



**UJI TOKSISITAS AKUT BIOPIGMENT KAROTENOID
SIMBION BAKTERI DENGAN INVERTEBRATA LAUT
(KAJIAN TERHADAP GINJAL MENCIT BALB/C)**

*ACUTE TOXICITY TEST OF BIOPIGMENT CAROTENOID SYMBIONTS
MARINE INVERTEBRATE WITH BACTERIA
(STUDY IN KIDNEY OF BALB/C MICE)*

**ARTIKEL PENELITIAN
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk mengikuti seminar proposal karya tulis
ilmiah mahasiswa program strata-1 kedokteran umum**

**MARIA ELVIRA SANTOSO
G2A007120**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2011**

Uji Toksisitas Akut Biopigmen Karotenoid Simbion Bakteri Dengan Invertebrata Laut

(Kajian Terhadap Ginjal Mencit Balb/C)

Maria Elvira Santoso¹, Noor Wijayahadi²

ABSTRAK

Latar belakang: Indonesia memiliki sumber daya laut yang besar. Pigmen karotenoid yang banyak ditemukan pada organisme laut merupakan senyawa provitamin A yang berperan penting dalam fungsi faali tubuh. Peneliti ingin mengetahui uji toksisitas akut biopigmen karotenoid simbion bakteri (*Virgibacillus salarius*) dengan invertebrata laut (*Jorunna funebris*) sebagai salah satu sumber alternative biopigmen karotenoid.

Metode: Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test-Controlled Only Group Design* ini menggunakan 25 ekor mencit Balb/c jantan, dibagi menjadi lima kelompok secara random, yaitu satu kelompok kontrol (K) diberi pakan standar, dan empat kelompok perlakuan (P1, P2, P3, P4) masing-masing diberi biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut dengan dosis 5 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 2000 mg/kg BB melalui sonde lambung satu kali, dan diamati seminggu. Pada hari ke-8 mencit diterminasi untuk diamati gambaran makroskopis dan gambaran mikroskopisnya. Data mikroskopis dianalisis dengan uji *Oneway-Anova* dilanjutkan uji *Post-Hoc*.

Hasil: Tidak terdapat perbedaan bermakna pada gambaran makroskopis antara kelompok kontrol dan perlakuan ($p=1.00$), sedangkan terdapat perbedaan bermakna pada gambaran mikroskopis ginjal antar kelompok yaitu: K-P2, K-P3, K-P4, P1-P3, P1-P4, P2-P4 ($p=0.001$), P2-P3 ($p=0.029$), dan P3-P4 ($p=0.002$).

Simpulan: Pemberian biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut secara akut tidak menimbulkan perbedaan terhadap gambaran makroskopis ginjal antara kelompok control dan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan, akan tetapi pemberian ini menimbulkan perbedaan terhadap gambaran mikroskopis ginjal antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan.

Kata kunci: biopigmen karotenoid, gambaran makroskopis ginjal, gambaran mikroskopis ginjal

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Undip, Semarang

²Staf pengajar Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Undip, Semarang

***Acute Toxicity Test Of Biopigment Carotenoid Symbionts Marine Invertebrate
With Bacteria
(Study In Kidney Of Balb/C Mice)***

Maria Elvira Santoso¹, Noor Wijayahadi²

ABSTRACT

Background: Indonesia has a huge marine resources. Carotenoid pigment found in many marine organisms is a provitamin A compound that plays an important role in the physiologic function of the body. Researcher want to know whether any acute effect of biopigment carotenoid symbionts marine invertebrate (*Jorunna funebris*) with bacteria (*Virgibacillus salaries*) as one alternative source of carotenoid biopigmen.

Method: This experimental Post Test-Controlled Only Group Design study was using 25 male Balb/c mice that were divided into five groups, one control group (K) that had been given standard food, and four treatment group (P1, P2, P3, P4) that had been given biopigment carotenoid symbionts marine invertebrate with bacteria treatment in 5 mg/kg BW, 50 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, and 2000 mg/kg BW dosages via gastric sonde once, and being observed for a week. On 8th day, those mice were terminated to be observed the macroscopic appearance and the histopatological appearance. Microscopic data was analyzed by Oneway-Anova test and continued by Post-Hoc test.

