

Potensi Fraksi Etanol dan Etil Asetat Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) Terhadap Penurunan Kadar Malondialdehid dan Perbaikan Gambaran Histologis Jejunum Usus Halus Tikus IBD (*Inflammatory Bowel Disease*)

Potency of Brown Seaweed (*Sargassum duplicatum* Bory) Ethanol and Ethyl Acetic Fraction to Malondialdehyde Concentration Decreasing and Histological Retrival of IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) Rat Small Intestinal Jejunum

Aulanni'am, Anna Roosdiana, Nur Lailatul Rahmah

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Jl. Veteran, Malang 65145
Telp. 0341-575838, Fax. 0341-554403
Email : cahya_leyla@yahoo.com

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a chronic inflammatory disease that attacks the digestive tract (specific in intestine and gastric). One of that causing IBD were indomethacin side effect as non-steroidal anti-inflammatory drug. Exploration herbal material was developed countinously on medicinal treatment of IBD, include brown seaweed (*Sargassum duplicatum* Bory) extract from ethanol dan ethyl acetic fraction. Indomethacin was used to induce small intestine inflammation with 15 mg/kg body weight orally once time and continued by theraphy of brown seaweed (*Sargassum duplicatum* Bory) ethanol dan ethyl acetic fraction 100 mg/kg body weight seven times for seven days. Level of malondialdehyde (MDA) and histological picture of small intestine (jejunum) were used as parameter from effect *Sargassum duplicatum* Bory ethanol dan ethyl acetic fraction present to the small intestine inflammation. The MDA level was measured by TBA assay and histological picture was observed by hematoxylen eosin staining. The result of this research showed that there were descent of MDA level 54.20%. The histological observation also showed there were repaired on jejunum small intestine tissue. These result showed that *Sargassum duplicatum* Bory ethanol dan ethyl acetic fraction might be improved as alternative therapy on IBD medical treatment, especially small intestine inflammation.

Keywords : IBD, Indomethacin, Brown Sea Weed (*Sargassum duplicatum* Bory), MDA

Pendahuluan

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah penyakit inflamasi kronik yang menyerang saluran pencernaan (terutama di usus). Gejala umum dari IBD adalah diare, sakit perut dan pendarahan pada saluran pencernaan (Xavier and Podolsky, 2007). IBD beresiko tinggi menyebabkan kerusakan saluran pencernaan (McFarland, 2008). IBD dibagi menjadi dua macam, yaitu *Ulcerative Colitis* (inflamasi kronik usus besar) dan *Chron's Disease* (inflamasi kronik usus halus) (Xavier and Podolsky, 2007).

Kasus IBD banyak terjadi di negara industri seperti Perancis dan Kanada (8-66 kasus per 100.000 penduduk) (Economou and Pappas, 2007), Amerika dan Inggris (4-7 kasus per 100.000 penduduk) (Economou and Pappas, 2007; Lok *et al.*, 2007) dan negara berkembang seperti Cina dan Korea (0,2-3 kasus per 100.000 penduduk) (Economou *et al.*, 2007). Belum ada data insidensi IBD yang jelas di Indonesia. Namun, pada studi prospektif di beberapa rumah sakit di Jakarta, terdapat 45 kasus IBD dari total 451 kasus pemeriksaan endoskopi (Djojongrat, 2001). Tercatat sebanyak 2.812 pasien

di Indonesia mengalami gejala IBD (seperti diare) dari tahun 1995-2001 (Tjaniadi, *et al.*, 2003).

Secara umum, IBD disebabkan oleh adanya infeksi pada saluran pencernaan karena adanya pemicu seperti bakteri dan virus (Achkar, 2000). Beberapa penelitian menunjukkna bahwa penyebab IBD yang lain adalah pemakaian obat anti-inflamasi non steroid (*non steroidal anti inflammatory drug*, NSAID), seperti indometasin (Podolsky, 2002; Basivireddy *et al.*, 2003). Hal ini dikarenakan indometasin mampu menghambat enzim siklooksigenase (COX) 1 yang berfungsi terhadap sintesis PGE₂ dan produksi mukus (lendir) untuk melindungi mukosa usus halus dari serangan bakteri dan virus penyebab infeksi (Achkar, 2000 and Takeuchi, 2003).

Indometasin terbukti meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yaitu radikal O₂⁻, OH dan H₂O₂ yang berasal dari kebocoran elektron dari sisi spesifik rantai transport elektron, proses oksidasi metabolit indometasin desmetildeskloro-benzoil-indometasin (DMBI) menjadi iminokuinon serta aktivasi neutrofil dan

makrofag (proses fagositosis) (Maity *et al.*, 2008, Takeuchi *et al.*, 2003; Ju and Uetrecht. 1998). Indometasin meningkatkan kadar malondialdehid (MDA) serta menurunkan aktivitas enzim superoksida (SOD), glutathion (GSH) peroksidase dan glutathion reduktase yang merupakan parameter dari stress oksidatif (Basivirreddy *et al.*, 2004).

