

**STUDI PEMBERIAN EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT (*Sargassum prismaticum*)
TERHADAP KADAR MDA DAN HISTOLOGI JARINGAN PANKREAS PADA
TIKUS *Rattus norvegicus* DIABETES MELITUS TIPE 1 HASIL INDUKSI MLD-STZ
(*MULTIPLE LOW DOSE - STREPTOZOTOCIN*)**

Devis Resita Dewi, Aulanni'am*, Anna Roosdiana

*Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145*

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) terhadap penurunan kadar MDA dan perbaikan gambaran histologi jaringan pankreas tikus *Rattus norvegicus* diabetes mellitus (DM) tipe 1. Tikus DM tipe 1 diinduksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kgBB selama 5 hari berturut-turut. Kadar MDA diukur melalui metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm menggunakan pereaksi TBA (*Thiobarbituric acid*). Gambaran histologi jaringan pankreas dilakukan menggunakan metode pewarnaan Hematoxylen-Eosin. Pada penelitian ini, tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus kontrol, tikus DM tipe 1 yang terpapar MLD-STZ, dan tikus DM tipe 1 yang terpapar MLD-STZ yang diberikan terapi ekstrak rumput laut coklat secara oral dengan dosis 0,8 g/ekor sebanyak 2 mL per hari selama 1, 3, 5, dan 7 hari. Hasil penelitian ini didapatkan rata-rata kadar MDA masing-masing kelompok perlakuan berturut-turut yaitu sebesar 2,507; 6,770; 5,543; 4,444; 3,734 dan 2,980 µg/mL. Pemberian terapi ekstrak *Sargassum prismaticum* selama 7 hari mampu menurunkan kadar MDA tikus DM tipe 1 sebesar 55,98% yaitu dari (6,770 ± 0,027) mg/dL menjadi (2,980 ± 0,017) mg/dL serta mampu memperbaiki gambaran histologi jaringan pankreas tikus DM tipe 1.

Kata kunci: diabetes mellitus, histologi, MDA, pankreas, *Sargassum prismaticum*.

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the effect of brown seaweed (*Sargassum prismaticum*) extract to decreased MDA levels and improvement of pancreatic tissue histology on rats *Rattus norvegicus* type 1 diabetes mellitus (DM). Type 1 diabetic rats induced by intraperitoneal (i.p) injection of *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) with 20 mg/kg (bw) dose for 5 consecutive days. MDA was measured by UV-Vis spectrophotometry method at a wavelength of 540 nm using TBA (*Thiobarbituric acid*) reagent. Histology of pancreatic tissue performed using Hematoxylen-Eosin staining method. In this research, rats were grouped into 6 treatment groups: the group of control rats, type 1 diabetic rats exposed to MLD-STZ, and type 1 diabetic rats exposed to MLD-STZ than treated by brown seaweed extract orally with 0.8 g/tail dose by 2 mL per day for 1, 3, 5, and 7 days. The results of this research obtained average MDA levels of each group of consecutive treatments were 2.507; 6.770; 5.543; 4.444; 3.734 and 2.980 mg/mL. Therapy with *Sargassum prismaticum* extract for 7 days can reduce MDA levels of type 1 diabetic rats by 55.98% indicating level of (6.770 ± 0.027) mg/dL to be (2.980 ± 0.017) mg/dL and able to improved pancreatic tissue histology type 1 diabetic rats.

Key words: diabetes mellitus, histology, MDA, pancreas, *Sargassum prismaticum*

PENDAHULUAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit kronis menahun akibat adanya gangguan produksi insulin. Insulin merupakan hormon yang mengatur glukosa dalam darah. Gangguan produksi insulin ini disertai timbulnya berbagai komplikasi pada organ tubuh terutama pankreas yang diindikasikan dengan peningkatan kadar glukosa dalam darah (hiperglikemia). Hiperglikemia merupakan indikasi umum dari diabetes yang tidak terkontrol dan dari waktu ke waktu yang dapat menyebabkan kerusakan serius pada banyak sistem tubuh, khususnya saraf dan pembuluh darah [1].

Hiperglikemia dapat menyebabkan produksi radikal bebas yang berlebihan atau ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan akan memicu terjadinya stress oksidatif karena radikal bebas dalam tubuh lebih banyak daripada antioksidan yang terdapat di dalam tubuh. Adanya radikal bebas dalam tubuh menyebabkan kerusakan pada sel, terutama sel β pankreas yang diperantarai mekanisme *cellular mediated autoimmune* yang disertai dengan peningkatan hasil peroksidasi lipid, yaitu malonialdehid (MDA). Sehingga MDA dapat digunakan sebagai indikator pengukuran radikal bebas dalam tubuh [2].