Result: There was no significant difference in kidney's macroscopic appearance among groups, whereas there were significant differences in kidney's microscopic appearance, there were: K-P2, K-P3, K-P4, P1-P3, P1-P4, P2-P4 ($p=0.001$), P2-P3 ($p=0.029$), and P3-P4 ($p=0.002$).

Conclusion: Acute treatment of biopigment carotenoid has not make significant difference on the macroscopic appearance of kidney between control and treatment group and within each treatment group, but the treatment makes differences on the microscopic appearance of kidney between control and treatment group and within each treatment group.

Keywords: Biopigment Carotenoid, kidney's macroscopic appearance, kidney's microscopic appearance

¹Undergraduate student of Medical Faculty of Undip, Semarang

²Lecturer of Department of Clinical Pharmacology of Medical Faculty of Undip, Semarang

1. PENDAHULUAN

Pigmen karotenoid banyak ditemukan pada organisme laut seperti rumput laut, alga, dan bakteri. Pada penelitian ini, biopigmen karotenoid dihasilkan oleh bakteri (*Virgibacillus salarius*) yang bersimbion dengan invertebrata laut (*Jorunna funebris*). Fungsi karotenoid pada tumbuhan adalah sebagai pelengkap pigmen klorofil untuk membantu proses fotosintesis.¹⁻⁵ Karotenoid merupakan bahan yang esensial pada manusia, karotenoid dapat membantu sistem kekebalan tubuh dengan cara melindungi reseptor sel-sel fagosit/pemakan (sel-sel darah putih yang mampu menelan kuman) dari kerusakan auto-oksidasi akibat terbentuknya radikal oksigen.⁴⁻⁹

Secara farmakologik setiap bahan obat yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami proses farmakokinetik dan farmakodinamik. Begitu pula dengan karotenoid, setelah mengalami absorpsi, bahan tersebut akan mengalami metabolisme di hepar dan selanjutnya elemen yang larut dalam air akan diekskresikan melalui ginjal.¹⁰ Hal ini memungkinkan terjadinya suatu efek medik maupun efek toksik yang disebabkan oleh karotenoid terhadap organ-organ di atas, termasuk ginjal.

Penelitian ini pada dasarnya ditujukan untuk mencari alternatif sumber biopigmen karotenoid dari simbiosis bakteri dengan invertebrata laut. Penelitian ini bekerja sama dengan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Undip untuk menyeleksi jenis invertebrata laut yang paling banyak menghasilkan karotenoid. Alasan digunakan mencit Balb/c adalah karena selain lebih efektif dalam segi

biaya, juga mencit ini sering dipakai sebagai hewan coba pada penelitian eksperimental uji toksisitas karotenoid dari sumber hayati lainnya.

2. METODE

Penelitian ini meliputi bidang histologi, farmakologi, dan patologi anatomi dan dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan Maret-Juni 2011.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan rancangan *Post Test Only Kontrol Group Design*. Penelitian menggunakan 25 mencit yang dirandomisasi ke dalam lima kelompok, yaitu satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan. Penelitian hanya dilakukan saat post test, dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Sampel penelitian ini adalah mencit Balb/c jantan berumur 2-3 bulan, berat badan 20-25 gram, sehat, tidak ada kelainan anatomis, yang diperoleh dari Institut Obat Bahan Alam Universitas Diponegoro, Semarang.

Mencit sebelum perlakuan akan mengalami masa adaptasi dengan dikandangkan dan diberikan pakan standar selama seminggu. Mencit tersebut lalu dibagi menjadi lima kelompok yang ditentukan secara acak, yaitu kelompok kontrol (K) yang diberi air saja, kelompok P1 diberi simbion invertebrata laut dan bakteri dengan dosis 5 mg/kg BB, kelompok P2 diberi simbion invertebrata laut dan bakteri dengan dosis 50 mg/kg BB, kelompok P3 diberi simbion invertebrata

laut dan bakteri dengan dosis 500 mg/kg BB, kelompok P4 diberi simbiosis invertebrata laut dan bakteri dengan dosis 2000 mg/kg BB.

