



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

*ACUTE TOXICITY TEST BIOPIGMENT CAROTENOIDS MARINE INVERTEBRATE SYMBIONTS WITH
BACTERIA (REVIEW OF GASTRIC MICE BALB / c)*

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam menempuh program
strata-1 kedokteran umum**

SYIFA AULIA

G2A007170

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

Uji Toksisitas Akut Biopigmen Karotenoid Simbion Bakteri Dengan Invertebrata Laut (Kajian Terhadap Gaster Mencit Balb/c)

Syifa Aulia¹, Noor Wijayahadi²

ABSTRAK

Latar Belakang : Pewarna alami dipercaya mampu memberikan nilai lebih “aman”. Zat warna alami dihasilkan oleh tumbuhan. Karotenoid, yang merupakan pigmen pemberi warna kuning-merah dan sering digunakan sebagai pewarna makanan. Penelitian mengenai uji toksisitas akut ini dilakukan untuk mengetahui keamanan dan efek toksisitas akut suspensi biopigmen karotenoid terhadap gaster mencit Balb/c.

Metode : Penelitian eksperimental dengan rancangan *Post Test Only Controlled Group Design*. Sampel berupa 25 ekor mencit Balb/c yang dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan. Pemberian ekstrak dilakukan secara per oral melalui sonde pada hari ke-1. K diberi aquadest. P1 diberi karotenoid dengan dosis 5 mg/kgBB, P2 dengan dosis 50 mg/kgBB, P3 dengan dosis 500 mg/kgBB, sedangkan P4 dengan dosis 2000 mg/kgBB. Pada hari ke-8 dilakukan terminasi, gaster diambil, dan dibuat preparat histopatologi.

Hasil : Penelitian terhadap histopatologi gaster dianalisa menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, diperoleh nilai $p=0,016$. Dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan bermakna antara K-P2 ($p=0,014$), K-P3 ($p=0,023$), K-P4 ($p=0,009$), P1-P2 ($p=0,033$), P1-P3 ($p=0,043$), P1-P4 ($p=0,009$), P2-P4 ($p=0,027$).

Kesimpulan : Pemberian suspensi biopigmen karotenoid secara akut memberikan pengaruh terhadap gambaran histopatologi gaster. Perubahan patologis mukosa gaster sesuai tingkatan dosis yang diberikan. Semakin tinggi dosis, semakin tinggi tingkat kerusakan epitel. Dosis yang aman adalah ≤ 5 mg/kgBB.

Kata kunci : Biopigmen karotenoid, histopatologi gaster.

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Acute Toxicity Test Biopigmen Carotenoids Marine Invertebrate Symbionts With Bacteria (REVIEW OF GASTRIC MICE BALB / c)

Syifa Aulia¹, Noor Wijayahadi²

Abstract

Background: Natural dyes is believed to provide more value "safe". Natural pigments produced by plants. Carotenoids, which are pigments giving a red-yellow color and is often used as a food coloring. Research on the acute toxicity test was conducted to determine the safety and acute toxicity effects of carotenoids against gastric biopigmen suspension of mice Balb / c.

Method: Research was an experimental study using The Post Test Only Controlled Group Design. 25 male balb/c mice were divided into 1 control group and 4 treatment groups. The treatment was given only on the first day. The control group was given aquadest. The other groups, P1 was given carotenoid with 5 mg/kgBB dose, P2 with 50 mg/kgBB dose, P3 with 500 mg/kgBB dose, and P4 with 2000 mg/kgBB dose

Result: A study of gastric histopathology were analyzed using Kruskal-Wallis test, $p = 0.016$ values obtained. Followed by Mann-Whitney test results obtained that there are significant differences between the K-P2 ($p = 0.014$), K-P3 ($p = 0.023$), K-P4 ($p = 0.009$), P1-P2 ($p = 0.033$), P1 -P3 ($p = 0.043$), P1-P4 ($p = 0.009$), P2-P4 ($p = 0.027$).

Conclusion: Granting suspension of carotenoids in acute biopigmen give effect to the picture of gastric histopathology. Pathological changes of gastric mucosa according to a given dose level. The higher the dose, the higher the level of epithelial damage. Safe dose is ≤ 5 mg / kg.