Pengobatan IBD secara konvensional dilakukan dengan pemberian obat-obatan dari jenis kortison (steroid), anti-inflamasi, penekan sistem imun dan antibiotik. Selain itu, terdapat pula terapi herbal menggunakan tanaman yang berpotensi sebagai obat seperti ekstrak etanol dan metanol *Flos lonicerae* (jenis teh) dan ekstrak metanol *Rhizoma bletillae* (jenis anggrek) yang kaya akan kandungan polifenol sebagai antioksidan (Wu, 2007; Wu *et al.*, 2010). Terapi herbal biasanya lebih aman daripada pengobatan konvensional.

Rumput laut coklat (*Sargassum* sp.) merupakan golongan alga yang memiliki kandungan berupa protein, lemak, karbohidrat, alginat, vitamin, mineral, dan iodin. Selain itu, terdapat kandungan antioksidan sebagai *scavenger* radikal bebas berupa senyawa polifenol (flavonoid dan florotanin) dan fukosantin pada *Sargassum* sp. (Lim *et al.*, 2002; Meenakshi *et al.*, 2009; Samee *et al.*, 2009; Zahra *et al.*, 2007). Kandungan antioksidan polifenol (flavonoid) ekstrak etanol 85% *Sargassum duplicatum* Bory dengan dosis 100 mg/kg berat badan tikus terbukti mampu menurunkan kadar MDA tikus jantan yang secara tidak langsung mencerminkan penurunan kadar radikal bebas (Botutihe, 2010). Florotanin kasar hasil ekstrak etanol dan etil asetat *Sargassum* sp. selain memiliki aktivitas antioksidan juga memiliki aktivitas anti-alergi (Samee, *et al.*, 2009).

Peningkatan radikal bebas (ROS) akibat indometasin pada jejunum usus halus menyebabkan kerusakan pada mukosa jejunum usus halus sebagai efek dari IBD, sehingga fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory yang kaya kandungan antioksidan diharapkan mampu menurunkan kadar radikal bebas. Berdasarkan hal di atas, maka pada penelitian ini akan dikaji potensi fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) sebagai alternatif terapi IBD. Parameter yang akan diteliti adalah kadar malondialdehid (MDA) dan gambaran histologis jejunum usus halus. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) terhadap penurunan kadar MDA dan perbaikan gambaran histologis jejunum usus

halus tikus IBD yang dipapar indometasin, sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif terapi pada IBD.

Materi dan Metode Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak pemeliharaan hewan coba, gavage, seperangkat alat bedah, seperangkat alat gelas, alat sentrifugasi (Denley tipe BR 401), sonikator (Branson 200), vortex (Guo-Huq), incubator/oven (Mommert), shaker (VRN-200), mikroskop cahaya (Nikon) dan spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar umur 3 bulan, berat 125-175 g, fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory, indometasin (Sigma-Aldrich), standar MDA (Sigma-Aldrich), akuades, etanol, xilol, PBS, PFA, TCA, Na-Thio, dan Hcl.

Ekstraksi rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory)

Rumput laut coklat dibersihkan dan dipotong kecil lalu dikering anginkan hingga mengandung kadar air antara 20-30%. Setelah kering, rumput laut coklat ditimbang sebanyak 116 g, lalu diekstraksi dengan maserasi menggunakan 1,5 L pelarut etanol 85%. Maserasi dilakukan selama dua hari. Hasil ekstraksi kemudian disaring dan filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 40°C ($\pm$ 2 jam). Ekstrak pekat kemudian dicuci dengan masing-masing 100 ml kloroform sebanyak tiga kali dan lapisan atas (fraksi non-lipid) diekstraksi dengan 250 ml etil asetat. Fraksi etil asetat (lapisan bawah) diambil dan dikeringkan dengan gas N₂ hingga diperoleh ekstrak dengan berat konstan.

Pembuatan Larutan Fraksi Etanol dan Etil Asetat *Sargassum duplicatum* Bory untuk Terapi

Dosis fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory yang digunakan adalah 100 mg/kg berat badan tikus. Jika berat tikus adalah 150 mg, maka diperlukan 15 mg fraksi tersebut. 15 mg fraksi kemudian dilarutkan dengan 0,2 ml akuades steril dan 1,8 ml minyak jagung steril.

Pembuatan Larutan Indometasin

Dosis indometasin yang digunakan adalah 15 mg/kg berat badan tikus. Jika berat tikus adalah 150 g, maka diperlukan 2,25 mg indometasin

kemudian dilarutkan dengan 200 µl minyak jagung steril kemudian divortex hingga homogen.