Pencegahan ROS akibat hiperglikemia salah satunya adalah menggunakan terapi ekstrak rumput laut coklat. Rumput laut coklat mengandung komponen bioaktif yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami, yaitu senyawa polifenol golongan flavonoid. Flavonoid berperan sebagai *scavenger* radikal karena mampu menangkap radikal bebas dalam tubuh dengan adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan donor atom H dari gugus hidroksil (-OH) fenolik. Penghambatan radikal bebas menyebabkan terhambatnya proses peroksidasi lipid sehingga kadar MDA yang dihasilkan menurun, serta mampu memperbaiki gambaran histologi kerusakan jaringan ginjal pada tikus DM tipe 1 setelah di induksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ). STZ merupakan salah satu sumber radikal bebas yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada hewan coba [3].

Sehubungan dengan uraian di atas, maka dalam penelitian ini akan dipelajari potensi ekstrak rumput laut coklat *Sargassum prismaticum* sebagai *scavenger* radikal bebas dalam menurunkan kadar MDA dan memperbaiki kerusakan jaringan pankreas pada tikus DM tipe 1 sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi untuk DM tipe 1.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan umur 2 bulan dengan berat rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, dan rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*). Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapat sertifikat laik etik No:150-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah Streptozotocin (STZ), Paraformaldehid (PFA), NaCl-Fisiologi, kit MDA (BJ=0,997 g/L), Na-Thiobarbiturat, *Trichloroacetic* (TCA), Aquades, Pereaksi Wagner, NaOH, HCl (37%(w/w), $\rho=1,19 \text{ g/cm}^3$), Parafin Cair, CHCl_3 ($\rho=1,483 \text{ g/cm}^3$), H_2SO_4 ($\rho=1,84 \text{ g/cm}^3$), NH_3 ($\rho=0,683 \text{ g/cm}^3$), Plat KLT, Dietil eter ($\rho=0,713 \text{ g/cm}^3$), Etil Asetat ($\rho=0,987 \text{ g/cm}^3$), Asam Asetat ($\rho=1,05 \text{ g/cm}^3$), *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4; Xylol, Hematoxylin, Buffer sitrat, Eosin etanol, Entellan, Etanol Absolut, dan Etanol 70%.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus berupa kotak berukuran 20 x 30 x 40 cm, *glucotest tools* (strip glukometer dan glukometer *digital-one touch Lifescan*), seperangkat alat gelas dan *polysilene*, gunting, pinset, spuit 1 mL (Terumo syringe), sonde yang dipasang di ujung spuit, *blue* dan *yellow tip*, pipet mikro, pipet tetes, *vortex* (Guo Huq Touch Mayer), tabung mikro (*ependorf*) dan rak tabung, tabung propilen, mortar, *waterbath* (Memmert), neraca analitik, sentrifus (Hettich EBA III), spektrofotometer UV-Vis (GENESIS thermospectronic), mikrotom, mikroskop cahaya (Olympus BX51), *cover glass*, gelas objek, *stirrer* (IKAMAG-RH), pipa kapiler, serta sarung tangan.

Prosedur

Penyiapan dan Perlakuan Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan 24 ekor tikus putih *Rattus norvegicus* jantan strain wistar. Tikus percobaan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan yaitu kelompok tikus kontrol, tikus DM tipe 1 yang terpapar MLD-STZ, dan tikus DM tipe 1 yang terpapar MLD-STZ yang diberikan terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) selama 1, 3, 5, dan 7 hari. Tikus DM tipe 1 diinduksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) secara intraperitoneal dengan dosis 20 mg/kgBB selama 5 hari berturut-turut, sedangkan tikus DM tipe 1 yang diberikan ekstrak rumput laut coklat diterapi secara oral dengan dosis 0,8 g/ekor sebanyak 2 mL per hari. Tahap percobaan meliputi masa aklimatisasi, injeksi STZ, dan

pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat serta pengukuran kadar glukosa dalam darah. Selanjutnya, tikus dibunuh dengan cara dislokalisasi leher dan dilakukan pembedahan untuk diambil organ pankreas sebagai pemeriksaan histologi.

Prosedur Pengukuran Kadar MDA Menggunakan Pereaksi TBA (*Thiobarbituric acid*)

Pengukuran kadar MDA pada pankreas tikus dilakukan menggunakan pereaksi TBA yang akan membentuk produk MDA-TBA berwarna merah muda dan diukur menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Organ pankreas dari masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pembuatan homogenat, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit, supernatan diambil, dan dipindahkan dalam *microtube*. Sebanyak 100 μ L supernatan pankreas ditambahkan 550 μ L aquades steril, 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1 M, dan 100 μ L Na-Thiobarbiturat. Pada setiap penambahan 2 pereaksi, dihomogenkan menggunakan vortex. Dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 100°C selama 20 menit, diangkat, dan dibiarkan dingin pada suhu ruang. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil, dan dipindahkan dalam *microtube* baru. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 540 nm dan diplotkan pada kurva standar MDA untuk menghitung konsentrasi sampel.