Biopigmen karotenoid diberikan dengan sonde lambung pada awal perlakuan. Pengamatan dilakukan selama 7 hari, kemudian pada hari ke-8 mencit dibunuh (dekapitasi) untuk dilakukan pengambilan ginjal lalu diamati kondisi makroskopisnya, dan selanjutnya diproses dengan metode baku histologi, kemudian dilakukan pemeriksaan mikroskopis setelah dilakukan pembuatan preparat sesuai prosedur.

Setiap mencit dibuat preparat ginjal, dan tiap preparat dibaca dalam lima lapangan pandang yaitu keempat sudut dan bagian tengah preparat dengan perbesaran 400x. Sasaran yang dibaca adalah struktur histologis tubulus kontortus proksimal ginjal, dinyatakan dalam persentase tubulus yang mengalami penyumbatan pada setiap lapangan pandang.

3. HASIL

Data yang diperoleh dari pengamatan makroskopis adalah morfologi makroskopis hepar yang merupakan skala ordinal, dengan seluruh sampel dari tiap kelompok memperoleh skor 0 (morfologi normal), maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* ($p=1.00$).

Data yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis adalah data numeric, dengan distribusi normal dan homogen. Deskripsi data yang digunakan adalah persentase jumlah tubulus yang rusak pada lima lapangan pandang, seperti yang tercantum pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Rerata persentase perubahan gambaran histopatologi sel ginjal

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel Normal	Jumlah Sel Abnormal	Total	Persentase
K	834	159	993	15.77
P1	817	185	1002	18.47
P2	900	243	1143	21.27
P3	923	299	1222	24.47
P4	902	375	1277	29.43

Uji *Oneway Anova* $p=0.001$

Uji *Post-Hoc* dari hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok kecuali pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan 1.

Tabel 2. Hasil analisis uji Post Hoc

Kelompok	Kontrol	P1	P2	P3	P4
Kontrol		0.061	0.001*	0.001*	0.00
P1	0.061		0.053	0.001*	0.00
P2	0.001*	0.053		0.029*	0.00
P3	0.001*	0.001*	0.029*		0.00
P4	0.001*	0.001*	0.001*	0.002*	0.00

*ada perbedaan bermakna ($p<0.05$)

4. PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pada kondisi makroskopis ginjal hewan coba setelah pemberian biopigmen karotenoid simbiosis bakteri (*Virgibacillus salarius*) dengan invertebrata laut (*Jorunna funebris*) dengan dosis bertingkat menunjukkan bahwa

tidak terdapat perbedaan morfologi makroskopis ginjal yang bermakna antar kelompok ($p=1.00$).

Hasil pengamatan makroskopis yang didapatkan pada penelitian ini sesuai dengan tahapan terjadinya gangguan fungsi organ. Dimulai dari gangguan keadaan biokimianya, dilanjutkan dengan gangguan anatomis yang akan nampak pada tahap berikutnya yang didahului dengan gangguan secara histologis dan pada akhirnya akan bermanifestasi pada tampilan makroskopisnya.¹¹ Perubahan makroskopis diawali dengan kematian-kematian nefron dalam jumlah besar yang digantikan oleh jaringan parut nampak sebagai fibrosis yang kasat mata.¹² Tidak adanya perubahan bermakna dari gambaran makroskopis tadi dapat dijelaskan dengan beberapa kemungkinan, yaitu: 1) jangka waktu penelitian yang singkat (lamanya paparan zat tersebut), dan 2) perlakuan yang diberikan hanya 1 kali di awal penelitian sehingga belum dapat menimbulkan perubahan makroskopis.