Pembuatan Tikus Kontrol Negatif

Tikus kontrol diberi minyak jagung steril 200 µl sebanyak 1 x dan diinkubasi selama 7 hari.

Pembuatan Kontrol Inklusi IBD dan Tikus IBD

Kontrol inklusi IBD dibuat dengan pemaparan indometasin 1 kali 15 mg/kg berat badan yang diinkubasi selama 1 hari. Perlakuan ini bertujuan untuk membuktikan bahwa dosis ini dapat menyebabkan IBD pada tikus.

Tikus IBD dibuat dengan pemaparan indometasin 1 kali 15 mg/kg berat badan yang kemudian diinkubasi selama 7 hari.

Terapi Tikus IBD dengan Fraksi Etanol dan Etil Asetat *Sargassum duplicatum* Bory

Tikus IBD diterapi dengan larutan fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory dengan dosis 100 mg/kg berat badan sebanyak 7 kali (7 hari berturut-turut).

Embedding Organ Jejunum Usus Halus

Langkah awal embedding jejunum tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah organ jejunum direndam dalam larutan fiksatif (PFA 10%). Kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian organ jejunum dipindahkan dalam etanol 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 20 menit, etanol 95% selama 20 menit dan etanol absolut selama 20 menit. Proses ini dilakukan sebanyak 3 kali. Dimasukkan kembali ke dalam larutan xilol dan dilakukan pada suhu 60-63°C selama 30 menit. Kemudian organ jejunum dicelupkan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam wadah. Setelah beberapa saat parafin akan memadat dan organ jejunum berada dalam blok paraffin.

Pembuatan Preparat Jejunum Usus Halus

Organ jejunum yang berada dalam masing-masing blok parafin hasil embedding dimasukkan dalam penjepit mikrotom dan diatur sejajar dengan mata pisau mikrotom. Sebelum pemotongan, diatur terlebih dahulu ketebalan irisan di atas 10 µm untuk mempercepat pencapaian bidang potong jaringan. Lalu, jejunum diiris dengan ukuran 5 µm, diambil irisan dengan kuas dan dimasukkan air pada suhu ruang. Kemudian hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C. Selanjutnya irisan

yang terentang sempurna diambil dengan objek gelas dan diletakkan di atas *hot plate* 38-40°C hingga kering. Setelah itu preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C selama 24 jam.

Pewarnaan Hematoksin Eosin

Pewarnaan Hematoksin-Eosin mula-mula dilakukan dengan memasukkan preparat jejunum dalam xilol absolut selama 5 menit sebanyak 2 kali. Kemudian dilakukan tahapan deparafinasi, dimana preparat dimasukkan dalam xilol bertingkat 1-3 [xilol : etanol absolut (3:1, 1:1, 1:3)] masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya di rehidrasi, preparat dimasukkan ke dalam etanol bertingkat yang dimulai dari etanol absolut, etanol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Kemudian direndam dalam akuades selama 5 menit. Preparat selanjutnya diwarnai dengan pewarna hematoksin selama 10 menit hingga diperoleh hasil terbaik. Dicuci dengan air mengalir selama 30 menit, dibilas dengan akuades dan dimasukkan dalam pewarna eosin selama 5 menit. Preparat direndam dalam akuades untuk menghilangkan kelebihan eosin. Kemudian dilakukan tahapan dehidrasi, preparat dimasukkan dalam etanol bertingkat dari 80%, 90% dan 95% hingga etanol absolut. Selanjutnya dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat dalam xilol selama 5 menit, dikering-anginkan dan di-mounting dengan entellan. Lalu ditutup dengan *cover glass*.

Penentuan kadar malondialdehid (MDA)

- Pembuatan Kurva Standar MDA

Larutan stok MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 µg/ml diambil masing-masing 100 µl, dimasukkan dalam ependorf yang berbeda. Kemudian ditambahkan 550 µl akuades. Masing-masing tabung yang berisi 650 µl larutan ditambahkan 100 µl TCA 10%, 250 µl HCl 1 N dan 100 µl Na-Thio 1%. Setelah itu dihomogenkan. Kemudian disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil, lalu diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya larutan standar MDA tersebut diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 532 nm. Hasil absorbansi kemudian dibuat kurva standar MDA.

- Pembuatan Homogenat Jejunu

Jejunum diambil dan dipotong kecil-kecil. Ditimbang 0,5 g kemudian digerus dengan mortar steril yang diletakkan di atas balok es. Homogenat ditambahkan 0,5 ml NaCl 0,9% dingin. Kemudian

dimasukkan dalam ependorf 1,5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Diambil supernatan untuk dilakukan uji TBA.

