencit (*Mus musculus*) oleh ekstrak etanol dan ekstrak kloroform *G. verrucosa* yang dibandingkan dengan antioksidan asam askorbat.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi Rumput Laut (*Gracillaria verrucosa*). Rumput laut basah yang baru diambil dari tambak dibersihkan dari kotoran yang menempel dan dilanjutkan dengan pengeringan pada Glasshouse selama 2-3 hari. Setelah bersih dari lumut, rumput laut dibuat bubuk dengan diblender 2-3 kali dan diayak untuk mendapatkan

bubuk *Gracillaria verrucosa*. Bubuk rumput laut yang didapat kemudian dilakukan ekstraksi yaitu direndam dalam Ethanol 70% dan kloroform selama satu malam. Setelah semalam, diletakkan dalam Evaporator untuk mendapatkan ekstrak rumput laut *Gracillaria verrucosa*.

Penentuan Kadar Fenolik. Penentuan kadar fenolik ekstrak etanol dan kloroform *G. verrucosa* berdasarkan metode [10]. Stock solution ekstrak etanol dan kloroform rumput laut diambil sebanyak 250 μ L dan diencerkan dengan aquades 500 μ L sedikit demi sedikit. Hasil pengenceran tersebut diambil sebanyak 10 μ L dan diencerkan lagi dengan aquades sebanyak 990 μ L. Selanjutnya ditambah dengan 0,5 mL Follin Cioceltou dan diinkubasi selama 3 menit. Setelah diinkubasi, ditambah dengan 1 mL saturated $NaCO_3$ dan aquadest hingga volume mencapai 10 mL lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Langkah selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 760 nm dan hasilnya diplotkan pada persamaan kurva baku tannin acid.

Pembuatan Kurva Standar MDA.

Sebanyak 2 mL larutan standar MDA (1.25-20 μ M) dengan berbagai konsentrasi lalu ditambahkan 1mL TCA 20% dan 200 μ L TBA 0.67% lalu dihomogenkan dengan vorteks. Selanjutnya dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 100°C selama 10 menit. Setelah 10 menit, diangkat dan didinginkan pada suhu ruang. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada λ maksimum. Nilai absorbansi yang didapat diplot menggunakan Microsoft Excel sehingga didapatkan kurva baku MDA.

Persiapan Homogenat Hepar Mencit.

Isolasi homogenat hepar mencit dilakukan menurut metode [11]. Sebanyak 1 g hepar mencit dihaluskan menggunakan mortar pestle dan ditambah dengan 3mL 0.15 M KCl dingin lalu dicampur. Homogenate hepar ditambah 10 μ M ferrous sulfate (1 mM, 10 μ L) dan ditambahkan dengan KCl-Tris-HCl pH 7.4 hingga volume mencapai 2mL, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Langkah berikutnya (Tabel 1) ditambahkan ekstrak etanol *G. verrucosa* (3 tube), ekstrak kloroform (3 tube), dan asam askorbat (3 tube) lalu diinkubasi selama 2 menit. Larutan kontrol negatif digunakan homogenat hepar saja, kontrol positif digunakan homogenat hepar yang ditambah ferrous sulfat, sedangkan larutan blanko digunakan 10 μ L etanol 70 % untuk bahan uji ekstrak etanol *G. verrucosa* dan 10 μ L kloroform untuk bahan uji ekstrak kloroform *G. verrucosa*.

Pengukuran penghambatan peroksidasi lipid. Larutan tersebut kemudian ditambahkan 1mL TCA 20% dan 2mL 0.67% TBA. Selanjutnya larutan dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, lalu dimasukkan pada es. Larutan disentrifus pada 3000rpm, suhu 4°C, selama 15 menit. Supernatan yang didapat dipindahkan ke tabung baru dan dibaca absorbansinya pada gelombang 532nm. Nilai yang didapat dimasukkan ke persamaan $y = ax + b$ dari kurva standar MDA, sehingga didapatkan kadar MDAny. Untuk mengetahui % penghambatan peroksidasi lipidnya digunakan rumus berikut:

Rumus 1.