Hasil pengamatan mikroskopis ginjal yang dihitung adalah penutupan pada tubulus kontortus proksimal karena kerusakan yang didapat adalah minimal. Dalam proses pengambilan data, kerusakan dalam tubulus ginjal dinyatakan dalam persentase tubulus yang mengalami penutupan pada lima lapangan pandang. Hasil pengamatan menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antar kelompok kecuali antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 ($p=0.061$) dan antara kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2 ($p=0.053$).

Perubahan mikroskopis berupa adanya pembengkakan epitel tubulus proksimal sehingga terjadi penyempitan tubulus, dimana perubahan mikroskopis ginjal cenderung meningkat sesuai dengan kenaikan dosis biopigmen karotenoid

yang diberikan.^{10,12} Perubahan bermakna secara mikroskopis pada penelitian ini disebabkan oleh karena 1) setiap zat larut dalam air diekskresikan melalui ginjal memiliki potensi untuk mengganggu kenormalan epitel tubulus, 2) terdapat zat yang bersifat toksik dalam biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut sehingga menyebabkan kerusakan pada tubulus.

Hal ini juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti komponen lain dalam ekstrak yang mungkin menyebabkan terjadinya kerusakan pada ginjal. Biopigmen karotenoid yang diberikan pada mencit berasal dari bakteri yang hanya disonifikasi (dihancurkan dindingnya) tanpa diperiksa apakah ada kontaminan lain pada ekstrak yang diberikan pada mencit. Sedangkan untuk dosis toksik karotenoid sendiri, tidak dapat dilihat hanya dari gambaran histopatologi ginjal saja, melainkan juga harus dilihat secara enzimatik atau normalitas fungsional ginjal. LD50 memegang peranan yang sangat penting untuk menentukan ketoksikan suatu bahan pada tubuh.

Dalam penelitian ini terdapat keterbatasan yang dipengaruhi oleh adanya faktor-faktor seperti jumlah sampel yang terbatas, adanya kemungkinan bias pada pembacaan preparat histologist karena tidak dilakukan *second observer* oleh ahli patologi anatomi. Selain itu, mengingat penelitian ini menggunakan metode *Post Test-Controlled Only Group Design*, sehingga pada pengambilan sampel tidak dilakukan pemeriksaan terhadap ginjal mencit, sehingga terdapat kemungkinan ketika mencit diambil sebagai sampel telah mengalami kerusakan sebelumnya. Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian meliputi keadaan kandang yang kurang higienis, faktor stress mencit, hewan coba yang mungkin

mengidap penyakit lain, serta faktor internal lain seperti daya tahan dan kerentanan mencit.

Hasil pengamatan pada kondisi makroskopis ginjal hewan coba, pemberian biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut dosis bertingkat 5mg/kg BB, 50mg/kg BB, 500mg/kg BB, dan 2000mg/kg BB tidak menimbulkan perbedaan terhadap gambaran makroskopis ginjal antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan dan antar kelompok perlakuan yang satu dengan yang lain. Akan tetapi, rerata persentase kerusakan tubulus proksimal semakin meningkat secara bermakna sesuai dengan kenaikan dosis biopigmen karotenoid yang diberikan, dengan kerusakan tubulus terbanyak pada dosis 2000mg/kg BB, kecuali antara dosis 5mg/kg BB dengan dosis 50mg/kg BB perbedaannya tidak bermakna. Tidak adanya mencit yang mati dalam penelitian ini menunjukkan bahwa dosis toksik biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut yang dapat ditunjukkan dengan LD50 belum diketahui.