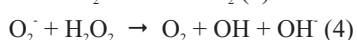
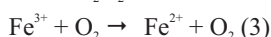
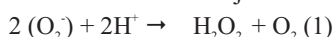
- Pengukuran Kadar MDA dengan Uji TBA

Penentuan kadar MDA dilakukan dengan uji TBA. Supernatan jejunum sebanyak 100 µl dimasukkan dalam eppendorf, ditambah 550 µl akuades, 100 µl TCA 10%, 250 µl HCl 1 N dan 100 µl Na-thio. Setelah itu, dihomogenkan dan disentrifugasi pada 500 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan diinkubasi dalam penangas air 100°C selama 30 menit. Supernatan dibiarkan dalam suhu ruang lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 532 nm (Halliwell and Susanna, 1993). Absorbansi yang diperoleh kemudian dplotkan pada persamaan regresi linear yang diperoleh sehingga diperoleh kadar MDA.

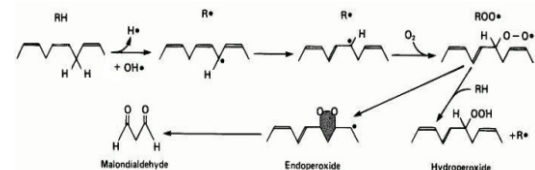
Hasil dan Pembahasan

Profil Malondialdehid Jejunum Usus Halus Tikus Kontrol Negatif, Tikus yang dipapar Indometasin dan Tikus Hasil Terapi Fraksi Etanol dan Etil Asetat *Sargassum duplicatum* Bory.

MDA merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid membran oleh ROS, sehingga pengukuran kadar MDA secara tidak langsung mencerminkan kadar radikal bebas. Indometasin memicu pembentukan ROS yaitu O_2^- , H_2O_2 dan OH pada mitokondria sel enterosit. ROS terbentuk karena indometasin dapat menyebabkan kebocoran elektron pada rantai transport elektron (terutama kompleks I dan III) sehingga menyebabkan reduksi O_2 menjadi O_2^- . Selain itu, ROS juga disebabkan karena oksidasi metabolit indometasin yaitu oksidasi DMBI menjadi iminokuinon dan indometasin secara tidak langsung akan memacu aktivasi makrofag dan neutrofil ke dalam jaringan yang juga dapat menginduksi ROS dan RNS. Radikal OH memiliki reaktivitas yang tinggi dan dapat diperoleh dari beberapa reaksi. Reaksi ini melibatkan konversi O_2^- menjadi H_2O_2 oleh SOD (reaksi 1). Pelepasan Fe^{2+} dapat mengkatalisis H_2O_2 menjadi OH melalui reaksi Fenton (reaksi 2). Fe^{3+} hasil reaksi Fenton dapat direduksi oleh O_2^- menghasilkan Fe^{2+} yang dapat mengkatalisis reaksi Fenton kembali (reaksi 3). Radikal superoksid dan peroksida dapat berpartisipasi dalam reaksi Haber-Weiss dan menambah jumlah OH (reaksi 4):



Ikatan rangkap dua (ikatan ganda $C=C$) dari PUFA merupakan target utama radikal hidroksil (Gambar 1). Adanya ikatan rangkap dua ($C=C$) melemahkan ikatan antara karbon dan hidrogen sehingga memudahkan radikal hidroksil dalam mengabstraksi atom hidrogen dari PUFA. Tahap awal peroksidasi lipid (PUFA) (RH) adalah abstraksi atom hidrogen oleh radikal hidroksil sehingga terbentuk radikal lipid (R). Selanjutnya radikal lipid akan mengalami penataan ulang yang juga membentuk radikal lipid. Radikal lipid merupakan molekul yang sangat tidak stabil sehingga dapat bereaksi dengan O_2 membentuk radikal peroksil lipid (ROO). Radikal peroksil lipid dapat bereaksi dengan PUFA yang lain, mengambil satu elektron dan menghasilkan lipid hidroperoksida (ROOH hidroperoksida) serta radikal lipid yang lain. Proses reaksi radikal dengan senyawa non-radikal yang menghasilkan radikal lain tersebut diatur dalam suatu mekanisme reaksi berantai. Lipid hidroperoksida merupakan senyawa yang tidak stabil dan dapat terfragmentasi, dimana salah satu hasil fragmentasinya adalah MDA. Radikal peroksil lipid juga dapat mengalami tahapan reaksi siklisasi menghasilkan peroksida siklik yang berdekatan dengan pusat radikal karbon. Radikal ini menghasilkan molekul dengan struktur yang analog dengan endoperoksida. Endoperoksida selanjutnya akan membentuk malondialdehid (MDA) (Amic *et al.*, 2003; Zhang, 2005).