Keywords: Carotenoid, gastric histopathological

¹Undergraduate student of Faculty of Medicine, Diponegoro University

²Lecturer of Pharmacology and Therapeutic Department, Faculty of medicine, Diponegoro University

PENDAHULUAN

Keberadaan pewarna alami menjadi penting di waktu akhir-akhir ini, seiring makin santernya isu keamanan pangan. Pewarna alami dipercaya mampu memberikan nilai lebih “aman”, ketimbang pewarna makanan sintetik yang banyak beredar di pasaran. Zat warna alami dihasilkan oleh tumbuhan, baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tumbuhan tingkat rendah atau mikroorganisme (antara lain jamur, khamir dan bakteri). Dan komponen yang menghasilkan warna ini dikenal dengan nama pigmen.

Pigmen karotenoid adalah contoh senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada organisme laut seperti rumput laut, alga dan bakteri. Karotenoid, yang merupakan pigmen pemberi warna kuning-merah dan sering digunakan sebagai pewarna makanan (Bauernfied, 1981). Bauernfeind (1981) serta Britton dan Goodwin (1982) telah memanfaatkan karotenoid dalam bidang obat-obatan.

Dengan mengidentifikasi kandungan biopigmen yang dihasilkan oleh invertebrata laut, pigmen pada invertebrata laut dapat menjadi suatu senyawa biopigmen baru. Hasil penelitian ini akan lebih jauh memberikan pilihan alternatif untuk menghasilkan biopigmen dari bakteri yang berasosiasi dengan invertebrata dari ekosistem terumbu karang sehingga akan semakin sedikit eksploitasi terhadap invertebrata terumbu karang yang akan dilakukan.

Beberapa penemuan tentang senyawa bioaktif baru untuk antibiotik, sumber pigmen, kosmetik, enzim dan lainnya banyak diperoleh dari bahan kimia produk alami biota penyusun ekosistem terumbu karang (Burgess, *et al.* 2003 ; Radjasa and Sabdono, 2003 ; Radjasa *et al.*, 2007a,b,d). Kurang dari 2% mikrobial baru diperkirakan berhasil diisolasi dari lingkungan laut sebagai kultur murni. Dilaporkan juga bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Proksch *et al.*, 2002 ; Burgess, *et al.* 2003). Suatu studi kohort berhasil menunjukkan bahwa risiko semua jenis kanker dapat diturunkan dengan meningkatkan konsumsi sayuran yang kaya karoten. Pada hewan coba, pemberian karotenoid dosis tinggi dapat mencegah kanker lambung.

Kecuali pada dosis berlebih, efek samping karotenoid terhadap gastrointestinal jarang ditemukan. Efek samping ini menyebabkan gangguan berupa tukak lambung dan duodenitis, yang diduga disebabkan oleh adanya senyawa tannin yang terkandung dalam karotenoid tersebut. Kemampuan tannin untuk bereaksi dan berikatan dengan protein pada sel epitel mukosa disebut proses astringensi. Proses ini menyebabkan terbentuknya lapisan pelindung di mukosa bagian atas. Pada penggunaan dosis tinggi, tannin menyebabkan iritasi pada membran mukosa.

Penelitian mengenai uji toksisitas akut ini dilakukan untuk mengetahui keamanan dan efek toksisitas akut suspensi biopigmen karotenoid terhadap gaster

mencit Balb/c. Dari uraian tersebut diatas, maka peneliti memutuskan untuk mengambil topik ini sebagai topik penelitiannya.

METODE PENELITIAN

Ruang lingkup penelitian ini meliputi bidang keilmuan Farmakologi, Histologi, dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Penelitian dan pengumpulan data pada penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan April – Juni 2011. Untuk pemeliharaan, perlakuan dan pengamatan bertempat di Laboratorium Farmakologi dan Terapi, sedangkan pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Histologi. Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorik dengan *post test only controlled group design* dan menggunakan mencit Balb/c sebagai hewan percobaan.

Mencit diadaptasi selama 7 hari, kemudian dikelompokkan secara acak dalam 5 kelompok (4 kelompok dengan variasi 4 dosis, positif dan control negatif), tiap kelompok paling sedikit terdiri dari 5 mencit.

Bahan uji diberikan secara per oral dengan sonde lambung, single dose. Selanjutnya mencit diamati hingga hari ke 7. Pada akhir pengamatan, mencit dikorbankan untuk diambil organ hati, ginjal serta ususnya untuk pembuatan sediaan histopatologi. Mencit yang mati selama pengamatan langsung diambil organ hati, ginjal, dan ususnya untuk dibuat sediaan histopatologi. Dilakukan penentuan LD-50

dan sediaan hati, ginjal, usus dibaca dan dianalisis menggunakan mikroskop cahaya untuk dinilai index histopatologinya.

