

## **PENGARUH HERBAL SPRAY BERBASIS BIOAKTIF *Spirulina sp.* TERHADAP KADAR MDA PADA LUKA SAYATAN TIKUS (*Rattus norvegicus*) DM T1**

**Balqis Kurniasari, 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**

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolit yang ditandai dengan timbulnya hiperglikemia akibat gangguan sekresi insulin atau peningkatan resistensi insulin seluler terhadap insulin. Terapi herbal spray *Spirulina sp.* merupakan salah satu pengobatan alternatif penyakit DM. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh terapi herbal spray dari *Spirulina sp.* terhadap kadar Malondialdehid (MDA) pada luka sayatan tikus hasil induksi *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut. Kadar glukosa darah diukur menggunakan glukometer digital dan dinyatakan DM apabila kadar glukosa darah > 200 mg/dL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian herbal spray *Spirulina sp.* 3x sehari selama 2 minggu pada tikus hasil induksi MLD-STZ menunjukkan penurunan kadar glukosa darah ( $148,8 \pm 34,30$ ) mg/dL, dan penurunan kadar MDA rata-rata ( $0,55 \pm 0,024$ )  $\mu\text{g/mL}$ , serta dapat mempercepat penutupan luka sayatan dari 4,28 cm menjadi 0,5 cm.

**Kata kunci:** insisi, MLD-STZ, kadar MDA, *Spirulina sp.*

### **ABSTRACT**

Diabetes Mellitus (DM) is a disease with metabolism disorder signed by increasing of hyperglycemia, caused by disorder of insulin secretion or increasing of insulin resistance. Therapy of herb spray *Spirulina sp.* is an alternative treatment for DM. The objective of this research is to prove the effect of herb spray from *Spirulina sp.* to Malondialdehyde (MDA) level of skin injures rats induced by *Multiple Low Dose-Streptozotocin* (MLD-STZ) with dose of 20 mg/kg weight during 5 days successively. Blood glucose of rats was measured using digital glucometer and categorized as DM if the glucose level more than > 200 mg/dL. The results showed that treatment of herb spray *Spirulina sp.* 3 times a day for 2 weeks in rats induced MLD-STZ decreased blood glucose ( $148.8 \pm 34.30$ ) mg/dL, and decreased of MDA level in the average of ( $0.55 \pm 0.024$ )  $\mu\text{g/mL}$ , also enhance recovery of skin injured from 4.28 cm to 0.5 cm.

**Key words :** incision, MLD-STZ, value of MDA, *Spirulina sp.*

### **PENDAHULUAN**

Diabetes melitus (DM) adalah penyakit metabolit yang ditandai dengan timbulnya hiperglikemia akibat gangguan sekresi insulin, dan atau peningkatan resistensi insulin seluler terhadap insulin [1]. DM terbagi menjadi 2 tipe, yaitu DM tipe 1 (DM T1) dan DM tipe 2 (DM T2). DM T1 adalah diabetes yang terjadi ketika sel- $\beta$  pankreas tidak dapat atau kurang mampu memproduksi insulin, sedangkan DM T2 pankreas masih bisa menghasilkan insulin tetapi terjadi resistensi terhadap insulin di dalam tubuh. Peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) diakibatkan oleh penurunan produksi insulin di dalam tubuh oleh sel- $\beta$  pankreas akibat adanya kerusakan pada pancreas [2]. Hiperglikemia akan menginduksi respon

imun inflamasi dan stress oksidatif, serta kenaikan jumlah radikal bebas. Stress oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan yang dihasilkan dalam tubuh, sehingga terjadi kerusakan membran sel yang ditandai dengan peningkatan kadar Malondialdehid (MDA) dan penurunan kadar antioksidan tubuh [3]. Glukosa darah yang tinggi dapat menurunkan fungsi kekebalan tubuh dalam menghadapi masuknya virus atau kuman sehingga penderita DM mudah terkena infeksi. Kadar glukosa yang tinggi juga merusak sistem saraf sehingga mengurangi kepekaan pasien terhadap adanya infeksi. Hilangnya kepekaan pasien terhadap adanya infeksi disebut neuropati diabetik [4].