Gambar 1. Reaksi pembentukan malondialdehid (MDA) melalui peroksidasi lipid (PUFA)

Indometasin mampu menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (COX) 1 dan 2. Penghambatan pada COX-2 akan berfungsi terhadap pengurangan nyeri. Namun, penghambatan terhadap COX-1 akan menghambat sintesis PGE_2 yang berfungsi pada sekresi mukus untuk melindungi mukosa usus halus (Tanaka *et al.*, 2002). Hal ini menyebabkan lemahnya sistem pertahanan pada mukosa jejunum usus halus yang dapat menyebabkan serbuan bakteri patogen pada mukosa usus halus sehingga menyebabkan infeksi. Adanya infeksi inilah yang menyebabkan aktivasi makrofag, pembentukan ROS dan RNS, yang memicu aktivasi NF- κ B dan

pelepasan sitokin pro-inflamasi (IL-1, TNF- α , dan IFN- γ) sehingga mengakibatkan inflamasi lokal pada jaringan jejunum usus halus. Proses oksidasi metabolit indometasin desmetildeskloro-benzoil-indometasin (DMBI) menjadi iminokuinon juga dapat mengaktifasi neutrofil sehingga berpotensi dalam pembentukan ROS yang dapat menambah kadar radikal bebas pada jejunum usus halus (Ju and Utrecht. 1998).

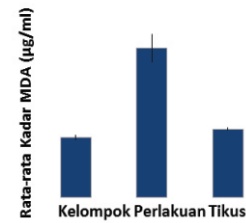
Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar MDA jejunum usus halus kelompok tikus IBD yang dipapar indometasin ($4,596 \pm 0,429 \mu\text{g/ml}$) terhadap kontrol negatif ($1,839 \pm 0,067 \mu\text{g/ml}$) (Tabel 1 dan Gambar 2), dimana kadar MDA mencerminkan secara tidak langsung kadar radikal bebas.

Berdasarkan hasil penelitian, pemberian fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dapat menurunkan kembali kadar MDA pada tikus terapi yaitu $2,105 \pm 0,035 \mu\text{g/ml}$. Hasil statistik dengan Anova-Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara tikus IBD dengan tikus yang mendapat terapi, dan antara tikus yang diterapi dengan tikus kontrol negatif terapi dan kontrol. Hal ini berarti bahwa pemberian fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) pada kelompok terapi tetap dapat menurunkan kadar MDA, tetapi tidak dapat menyamai kadar pada kelompok kontrol.

Tabel 1. Profil Malondialdehid Jejunum Usus Halus Tikus Kontrol Negatif, Tikus yang dipapar Indometasin dan Tikus Hasil Terapi Fraksi Etanol dan Etil Asetat *Sargassum duplicatum* Bory

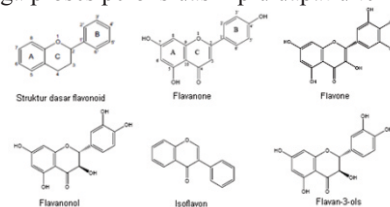
Kelompok	Rata-rata kadar MDA* ($\mu\text{g/ml}$)	Peningkatan kadar MDA terhadap kontrol (%)
Kontrol negatif	$1,839 \pm 0,067$	0
IBD (indometasin)	$4,596 \pm 0,429$	149,92
Terapi	$2,105 \pm 0,035$	14,46

* konsentrasi dalam homogenat jejunum usus halus

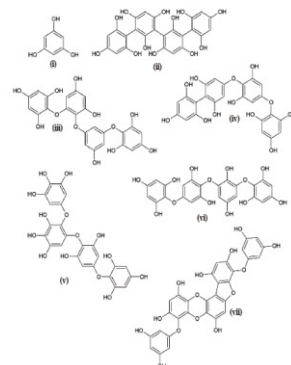


Gambar 2. Perbandingan nilai rata-rata kadar MDA pada jejunum usus halus tikus perlakuan

Penurunan kadar MDA oleh fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory dimungkinkan karena kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Berdasarkan uji fitokimia, fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory mengandung flavonoid dan florotanin yang merupakan komponen utama dan bertindak sebagai antioksidan (Botutihe, 2010 dan Samee *et al.*, 2009). Hal ini didasarkan pada struktur flavonoid (Gambar 3) dan florotanin (Gambar 4) yang memiliki lebih dari satu senyawa fenol (mempunyai sistem aromatik dan gugus -OH) dan memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, dimana struktur tersebut diperlukan dalam menangkal radikal bebas. Adanya kandungan antioksidan dalam fraksi tersebut dimungkinkan dapat menangkal efek radikal bebas dan mencegah pembentukan radikal bebas sehingga proses peroksidasi lipid dapat ditekan.