No	Skor	Integritas Epitel Mukosa
1	0	Tidak ada perubahan patologis
2	1	Deskuamasi epitel
3	2	Erosi permukaan epitel (gap 1-10 sel epitel/lesi)

Data yang diperoleh dari semua kelompok sampel diolah dengan program computer *SPSS 15 for Windows*. Uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*. Bila didapat distribusi data normal, dilakukan uji beda dengan uji *One-Way Anova* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc*. Apabila didapatkan distribusi data yang tidak normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan jika didapatkan nilai $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL

Selama berlangsungnya penelitian, tidak ada mencit yang mati maupun masuk dalam kriteria eksklusi sehingga ke-25 mencit memenuhi syarat sebagai sampel

penelitian. Terminasi seluruh mencit dan pengambilan organ gaster dilakukan pada hari ke-8.

Data yang diperoleh dari hasil skoring gambaran histopatologi epitel mukosa gaster diolah dengan program komputer SPSS for Windows. Tabel 2 menampilkan skor gambaran histopatologi gaster secara deskriptif. Distribusi data di uji menggunakan uji *Saphiro-wilk* dan didapatkan distribusi data yang tidak normal ($p < 0,05$) yaitu pada kelompok perlakuan 3 dimana $p = 0,041$, selanjutnya dilakukan transformasi data dan tetap didapatkan sebaran data yang tidak normal pada kelompok P3 ($p = 0,035$).

Tabel 2. Skor integritas epitel mukosa gaster berdasarkan modifikasi kriteria

Kelompok perlakuan	Barthel Manja					Rerata
	Skor integritas epitel mukosa gaster					
	I	II	III	IV	V	
Kelompok kontrol (K)						
Mencit 1	0	1	0	0	0	0,2
Mencit 2	0	0	0	1	1	0,4
Mencit 3	1	1	1	2	0	1
Mencit 4	1	1	1	1	2	1,2
Mencit 5	1	1	2	1	1	1,2
Kelompok Perlakuan (P1)						
Mencit 1	1	1	1	1	1	1
Mencit 2	0	0	0	0	2	0,4

Mencit 3	1	1	0	0	0	0,4
Mencit 4	1	2	1	2	1	1,4
Mencit 5	1	1	1	1	2	1,2
Kelompok Perlakuan (P2)						
Mencit 1	2	2	1	1	1	1,4
Mencit 2	2	2	2	1	2	1,8
Mencit 3	1	1	2	1	1	1,2
Mencit 4	2	1	1	2	1	1,4
Mencit 5	1	1	3	2	2	1,8
Kelompok Perlakuan (P3)						
Mencit 1	2	1	1	1	1	1,2
Mencit 2	1	1	2	1	1	1,2
Mencit 3	2	2	2	3	2	2,2
Mencit 4	1	3	3	1	2	2
Mencit 5	1	2	3	3	2	2,2
Kelompok Perlakuan (P4)						
Mencit 1	1	2	3	3	2	2,2
Mencit 2	2	1	1	2	2	1,6
Mencit 3	3	3	3	3	3	3
Mencit 4	1	2	3	1	3	2
Mencit 5	3	3	3	3	3	3

Keterangan:

K : tidak diberi perlakuan, hanya diberi aquadest peroral

P1 : diberi karotenoid dengan dosis 5 mg/kgBB

P2 : diberi karotenoid dengan dosis 50 mg/kgBB

P3 : diberi karotenoid dengan dosis 500 mg/kgBB

P4 : diberi karotenoid dengan dosis 2000 mg/kgBB

Tabel 3 menampilkan median, minimum, dan maximum skor total integritas epitel mukosa gaster pada setiap kelompok. Median skor integritas epitel mukosa pada kelompok P3 (2,20) dan P4 (3,00) lebih tinggi dibandingkan kelompok lain, sedangkan median paling rendah terdapat pada kelompok K (1,20).