$$\% \text{ penghambatan peroksidasi lipid} = [(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Fenolik Ekstrak Etanol dan Kloroform Rumput Laut *G. Verrucosa*. Hasil penentuan kadar fenolik ekstrak etanol dan kloroform rumput laut *G. verrucosa* dapat dilihat pada Tabel 1. Sedangkan kurva standar Tannin Acid ditunjukkan oleh Lampiran 1. Kurva standar tersebut berguna untuk menentukan kadar fenolik yang terkandung dalam ekstrak etanol maupun kloroform dari *G. verrucosa*. Ekstrak etanol memiliki kadar fenolik 155,94±22,04 ppm lebih tinggi daripada ekstrak kloroform yaitu 146,95±5,45 ppm. Adapun ekstrak ethyl acetate pada *G. verrucosa* yang dilakukan oleh [1] menunjukkan kadar fenolik dengan nilai berkisar antara 145 – 164 ppm.

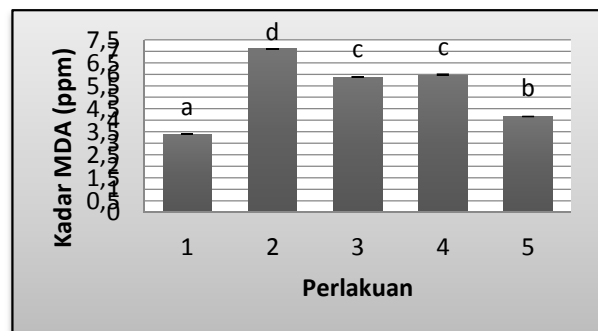
Tabel 1. Kadar fenolik ekstrak rumput laut *G. verrucosa*

Jenis Ekstrak	Kadar Fenolik (ppm) ^{a)}
Etanol	155,94±22,04
Kloroform	146,94±5,45

Kandungan antioksidan merupakan hasil kemampuan suatu tumbuhan sebagai agen pereduksi, donor hidrogen, dan penghambur radikal bebas. Fenolik juga dapat bertindak sebagai chelator logam yaitu mencegah katalisasi logam sebagai proses permulaan radikal. [12]. [7] mengatakan bahwa senyawa fenol gugus -OH yang terikat pada cincin benzene. Fenol terkandung dalam sejumlah besar di dalam tanaman. Selain vitamin E, senyawa dapat memberi efek antioksidan yang kuat secara in vitro, menghambat peroksidasi lipid dengan berperan sebagai scavenger rantai bebas radikal

peroksil. Fenol juga dapat mengikat ion logam transisi (terutama besi dan tembaga) dalam bentuk kurang aktif dalam mendorong reaksi radikal bebas. Selain itu, fenol juga dapat menangkap ROS secara langsung, seperti OH, ONOOH, dan HOCl. Dengan demikian, senyawa fenol dalam tanaman merupakan inhibitor peroksidasi lipid yang baik secara *in vitro*.

Analisis Antioksidan *in vitro* Ekstrak Etanol dan Kloroform Rumput Laut *G. verrucosa* menggunakan TBA. Penghambatan peroksidasi lipid diketahui dengan penurunan kadar MDA pada homogenat hepar sebagai sumber penghasil radikal bebas dan diberi ferrous sulfat sebagai penginduksi radikal bebas. Penurunan kadar MDA yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol *G. verrucosa*, ekstrak kloroform *G. verrucosa*, dan asam askorbat ditunjukkan oleh Gambar 1.



Keterangan: 1. Homogenat hepar saja; 2. Homogenat + FeSO₄; 3. Homogenat + FeSO₄ + ekstrak etanol *G. verrucosa*; 4. Homogenat + FeSO₄ + ekstrak kloroform *G. verrucosa*; 5. Homogenat + FeSO₄ + asam askorbat

Gambar 1. Kadar MDA sebagai hasil peroksidasi lipid pada homogenat hepar mencit (*Mus musculus*)

Berdasarkan kadar MDA yang telah dihasilkan pada analisis ini, dapat diketahui tingkat penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak etanol *G. verrucosa*, ekstrak kloroform *G. verrucosa*, dan asam askorbat (Tabel 1). Penghambatan tersebut dihitung menggunakan rumus:

Rumus 1.

$$\% \text{ penghambatan peroksidasi lipid} = [(A_{\text{sampel}} - A_{\text{kontrol}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100\%$$

Tabel 1. Kemampuan penghambatan peroksidasi lipid oleh ekstrak etanol, ekstrak kloroform *G. verrucosa* dan asam askorbat