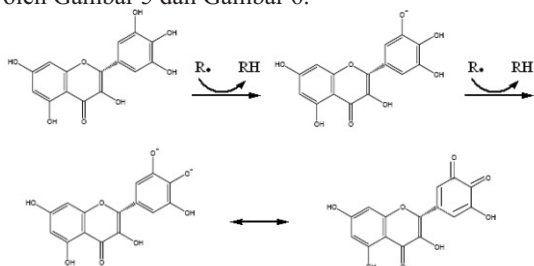


Gambar 3. Struktur dasar flavonoid dan turunannya (Vermerris and Ralph, 2006)

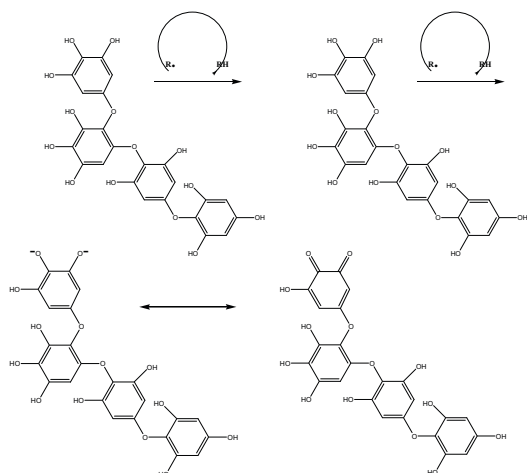


Gambar 4. Struktur floroglucinol (i) dan florotanin [tetrafulcol A (ii), tetrafuloroethol B (iii), fucodifloroethol (iv), tetrafulhalol (v), tetrafulhalol (vi), dan florofucofuroeckol (vii)] (Koivikko, 2008)

Aktivitas antioksidan polifenol (flavonoid dan florotanin) yang berfungsi sebagai *scavenger* (penangkap) radikal bebas dapat membantu menurunkan kadar radikal bebas yang tinggi di dalam jejunum usus halus yang menyebabkan kerusakan mukosa jejunum yang merupakan efek dari IBD karena induksi indometasin. Oleh karena itu, efek radikal bebas dapat dikurangi dengan pemberian fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory. Reaksi *scavenging* radikal bebas oleh senyawa flavonoid dan florotanin ditunjukkan oleh Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Reaksi *scavenging* radikal bebas (R) oleh flavonoid



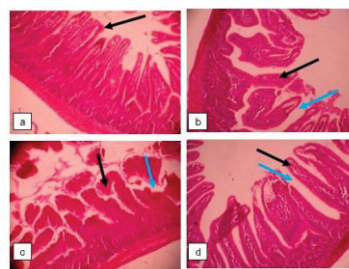
Gambar 6. Reaksi *scavenging* radikal bebas (R) oleh florotanin

Mekanisme *scavenging* radikal bebas oleh flavonoid dijelaskan melalui Gambar 5. Berdasarkan gambar tersebut, terlihat adanya abstraksi atom hidrogen oleh radikal bebas (R) menghasilkan radikal fenoksil flavonoid (FIO) yang memiliki reaktivitas sangat rendah. Radikal ini dapat diserang kembali oleh radikal bebas membentuk radikal fenoksil flavonoid kedua. Karena radikal fenoksil flavonoid memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, maka radikal ini dapat melakukan delokalisasi elektron untuk menstabilkan strukturnya, sehingga efek radikal bebas dapat dihilangkan.

Florotanin juga bertindak sebagai antioksidan karena terdapat karakteristik kimia yang memperkuat bahwa florotanin juga memiliki sistem aromatik dan gugus hidroksil (-OH) lebih dari satu dan tergolong polifenol. Gambar 6. menjelaskan bahwa terdapat reaksi abstraksi atom hidrogen florotanin oleh radikal bebas (R) membentuk radikal fenoksil florotanin (FrO). Radikal fenoksil florotanin juga dapat diserang kembali oleh radikal sehingga membentuk radikal fenoksil florotanin kedua. Karena radikal fenoksil florotanin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi (sistem aromatik), maka radikal fenoksil florotanin dapat melakukan delokalisasi elektron untuk menstabilkan strukturnya. Pada akhirnya, dibentuk produk tidak reaktif yang dapat menetralkan efek radikal bebas.

Profil Histologi Jejunum Usus Halus Tikus Kontrol, Tikus yang Dipapar Indometasin dan Hasil Terapi Ekstrak Polifenol Rumpun Laut Coklat

Gambaran histologis digunakan untuk mengetahui tingkat kerusakan dan perbaikan pada jaringan. Gambar 7 menyajikan gambar jejunum usus halus tikus kontrol negatif, tikus sakit yang dipapar indometasin 1 kali kemudian diinvestigasi 24 jam (kontrol inklusi tikus IBD), tikus IBD yang dipapar indometasin 1 kali kemudian diinkubasi selama 7 hari dan tikus terapi.