Tabel 3 menampilkan median, minimum, dan maximum skor total integritas epitel mukosa gaster

Kelompok	N	Median	Minimum	Maximum
K	5	0,4	0,2	1,2
P1	5	1	0,4	1,4
P2	5	1,4	1,2	1,8
P3	5	2	1,2	2,2
P4	5	2	1,6	3

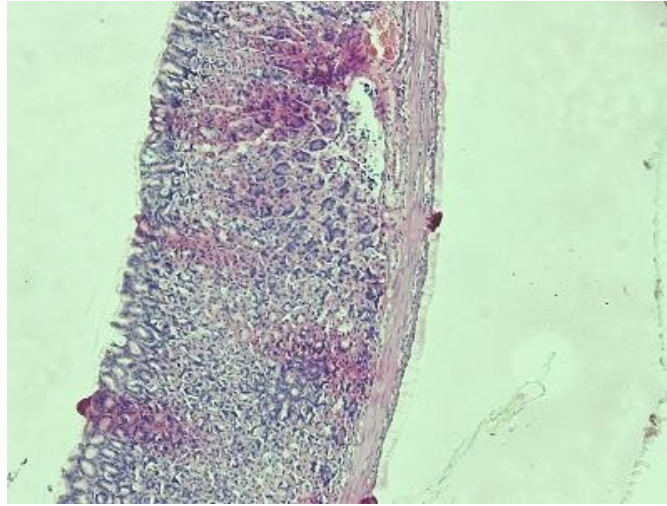
Pada uji *Kruskal-Wallis*, diperoleh nilai $p=0,016$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna paling tidak 2 kelompok perlakuan.

Analisis data diteruskan menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk menilai perbedaan masing-masing kelompok dan diperoleh data sebagai berikut.

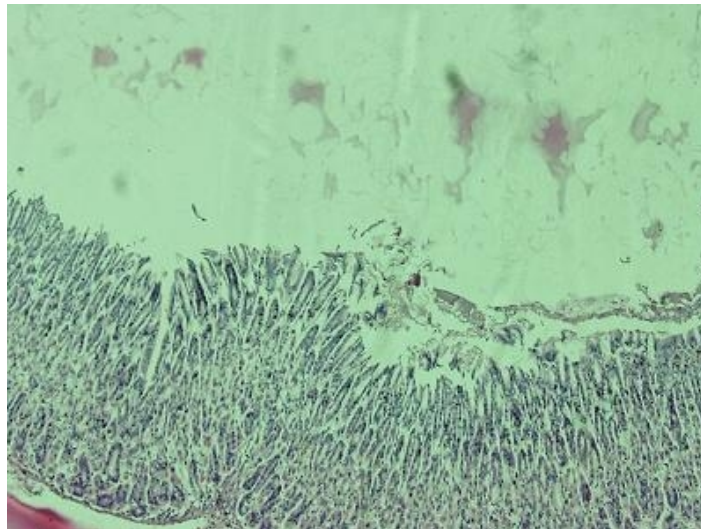
Tabel 4. Hasil uji statistik perbandingan antar kelompok (uji *Mann-Whitney*)

Kelompok	K	P1	P2	P3	P4
K	--	0,667	0,014*	0,023*	0,009*
P1	0,667	--	0,033*	0,043*	0,009*
P2	0,014*	0,033*	--	0,455	0,027*
P3	0,023*	0,043*	0,455	--	0,200
P4	0,009*	0,009*	0,027*	0,200	--

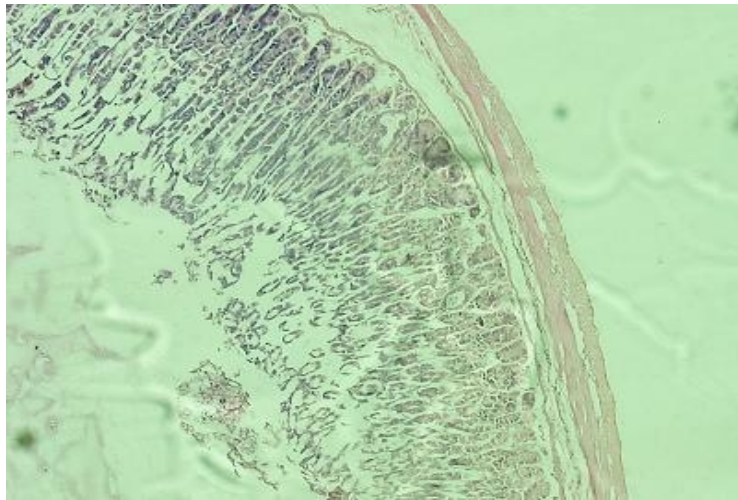
Gambaran histopatologi epitel mukosa gaster normal, adanya deskuamasi epitel, erosi, dan ulserasi diilustrasikan pada gambar 2 sampai gambar 5.