Pengamatan Gambaran Histologi Pankreas

Gambaran histologi digunakan untuk mengetahui perbedaan gambaran struktur jaringan pankreas pada masing-masing perlakuan. Gambaran histologi jaringan pankreas menggunakan metode pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Pewarnaan pada preparat diawali dengan tahap deparafinisasi, kemudian rehidrasi, pewarnaan dalam hematoxylin, pewarnaan dalam eosin, dehidrasi, *clearing* (penjernihan), dan *mounting* (perekatan). Gambaran histologi sel β pankreas diamati menggunakan mikroskop Olympus BX51 dengan perbesaran 400x.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Induksi MLD-STZ dan Terapi Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Kadar MDA

STZ adalah sumber NO eksogen. Induksi MLD-STZ menyebabkan peningkatan radikal bebas sehingga menyebabkan kerusakan sel, terutama sel β pankreas. Radikal bebas dalam penelitian ini diukur berdasarkan kadar MDA (malonaldehid). MDA merupakan salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid membran sel oleh radikal bebas yang berlebih atau ROS sehingga MDA digunakan sebagai indeks pengukuran aktivitas radikal bebas dalam tubuh [4].

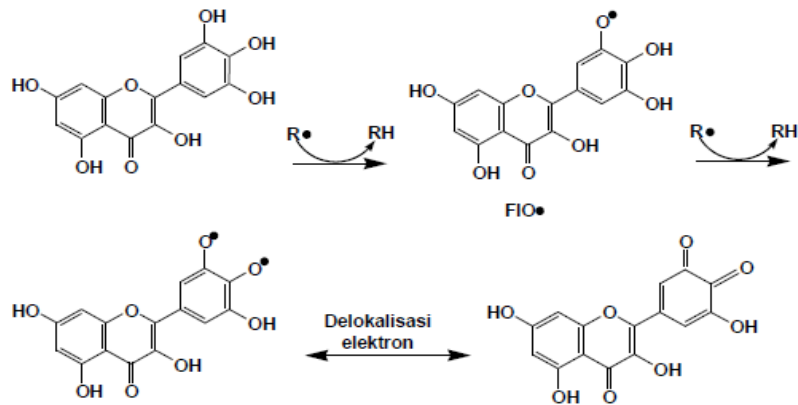
Hasil pengukuran kadar MDA menunjukkan bahwa kadar MDA pada jaringan pankreas tikus DM tipe 1 meningkat cukup tinggi terhadap tikus kontrol (Tabel 1). Kadar MDA pada tikus DM tipe 1 menunjukkan kadar paling tinggi daripada tikus kelompok kontrol maupun terapi. Hal ini berarti dengan adanya induksi STZ pada tikus DM tipe 1 menyebabkan kapasitas radikal bebas dalam tubuh meningkat akibat pelepasan radikal nitrogen oksida (NO) dari STZ. Pada tikus DM tipe 1 yang mendapat terapi ekstrak rumput laut coklat selama 1, 3, 5, dan 7 hari menunjukkan penurunan kadar MDA secara signifikan.

Tabel 1. Kadar MDA pankreas tikus kontrol, tikus DM tipe 1, dan tikus DM tipe 1 yang diterapi ekstrak rumput laut coklat.

Kelompok Perlakuan	Rata-rata Glukosa Darah (mg/mL)	Rata-rata Kadar MDA* (µg/mL)
Kontrol	98 ± 3	2,507 ± 0,041
Sakit (Dm Tipe 1)	290 ± 9	6,770 ± 0,027
Terapi 1 Hari	273 ± 3	5,543 ± 0,060
Terapi 3 Hari	260 ± 6	4,444 ± 0,060
Terapi 5 Hari	214 ± 5	3,734 ± 0,022
Terapi 7 Hari	166 ± 7	2,980 ± 0,017