Gambar 7. Gambaran histologi jejunum usus halus tikus perlakuan dengan pewarnaan HE, perbesaran 100x

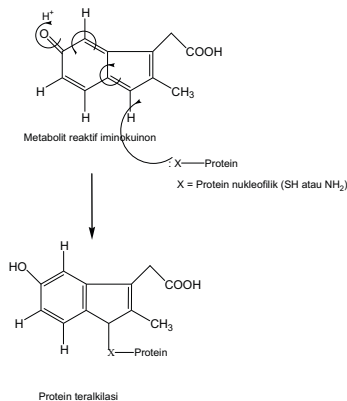
Keterangan:

- Tikus kontrol negatif
- Tikus kontrol inklusi IBD (terpapar indometasin 1 kali, kemudian diinvestigasi setelah 24 jam)
- Tikus sakit (terpapar indometasin 1 kali, kemudian diinkubasi selama 7 hari)
- Tikus terapi (terpapar indometasin 1 kali, kemudian diterapi ekstrak polifenol rumput laut coklat selama 7 hari)

➡ : vili

➡ : rongga antar vili

Tikus kontrol negatif memiliki struktur vili panjang dan rapat (mukosa dalam keadaan baik) (Gambar 7a), sedangkan pada kontrol inklusi tikus IBD terjadi kerusakan pada mukosa, yaitu vili memendek, melebar dan terdapat rongga (Gambar 7b). Gambar 7c menunjukkan kerusakan mukosa yang semakin parah pada tikus IBD karena penambahan waktu inkubasi, yaitu kondisi vili yang semakin pendek, lebar, patah-patah dan juga terdapat rongga. Hal ini disebabkan oleh aktivitas ROS sebagai radikal bebas dapat melakukan reaksi dengan molekul non-radikal, sehingga meningkatkan jumlah ROS dan menurunkan antioksidan enzimatis dalam sel sehingga memacu peroksidasi lipid (PUFA) yang dapat menambah tingkat kerusakan. Iminokuinon merupakan salah satu metabolit reaktif indometasin yang dapat berikatan kovalen dengan nukleofil seluler seperti GSH pada residu sistein (Liu *et al.*, 1995). Dengan penurunan jumlah GSH, efektivitas *scavenger* terhadap iminokuinon akan menurun. Hal ini dapat menyebabkan iminokuinon berikatan dengan protein sebagai nukleofil (-SH atau NH_2) sehingga terbentuk protein teralkilasi pada jaringan lokal (Gambar 8). Adanya protein teralkilasi menyebabkan reaksi hipersensitif tipe III (Ju and Uetrecht, 1998). Hal ini menyebabkan adanya kompleks antigen-antibodi yang dapat mengaktifkan komplemen sehingga menarik perhatian neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi selanjutnya akan memproduksi ROS sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel dan jaringan (Kumar dkk., 2007).



Gambar 8. Reaksi alkilasi protein oleh iminokuinon

Pemberian fraksi etanol dan etil asetat *Sargassum duplicatum* Bory dapat memperbaiki kerusakan mukosa jejunum usus halus (Gambar 5.20d). Kandungan antioksidan pada flavonoid dan florotanin rumput laut coklat dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas sehingga menekan pembentukan ROS dan dapat melakukan reaksi

scavenging radikal bebas. Dengan demikian, kerusakan pada jaringan jejunum dapat diperbaiki.

Kesimpulan

1. Profil MDA dan gambaran histologis jaringan jejunum usus halus tikus putih menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sebesar 149,92% serta terjadi kerusakan pada jejunum usus halus tikus putih IBD yang dipapar indometasin 15 mg/kg berat badan.
2. Pemberian terapi fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dosis 100 mg/kg berat badan menunjukkan adanya penurunan kadar MDA sebesar 54,20% pada jejunum usus halus tikus putih IBD yang dipapar indometasin.
3. Pemberian terapi fraksi etanol dan etil asetat rumput laut coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) dosis 100 mg/kg berat badan menunjukkan adanya perbaikan kerusakan jejunum usus halus tikus putih IBD yang dipapar indometasin.

Daftar Pustaka

- Achkar, J.P. 2000. Inflammatory Bowel Disease. *The American College of Gastroenterology*. www.acg.gi.org. Diakses 14 Juli 2009.
- Amic, D., D.Davidovic-Amic, D.Beslo and N.Trinajstic. 2002. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatia Chemica Acta*. 76(1): 55-61.
- Basivirreddy, J., M. Jacob, R. Prabhu, A.B. Pulimood and K.A. Balasubramanian. 2003. Indometachin-Induced Free Radical-Mediated Changes in The Intestinal Brush Border Membranes. *Biochem. Pharmacol.* 65: 683-695.
- Botutihe, D.N. 2010. Efek Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum* Bory) terhadap Profil Radikal Bebas dan Protein Kinase C Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar Benzo[A]piren. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang. Hal 49.
- Djojoningrat, D. 2001. Inflammatory Bowel Disease. Ilmu Penyakit Dalam. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. Hal 231-235.
- Economou M., and G. Pappas. 2007^a. New Global Map of Crohn's Disease: Genetic, Environmental, and Socioeconomic Correlations. *Inflamm Bowel Dis*. 14: 709-720.