Dari hasil penelitian ini, peneliti menyarankan bahwa perlu dilakukan penelitian serupa dengan pengamatan mikroskopis menggunakan *second observer* untuk menghindari adanya bias, perlu dilakukan penelitian dengan pewarnaan khusus histokimia agar gambaran mikroskopis terlihat lebih jelas, perlu juga dilakukan penelitian serupa dengan rentang dosis yang lebih bervariasi untuk mengetahui LD50 pada pemberian biopigmen karotenoid simbion bakteri dengan invertebrata laut, dan hendaknya dilakukan penelitian lanjutan dengan waktu paparan lebih lama dan rentang dosis yang lebih bervariasi untuk mengetahui potensi toksisitas subkronik dan kronik.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis memanjatkan puji syukur kepada Allah SWT dan berterimakasih kepada dr. Noor Wijyahadi M Ke, Ph.D, dan dr. Ika Pawitra Miranti, Sp.PA atas bimbingan dan koreksi yang dilakukan selama penelitian ini berlangsung; kepada dr. Ika Pawitra Miranti, Sp.PA dan dr. Neni Susilaningsih, MSi sebagai penguji; kepada staf bagian Farmakologi dan Terapi dan Histologi yang telah memfasilitasi berlangsungnya penelitian ini; kepada keluarga yang telah memberikan dukungan moril dan semangat; dan kepada rekan seperjuangan penulis, yaitu Irkania Pasangka, Meilinda Harahap, dan Syifa Aulia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sacha Coesel, Miroslav Oborník, Joao Varela, Angela Falciatore, Chris Bowler. Evolutionary Origins and Functions of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Marine Diatoms. Plos One [serial on the Internet]. 2008 [cited 2011 July 20]; 3(8): e2896. Available from: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002896>
2. Wang Ling, Liu Yun. Optimization of Solvent Extraction Conditions for Total Carotenoids in Rapeseed Using Response Surface Methodology. Natural Science [serial on the Internet]. 2009 [cited 2011 July 20]; 1 (1): 23-9. Available from: http://www.scirp.org/fileOperation/download.aspx?path=NS20090100004_22569416.pdf&type=journal
3. Barbosa-Filho José M., Alencar Adriana A., Nunes Xirley P., de Andrade Tomaz Anna C. , Sena-Filho José G., Athayde-Filho Petrônio F.. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: a twentieth century review. Revista Brasileira de Farmacognosia. [serial on the Internet]. 2008 [cited 2011 July 20]; 18(1). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2008000100023&script=sci_arttext
4. Riccioni Graziano, D'Orazio Nicolantonio, Franceschelli Sara, Speranza Lorenza. Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. Marine Drugs [serial on the Internet]. 2011 [cited 2011 July 20]; 9(7): 1166-75. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/9/7/1166/pdf>

5. USU Repository [homepage on the internet]. no date [cited 2010 November 29]. Available from <http://repository.usu.ac.id/bitstream/123456789/20091/4/Chapter%20II.pdf>
6. Astawan Made. Vitamin A Bukan Hanya untuk Mata [homepage on the internet]. c2010 [updated 2010 June 3; cited 2010 November 29]. Available from <http://cyberman.cbn.net.id/cbprtl/cybermed/detail.aspx?x=Nutrition&y=cybershopping|0|0|6|558>
7. Holden Joanne M., Eldridge Alison L., Beecher Gary R., Buzzard I. Marilyn, Bhagwat Seema, Davis Carol S., et al. Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *Journal of Food Composition and Analysis* [serial on the Internet]. 1999 [cited 2010 November 29]; 12(jfca.1999.0827):169-96. Available from: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Other/jfca12_169-196.pdf
8. Turner Judith, Frey Rebecca J.. Vitamin A (Beta Carotene) [homepage on the internet]. No date [cited 2011 July 20]. Available from <http://www.encognitive.com/node/1164>
9. Holick Crystal N., Michaud Dominique S., Stolzenberg-Solomon Rachael, Mayne Susan T., Pietinen Pirjo, Taylor Philip R., et al. Dietary Carotenoids, Serum β -Carotene, and Retinol and Risk of Lung Cancer in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cohort Study. *American Journal of Epidemiology* [serial on the Internet]. 2002 [cited 2011 July 20]; 156 (6): 536-547. Available from: <http://aje.oxfordjournals.org/content/156/6/536.full>

10. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Farmakologi dan terapi. 5th ed. Jakarta: Gaya Baru; 2007.p.1-3.
11. Guyton, Hall. Buku ajar fisiologi kedokteran. 11th ed. Jakarta: EGC; 2008.
12. Underwood JCE. Patologi umum dan sistemik. Vol.2. 2nd ed. Jakarta: EGC; 2000.p. 639-80.