Pada penelitian ini, pengobatan alternatif dilakukan dengan herbal spray berbahan dasar ekstrak *Spirulina sp.* Penggunaan herbal spray cukup dengan menyemprotkan pada bagian luka sayatan penderita diabetes. Herbal spray bekerja dari luar maupun dalam tubuh, dimana cairan hasil semprotan herbal spray akan masuk ke dalam tubuh melalui luka dan dibawa dalam peredaran darah. Penutupan luka dikarenakan banyaknya kandungan antioksidan pada ekstrak *Spirulina sp.* yang menangkap radikal bebas sebagai *nodus* infeksi dari luka akibat sayatan.

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan dan Alat**

Bahan yang digunakan adalah Streptozotocin (STZ), akuades, NaCl fisiologis, PBS, PBS pH 7,4, PFA 4%, HCl (37%(w/w) BJ=1,19 g/cm<sup>3</sup>), TCA 4%, larutan baku MDA (BJ=0,997 g/L), Natrium-Thiobarbituric, buffer sitrat pH 4,5, Kloroform (CHCl<sub>3</sub>) (BJ=1,483 g/cm<sup>3</sup>), asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 M, amonia (NH<sub>3</sub>) 0,05 M, pereaksi Wagner, *ringer solution* NaCl fisiologis 0,9 %, alkohol 70%.

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, gunting, pinset, *sentrifuge* (Hettich EBA III), plastik bedah, bak pemeliharaan hewan coba 20 x 30 x 40 cm, tabung mikrotube *ependorf* 1,5 mL dan rak tabung, mikropipet (20 - 1000 µL), neraca analitik (Mettler Lotedo AL 204), *vortex* (Guo Huq Touch Mayer), sarung tangan, *glucostick* one touch ultra dan glukometer digital (*One Touch Lifescan*), kertas saring, spuit (*Terumo syringe*) 1 mL dan 3 mL, botol sampel, oven, botol spray 60 mL, masker, tisu, tip (putih, kuning, dan biru), aluminium foil, plastik *Wrap*, spidol marker, penangas listrik, wadah plastik tertutup, *scalpel* dan alat bedah, polipropilen 15 mL, pisau mitokrom *Braun* no.21, plastik cetik, kertas label, termometer 0-100 °C, cawan petri, mortar dan *pestle*, Spektrofotometri UV-Vis, *freezer* suhu

-20 °C, kulkas 4°C, mikropipet, *timer*, *magnetic stirrer*, *autoclave* (Electraozone sterilizer), pHmeter (Hanna Instruments HI 2211).

## **Prosedur**

### **Penyiapan hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar**

Pada percobaan ini 15 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan sehat, umur 2 bulan, beratnya 81-128 gram, diadaptasikan 1 minggu di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Jurusan Biologi, FMIPA-UB. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok besar antara lain: (A) kontrol negatif, (B) kontrol positif, dan (C) mendapatkan perlakuan terapi 3x sehari (volume pemberian terapi = 34 µL per semprot) di bagian punggung luka akibat insisi. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus.

### **Perlakuan luka sayatan (Insisi) pada hewan coba**

Kapas disusun dalam wadah tertutup dan dituangkan kloroform (CHCl<sub>3</sub>) secukupnya. Semua kelompok hewan coba dimasukkan dalam wadah yang berisi kapas tersebut secara bergantian. Setelah hewan coba dalam kondisi tidak sadar, hewan coba dikeluarkan satu persatu dan disayat pada bagian punggung menggunakan pisau mitokrom kurang lebih 3-5 cm secara searah. Darah pada insisi dibersihkan dari punggung hewan coba. Hewan coba dikembalikan ke kandang sesuai kelompok.

### **Pengambilan kulit luka sayatan**

Pengambilan kulit dan organ pankreas hewan coba dilakukan pada hari ke-14 setelah dilakukan insisi dan terapi. Hewan coba dibunuh dengan cara dislokasi leher, diletakkan pada nampan bedah, dan ditata pada posisi ventral di atas. Bagian kulit luka sayatan diambil dengan cara menghilangkan bulu-bulu hewan coba dan memisahkan kulit dengan dagingnya. Kulit dicuci dengan NaCl fisiologis dan dipotong 2 bagian, sebagian besar direndam dalam *Phospat Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 dan disimpan pada suhu 4°C. Sisanya direndam dalam larutan Paraformaldehid (PFA) 4%, disimpan dalam suhu ruang.