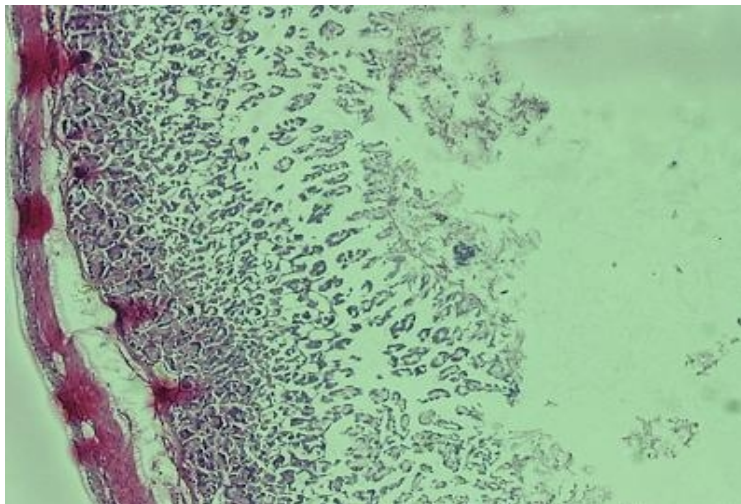
Gambar 2. Skor 0 : epitel mukosa gaster normal



Gambar 3. Skor 1: deskuamasi epitel mukosa gaster



Gambar 4. Skor 2: erosi epitel mukosa gaster



Gambar 5. Skor 3: ulserasi epitel mukosa gaster

PEMBAHASAN

Uji statistik terhadap gambaran histopatologi integritas epitel mukosa gaster menunjukkan adanya perbedaan efek terhadap integritas epitel seiring dengan tingkatan dosis karotenoid yang diberikan. Pada organ gaster didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan 3 terhadap kelompok kontrol.

Obat yang masuk kedalam tubuh akan mengalami proses absorpsi, metabolisme, distribusi, dan ekskresi.¹⁹ Banyak bahan yang potensial toksik masuk ke dalam tubuh melalui traktus gastrointestinal saat terjadi proses absorpsi.

Kerusakan pada traktus gastrointestinal terjadi bila ada gangguan keseimbangan antara faktor defensive yang menjaga keutuhan mukosa dan faktor agresif yang merusak pertahanan mukosa. Bisa faktor agresif yang meningkat atau faktor defensive yang menurun. Bakteri yang mungkin terkandung dalam suspensi karotenoid dapat menjadi faktor agresif sehingga menimbulkan efek samping hingga menjadi toksik. Patogenesis tersering timbulnya efek toksik dari pemberian suatu zat peroral adalah terjadinya iritasi pada mukosa.

Penelitian ini dilakukan berdasarkan pertimbangan untuk menentukan apakah karotenoid yang didapat dari simbiosis bakteri dengan invertebrate laut dapat digunakan sebagai pewarna alami yang aman bagi tubuh, mengingat banyaknya pewarna buatan yang membahayakan.

Pemberian suspensi karotenoid pada dosis $>5\text{mg/kgBB}$ menunjukkan perubahan gambaran histopatologi epitel mukosa gaster yang bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Kemungkinan hal ini disebabkan karena sebagian dari karotenoid di absorpsi oleh gaster. Banyak molekul dari karotenoid yang melakukan kontak dengan membran sel epitel gaster ditambah kandungan senyawa kimia di dalamnya yang dapat bereaksi saat terjadi proses difusi, menyebabkan gangguan integritas epitel mukosa gaster. Hal ini menunjukkan bahwa secara patologi organ, karotenoid memiliki risiko toksik terhadap gaster yaitu melalui perubahan gambaran histopatologi epitel mukosa.

Derajat beratnya iritasi, tergantung respon mukosa yang bervariasi dari deskuamasi sel permukaan, vasodilatasi dan edema lamina propria, sampai erosi dan perdarahan. Erosi merupakan daerah yang kehilangan sebagian mukosa, kebalikan dari ulserasi dimana yang hilang seluruh tebal mukosa.⁸

Dilihat dari rerata integritas epitel mukosa gaster pada kelompok kontrol, didapatkan angka 1,00 yang menunjukkan bahwa telah terjadi deskuamasi epitel. Hal ini mungkin disebabkan karena beberapa faktor, antara lain pemberian makan yang kurang sesuai dengan standard, kondisi kandang yang kurang ideal, faktor stress mencit, dan sebagainya yang berkolaborasi dengan faktor internal seperti adanya penyakit pada traktus gastrointestinal mencit.