*konsentrasi dalam homogenat pankreas

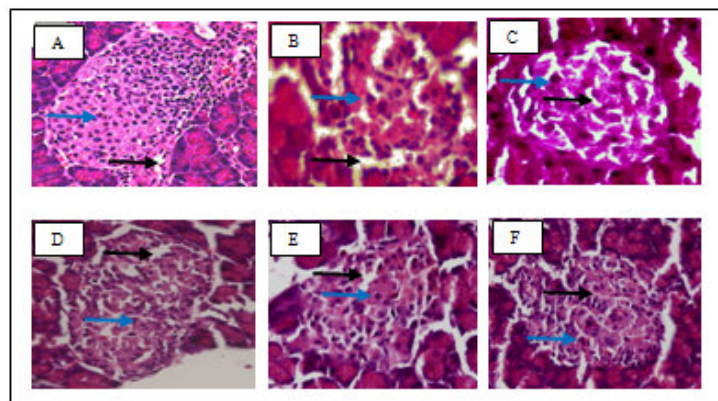
Pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat selama 7 hari menunjukkan respon penurunan kadar MDA paling mendekati normal daripada tikus terapi yang lain. Hal ini berarti semakin lama pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat terhadap tikus DM tipe 1 maka semakin tinggi aktivitas penghambatan proses oksidasi. Penghambatan proses oksidasi disebabkan oleh adanya antioksidan polifenol (flavonoid) yang terkandung dalam ekstrak rumput laut coklat (Gambar 1). Flavonoid mempunyai struktur yang ideal sebagai antioksidan yaitu sebagai *scavanger* radikal dengan adanya senyawa fenol lebih dari satu yang tersusun oleh gugus aromatik dan gugus OH serta adanya ikatan rangkap terkonjugasi dimana struktur tersebut dibutuhkan dalam penangkapan radikal bebas [5].



Gambar 1. Reaksi penghambatan radikal bebas oleh flavonoid

Gambaran Histologi Jaringan Pankreas dengan Pewarnaan Hematoxylen-Eosin

Kerusakan sel β pankreas pada tikus DM tipe 1 dapat diamati melalui preparat pankreas menggunakan metode pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Hasil pengamatan gambaran histologi jaringan pankreas tikus menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata pada tikus kontrol, tikus DM tipe 1, dan tikus DM tipe 1 yang mendapat terapi ekstrak rumput laut selama 1, 3, 5, dan 7 hari (Gambar 2).



Gambar 2. Gambaran histologi jaringan pankreas tikus hasil pewarnaan HE, perbesaran 400x

Keterangan :

- = rongga intraseluler pada pulau langerhans
- = sel β pada pulau langerhans jaringan pankreas

Pada tikus kontrol (A), pulau Langerhans dalam keadaan normal yang terlihat dari susunan sel endokrin, khususnya sel β pankreas, yang teratur menyebar di pulau Langerhans. Pada tikus DM tipe 1 (B), terjadi peradangan yang ditunjukkan dengan banyaknya rongga intraseluler dan ketidak-teraturan sel β pankreas. Hal ini berarti bahwa induksi MLD-STZ mampu merusak sel β pankreas sehingga menghambat kerja sekresi insulin oleh pankreas.

Sedangkan pada tikus DM tipe 1 yang mendapat terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) masing-masing selama 1, 3, 5, dan 7 hari (C, D, E, dan F) menunjukkan adanya perbaikan peradangan jaringan yang terlihat dari berkurangnya rongga-rongga intraseluler pada pulau Langerhans mendekati kondisi jaringan pankreas normal.

KESIMPULAN

Pemberian terapi ekstrak rumput laut coklat (*Sargassum prismaticum*) secara oral yaitu selama 1, 3, 5, dan 7 hari berpengaruh terhadap kadar MDA dan gambaran histologi jaringan pankreas tikus DM tipe 1. Terjadi penurunan kadar MDA pada pankreas tikus DM tipe berturut-turut sebesar 18,12%, 34,35%, 44,89%, dan 55,98% serta memperbaiki gambaran histologi jaringan pankreas.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Dr. Sulistiana Prabowo, dr, MS yang telah memberi kesempatan untuk menjadi bagian dalam payung penelitiannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hoogwerf, B.J., 2010, *Diabetes Mellitus: Disease Managenet*, <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/endocrinology/diabetes-mellitus/>, diakses tanggal 30 Agustus 2013.
2. Mosaad, A., A. Seif, dan A.A. Youssef, 2004, Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patiens, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 346, pp. 161-170.
3. Shofia, V., 2013, Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum prismaticum*) Terhadap Kadar MDA, Ekspresi iNos dan Gambaran Histologi Ginjal Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1, *Skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.
4. Hussain H., E., M., 2002, Reverse of Diabetic Retinopathy in Streptozotocin Induced Diabetic Rats Using Tradisional Indian Anti Diabetic Plan Azadirachta Indika (L), *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Vol. 17, No. 2, pp. 115-123.
5. Aulanni'am, A. Roosdiana, dan N.L. Rahmah, 2012, The Potency of *Sargassum duplicatum* Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*, *Journal of Life Sciences*, Vol. 6, pp. 144-154.