Sumber	% penghambatan	P value
--------	----------------	---------

antioksidan		
Ekstrak etanol <i>G. verrucosa</i>	13,59 ± 2.34	0,030
Ekstrak kloroform <i>G. verrucosa</i>	12,54 ± 4.69	0,130
Asam askorbat	32,54 ± 1.27	0,002

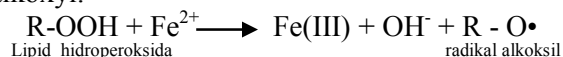
Kadar MDA terendah dihasilkan oleh jaringan normal. Kadar MDA terendah selanjutnya dihasilkan oleh perlakuan dengan asam askorbat, ekstrak etanol, dan kloroform. Kadar MDA pada perlakuan kontrol positif sangat tinggi karena di dalam jaringan hepar radikal bebas dihasilkan secara alami, selain itu jaringan hepar juga telah diberi Ferrous sulfat sebagai penginduksi radikal bebas. Perlakuan dengan pemberian asam askorbat, ekstrak etanol, dan ekstrak kloroform yang diberikan kepada homogenat hepar dapat mengurangi kadar MDA. Penurunan kadar MDA tersebut disebabkan oleh adanya senyawa antioksidan yang terkandung dalam bahan sehingga dapat menghambat aktifitas radikal bebas. Akan tetapi, penghambatan aktifitas radikal bebas oleh antioksidan ekstrak etanol dan kloroform belum mendekati batas normal. Meskipun begitu, penghambatan radikal bebas oleh ekstrak etanol sedikit lebih tinggi daripada ekstrak kloroform. Semakin tinggi kadar fenol semakin tinggi pula kemampuan suatu ekstrak menangkap radikal hidroksil. Gugus fenol dapat menangkap radikal hidroksil dengan cara melepaskan radikal hidrogen yang akan berikatan dengan radikal hidroksil, membentuk molekul air (H₂O).

Persentase inhibition merupakan persentase penghambatan proses lipid peroksidasi oleh antioksidan yang terkandung dalam bahan. Penghambatan tertinggi ditunjukkan oleh asam askorbat, lalu ekstrak etanol *G. verrucosa* dan ekstrak kloroform *G. verrucosa*. Semakin tinggi kemampuan suatu bahan untuk menghambat proses peroksidasi lipid, maka diasumsikan bahwa bahan tersebut mengandung komponen antioksidan yang banyak. Asam askorbat sebagai inhibitor tertinggi disebabkan oleh sifatnya sebagai antioksidan saja, sedangkan ekstrak etanol dan ekstrak kloroform *G. verrucosa* dimungkinkan tidak hanya bersifat sebagai antioksidan namun juga diperlukan dalam mekanisme kerja sel lainnya.

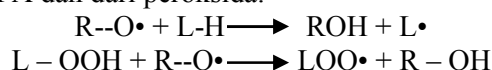
Beberapa sampel yang bisa digunakan dalam uji TBA meliputi homogenat otak, serum, homogenat hati, suspensi mitokondria, homogenat jantung, dan lain-lain [11].

Homogenat hepar adalah media yang digunakan dalam uji TBA pada penelitian ini. Hepar merupakan tempat utama penyimpan besi (Fe) pada resiko tertentu kerusakan jaringan yang disebabkan oleh besi. Kelebihan zat besi disimpan secara berlanjutan di sel parenkim hepar dalam hemochromatosis sekunder dan hereditas yang menyebabkan kerusakan peroxidative pada membran lipid organel seluler sehingga mengakibatkan kerusakan hati, fibrosis, dan akhirnya sirosis [13].

Uji TBA ini ditambahkan senyawa FeSO₄ (*Ferrous Sulfat*) didalamnya yang diharapkan sebagai penginduksi terjadinya proses pembentukan radikal bebas. Menurut [7], besi berperan dalam peroksidasi lipid. Lipid peroksida murni biasanya stabil pada suhu fisiologis. Lipid peroksida akan membusuk pada pemanasan dan juga pada ion logam-transisi. Besi(II) dan Fe²⁺ tertentu bereaksi dengan lipid peroksida dengan cara yang hampir sama dengan reaksi lipid peroksida dengan H₂O₂ yaitu memecah ikatan O-O. ketika berikatan dengan H₂O₂, akan terbentuk OH•. Ketika berikatan dengan lipid peroksida R-OOH, akan terbentuk RO• yang disebut radikal alkoxyl.