KESIMPULAN

Hasil perhitungan skor integritas epitel mukosa gaster berdasarkan modifikasi kriteria Barthel Manja pada kelompok kontrol menunjukkan perubahan dari deskuamasi epitel hingga terjadi erosi. Sedangkan pada kelompok perlakuan menunjukkan perubahan patologis sesuai tingkatan dosis yang diberikan. Semakin tinggi dosis yang diberikan, semakin tinggi tingkat kerusakan epitel yaitu sampai terjadi ulserasi.

SARAN

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk meneliti potensi toksisitas dari suspensi biopigmen karotenoid dengan menggunakan *second observer* dan skor pengamatan berstandar internasional untuk mendapatkan validitas pengamatan yang baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis memanjatkan segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala nikmatNya, dan tak lupa mengucapkan terimakasih kepada dr. Noor Wijayahadi, M.Kes, PhD selaku dosen pembimbing, dr. Neni Susilaningih, dr, Msi dan dr. Ika Pawitra Miranti, dr, M.Kes, SpPA selaku dosen penguji dan ketua penguji, karyawan bagian Farmakologi dan Terapi, Histologi, keluarga, dan teman-teman serta semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian artikel karya tulis ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bakteri laut : mesin biologi penghasil pigmen. [homepage on the Internet] c2011. Available from <http://www.bbrp2.kkp.go.id/kilasan-iptek/>
2. Wisaksono S. Efek toksik dan cara menentukan toksisitas bahan kimia. *Cermin dunia Kedokteran* 2002 ; 135: 32-4
3. Snell RS. Anatomi klinik untuk mahasiswa kedokteran. Edisi 6. Jakarta: EGC; 2006
4. Moore KL, Agur AMR. Anatomi klinis dasar. Jakarta: Hipokrates; 2002
5. Guyton AC, Hall JE. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi 9. Jakarta: EGC; 1997
6. Eroschenko VP. Atlas histologi de Fiore dengan korelasi fungsional. Edisi 9. Jakarta: EGC; 2003
7. Fawcett DW. Buku ajar histologi. Edisi 12. Jakarta: EGC; 1995
8. Robbins SL, Kumar V. Buku ajar patologi I. Edisi 4. Jakarta: EGC; 1995
9. Underwood JCE. Patologi umum dan sistemik. Edisi 2. Volume 2. Jakarta: EGC; 2000
10. Hirlan. Gastritis. Dalam: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editor. Buku ajar ilmu penyakit dalam. Jilid I. Edisi 4. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006. p. 335.

11. Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla – Martinez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* colitis model that allows analysis of both pathogen and host.
12. Nurlaila, Donatus IA, Sugiyanto, Wahyono D, Suhardjono D. Petunjuk Praktikum Toksikologi. 1st ed. Yogyakarta: Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada; 1992. P. 3-5, 16-30
13. Loomis TA. Essential of toxicology. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Fetiger; 1987. P. 198-202
14. Jacobson-Kram, Keller KA. Toxicology Testing Hanbook. Washington DC: Ork Basel. P. 1-20
15. OECD/OCDE. Guideline For Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD; 2001
16. WHO, Research Guidelines For Evaluating The Safety and Efficacy of Herbal Medicine. Manila, Philippines: WHO; 1993
17. Cannas A Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules. [homepage on the internet]. c2010 [cited 2011 Feb 20]. Available from : <http://nbcoc.org/plants/toxicagents/tannin.html>

18. Wusqy NK. Melirik potensi pigmen warna dari bakteri laut [homepage on the internet]. c2008 [cited 2011 Jan 15]. Available from : <http://www.foodreview.biz/login/preview.php?view&id=55805>
19. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Farmakologi ulasan bergambar. Edisi 2. Jakarta; Widya Medika, 2001
20. Anderson D. G. & Lane C. E. (1963) A water soluble pigment of the nudibranch, *Hypselodoris edenticulata*. Bull Mar. Sci. Gulf and Carib. 13, 262-266
21. **Hua, Ngoc-Phuc, Amel Hamza-Chaffai, Russell H. Vreeland, Hiroko Isoda and Takeshi Naganuma.** 2008. *Virgibacillus salarius* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Saharan salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 58 (2008); 2409-2414
22. Cimino, Guido dan Michael T. Ghiselin. 1999. Chemical defense and evolutionary trends in biosynthetic capacity among dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). *Chemoecology* 9: 187 – 207