### **Pengukuran kadar Malondialdehid (MDA)**

#### **Pembuatan kurva standar Malondialdehid (MDA)**

Larutan standar Malondialdehid (MDA) dengan variasi konsentrasi 0,1,2,3,4,5,6,7 dan 8 µg/mL diambil masing-masing 100 µL, dimasukkan dalam tabung mikrotube yang berbeda. Kemudian ditambahkan 550 µL akuades, 100 µL TCA 4%, 250 µL HCl 1 N dan 100 µL Natrium-Thiobarbiturat 1% pada masing-masing mikrotube. Larutan campuran tersebut dihomogenkan dengan *vortex*. Mikrotube ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi

dalam penangas air pada posisi mengapung dengan suhu 100°C selama 30 menit. Larutan standar didinginkan pada suhu ruang. Selanjutnya larutan MDA dengan konsentrasi 4 µg/mL diukur absorbansinya pada *range* panjang gelombang 500-570 nm untuk menentukan λ<sub>max</sub> MDA. Dari hasil λ<sub>max</sub> tersebut, dapat dibuat kurva standar MDA dan didapatkan nilai absorbansi pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8 µg/mL).

### **Pengukuran kadar MDA menggunakan uji Thiobarbituric Acid (TBA)**

Kulit bagian luka sayatan sebanyak 0,2 gram dipotong kecil-kecil lalu digerus dalam mortar dingin yang diletakkan di atas balok es dan ditambahkan 1 mL NaCl fisiologis. Homogenat dipindah ke dalam tabung mikrotube kecil dan disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit dan diambil supernatannya. Supernatan diambil 100 µL, ditambah 550 µL akuades, 100 µL TCA 4%, 250 µL HCl 1N, dan 100 µL Natrium-Thiobarbiturat 1%. Larutan campuran tersebut dihomogenkan dengan *vortex*. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisah dan dipindahkan pada tabung mikrotube baru. Mikrotube ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam penangas air suhu 100°C. Sampel diukur absorbansinya pada λ<sub>max</sub> (530 nm) dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Kadar glukosa darah tikus hasil induksi MLD-STZ dan terapi ekstrak *Spirulina sp.***

Kadar glukosa darah rata-rata pada kelompok tikus terapi mengalami penurunan yaitu 148,8 ± 34,3 mg/dL dari kadar glukosa setelah diinduksi MLD-STZ yaitu 434 ± 41,75 mg/dL. Adapun data kadar glukosa darah rata-rata ditunjukkan pada Tabel 2, serta berdasarkan hasil analisis statistika menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata (p<0,01) antara 3 perlakuan.

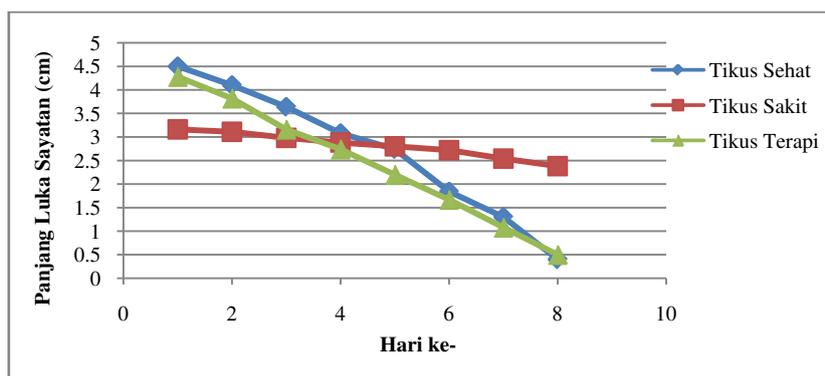
**Tabel 2.** Kadar glukosa darah rata-rata tikus sehat, tikus hasil induksi MLD-STZ dan tikus hasil terapi herbal spray *Spirulina sp.*

| <b>Perlakuan</b>   | <b>Rata-rata Glukosa Darah (mg/dL)</b> |
|--------------------|--|
| T. Sehat (A)       | 96,2 ± 3,77                            |
| T. Sakit DM T1 (B) | 346,4 ± 40,61                          |
| T. Terapi (C)      | 148,8 ± 34,30                          |

### **Pengukuran luka sayatan pada terapi herbal spray *Spirulina sp.***

Panjang luka rata-rata pada tikus sehat, tikus sakit terpapar MLD-STZ, dan tikus terapi dari hari ke-0 sampai hari ke-14 menunjukkan perbedaan signifikan yaitu berkisar dari 4,5 –

0,4 cm; 3,16-2,38 cm; dan 4,28-0,5 cm (Gambar 2). Efek paparan MLD-STZ menyebabkan kadar glukosa darah menjadi tinggi. Sehingga proses penutupan luka pada tikus sakit tidak maksimal. Sedangkan pada tikus terapi, penutupan luka sedikit lebih cepat daripada tikus sakit dikarenakan sel- $\beta$  pankreas yang mulai mengalami perbaikan sehingga dapat memproduksi insulin kembali dan menyebabkan kadar glukosa darah kembali distabilkan mendekati normal. Selain itu, proses inflamasi pada tikus terapi telah menurun sehingga tahapan (fase) penyembuhan luka dapat terjadi dengan cepat.