Radikal alkoxyl melepaskan H• abstrak dari PUFA dan dari peroksida.



Hasil dari radikal peroksil dapat berlanjut ke propagasi lipid peroksidasi. Fe(II) dan kelat Fe(III) tertentu dapat mengurai peroksida menjadi radikal peroksil.

Ion Fe²⁺ dan besi kelat tertentu bereaksi dengan H₂O₂ untuk membentuk OH•. Reaksi protein yang mengandung besi dengan H₂O₂ dan/atau O₂^{•-} secara umum tidak membentuk formasi OH•, kecuali protein tersebut melepaskan besi di bawah kondisi uji. Kisaran kelat besi yang dapat merangsang peroksidasi lipid lebih luas [7].

KESIMPULAN

Kadar fenolik yang dihasilkan oleh ekstrak ethanol dan ekstrak kloroform *G. verrucosa* 155,94 ppm 146,95 ppm. Kemampuan antioksidan melalui penghambatan peroksidasi lipid yang dihasilkan oleh ekstrak etanol dan ekstrak kloroform yaitu 13,59 % dan 12,54 %, sedangkan asam askorbat adalah 32,54 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa. Penelitian ini adalah bagian dari penelitian yang dibiayai oleh DPP/SPP tahun 2012 FMIPA UB. Orang tua tercinta yang selalu memberi dukungan dan motivasi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Reddy, S.M. 2001. **University Botany I: Algae, Fungi, Bryophyta, and Pteridophyta**. New Age International: New Delhi
- [2] Lindsay, D.G. dan Astley, S.B. 2002. European research on the functional effects of dietary antioxidants-EUROFEDA. *Mol Aspects Med.* 23:1-38
- [3] Swantara, I.M. dan Parwata, I.M. 2011. Kajian Senyawa Antioksidan pada Rumput Laut dari Pantai sekitar Bali. The Excelent Research
- [4] Sreenivasan, S.A. 2007. Pengekstrakan Alga *Gracilaria changii*, Pencirian Aktiviti Antioksidan, Antikanser dan Antimikroba serta Potensi Sebagai Agen Antikandida. Tesis. University Sains Malaysia.
- [5] Desmarchelier, C., Ciccia, G., dan Coussio, J., 2000. Recent Advances In The Search For Antioxidant Activity In South American Plants. In: Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in Natural Products Chemistry. *Elsevier*. Amsterdam. 22:343-367
- [6] Sogut, S., Zoroglu, S.S., Ozyurt, H., Yilmaz, H.R., dan Sivasli, E. 2003. Changes in Nitric Oxide Levels and Antioxidant Enzyme Activities May Have a role in the Pathophysiological Mechanisms Involved in Autism. *Clin. Chim. Acta.* 331: 111-11
- [7] Halliwell, B. dan Gutteridge, J. 1999. **Free Radicals in Biology and Madecine 3th ed.** Oxford Science Publication: New York
- [8] SÖdergren, E. 2000. Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and Application of Method for Measurement. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations Faculty of Madecine
- [9] Nagabubu, E., Rifkind, J.M., Boindala, S., & Nakka, L. 1992. Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Meth. Mol. Biol.* 610
- [10] Faten, M. A. & Emad, A. S. 2009. Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria verrucosa*. *Aust. J. Basic App. Sci.* 3(4): 3179-3185.
- [11] Botsoglou, N., Fletouris, D., Papageorgiou, G., Vassilopoulos, V., Mantis, A., & Trakatellis, A. 1994. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Sample. *J. Agric. Food Chem.*42:1931-1937
- [12] Siriwardhana, N.; Lee, K. W.; Kim, S. H.; Ha, J. W.; Jeon, Y. J. 2003. Antioxidant Activity of Hizikia Fusiformis on Reactive Oxygen Species Scavenging and Lipid Peroxidation Inhibition. *Food Sci. Technol. Int.*
- [13] Ajith, T.A. 2010. Ameliorating Reactive Oxygen Species-Induced *in vitro* Lipid Peroxidation in Brain, Liver, Mitochondria, and DNA Damage by *Zingiber officinale*. *Indian J. Clin. Biochem.* 25:67-73