- Economou M, Filis G, Tsianou Z, Alamanos J, Kogevinas A, Masalas K, Petrou A, Tsianos EV. 2007^b. Crohn's disease incidence evolution in North-Western Greece is not associated with Alteration of NOD2/CARD15 Variants. *World J Gastroenterol*. 13: 5116-5120.
- Halliwell and Susanna Chirico. 1993. Lipid Peroxidation: its Mechanism, Measurement, and Significance. *American Journal Clinical Nutrition*. 57, 715S-25S.
- Ju, C. and J. P. Uetrecht. 1998. Oxidation of a Metabolite of Indomethacin (Desmethyldeschlorobenzoylindomethacin) to Reactive Intermediates by Activated Neutrophils, Hypochlorous Acid, and The Myeloperoxidase System. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic*. 26 (7): 676-680.
- Koivikko, R. 2008. Brown Algal Phlorotannins Improving and Applying Chemical Methods. Department Of Chemistry. University of Turku. Finland.
- Lim, S.N., P.C.K. Cheung, V.E.C. Ooi and P.O. Ang. 2002. Evaluation of Antioxidative of Extracts from a Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *J. Agric. Food Chem*. 50: 3862-3866.
- Lok, K.H., Hung HG, Ng CH, Li KK, Li KF, Szeto ML. 2007. The Epidemiology and Clinical Characteristics of Crohn's Disease in the Hong Kong Chinese Population: Experiences from a Regional Hospital. *Hong Kong Med J*; 13: 436-441.
- Maity, P., S. Bindu, S. Dey, M. Goyal, A. Alam., Chinmay Pal., K. Mitra and U. Bandyopadhyay. 2008. Indomethacin, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug, Develops Gastropathy by Inducing Reactive Oxygen Species-mediated Mitochondrial Pathology and Associated Apoptosis in Gastric Mucosa. *The Journal Of Biological Chemistry*. 284 (5): 3058-3068.
- McFarland, L.V. 2008. State-of-the Art of Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease Research in 2008. *World Journal of Gastroenterology*. 14 (17): 2625-2629.
- Meenakshi, S., D.Manicka Gnanambigai, S. Tamil Mozhi, M. Arumugam and T. Balasubramanian. 2009. Total Flavonoid and in vitro Antioxidant Activity of Two Seaweed of Rameshwaram Coast. *Global Journal of Pharmacology*. 3 (2): 59-62.
- Podolsky, D.K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med*. 347 (6): 417-429.
- Samee, H., Zhen-xing Li, Hong Lin, Jamil Khalid and Yong-chao Guo. 2009. Anti-Allergic Effects of Etanol Extract from Brown Seaweeds. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10 (2): 147-153.
- Takeuchi, K., A. Tanaka, R. Ohno and A. Yokota. 2003. Role of COX Inhibition in Patogenesis of NSAID-Induced Small Intestinal Damage. *Research article*. Kyoto Pharmaceutical University. Kyoto.
- Tanaka, A., M. Matsumoto, A. Nakagiri, S. Kato and K. Takeuchi. 2002. NSAID-induced Small Intestinal Damage: Role of COX Inhibition. *Inflammopharmacology*. 10 (4-6): 313-325.
- Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D. 2003. Antimicrobial Resistance of Bacterial Pathogens Associated with Diarrheal Patiens in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 68(6): 666-10.
- Vermerris, W and R. Nicholson. 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Springer. Netherland.
- Wu, Lan. 2007. Effect of Chlorogenic Acid on Antioxidant Activity of Flos Ionicerae Extracts. *J Zhejiang Univ Sci B*. 8 (9): 673-679.
- Wu, T.Y., Chien-Chih Chen and Horng-Liang Lay. 2010. Study on the Components and Antioxidant Activity of the Bletilla Plant in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*. 18 (4): 279-289.
- Xavier, R.J. and D.K. Podolsky 2007. Unravelling The Patogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature*. 448 (7152): 427-434.
- Zahra, R. Mehranian Mehrnaz., Vahabzadeh Farzaneh and Sartavi Kohzad. 2007. Antioxidant Activity of Extract from Brown Alga, *Sargassum boveanum*. *African Journal of Biotechnology*. 6 (24): 2740-2745.
- Zhang, H-Y. 2005. Structure-Activity Relationships and Rational Design Strategies for Radical-Scavenging Antioxidants. *Current Computer-Aided Drug Design*. 1: 257-273.