**Gambar 2.** Grafik perbandingan panjang luka sayatan pada tikus sehat, tikus hasil induksi MLD-STZ dan tikus hasil terapi herbal spray *Spirulina sp.*

### Kadar Malondialdehid (MDA) pada kulit luka sayatan tikus DM T1

Penurunan kadar MDA pada tikus yang telah diterapi herbal spray *Spirulina sp.* sebesar 32,73 %. Berdasarkan hasil statistik ditunjukkan bahwa terapi herbal spray *Spirulina sp.* berbeda secara signifikan ( $p < 0,01$ ) dengan tikus sakit DM T1. Penurunan kadar MDA disebabkan oleh terjadinya penghambatan peroksidasi lipid oleh herbal spray *Spirulina sp.* yang mampu menangkap radikal bebas.

**Tabel 3.** Tikus sehat, tikus hasil induksi MLD-STZ dan tikus hasil terapi herbal spray *Spirulina sp.*

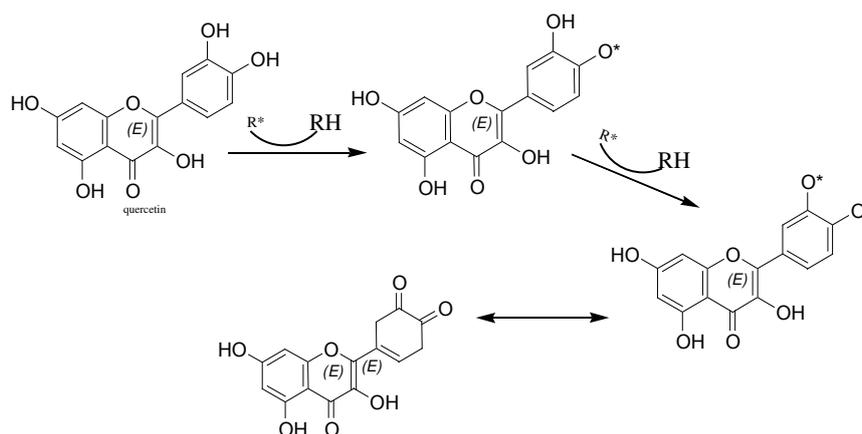
| Perlakuan          | Rata-rata Kadar MDA ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Penurunan Kerusakan Oksidatif (%) |
|--------------------|--|-----------------------------------|
| T. Sehat (A)       | 0,43 $\pm$ 0,005                         | 0                                 |
| T. Sakit DM T1 (B) | 0,73 $\pm$ 0,038                         | 69,77                             |
| T. Terapi (C)      | 0,55 $\pm$ 0,024                         | 32,73                             |

STZ sebagai agen diabetonik dapat memicu peningkatan produksi radikal bebas berlebih dan menyebabkan stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan keadaan dimana jumlah oksidan (radikal bebas) dan antioksidan tidak seimbang di dalam tubuh. Radikal bebas bersifat reaktif, dapat menimbulkan perubahan biokimiawi dan merusak komponen biomolekul, seperti lipid.

Serangan radikal lipid pada komponen lipid disebut reaksi peroksidasi lipid. Pada reaksi peroksidasi lipid terjadi pemutusan rantai asam lemak menjadi senyawa-senyawa toksik antara lain adalah Malondialdehid (MDA).

Menurut Kochhar dan Rossell (1990) mendefinisikan antioksidan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid [5]. Antioksidan merupakan senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya dan dapat memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas. Kemampuan flavonoid sebagai antioksidan disebabkan karena flavonoid bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas. Adanya gugus hidroksi 3',4' (orto-dihidroksi) pada cincin flavonoid B, ikatan rangkap 2,3 yang terkonjugasi dengan gugus 4-okso (gugus 1,4-piron) pada cincin flavonoid C dan gugus hidroksil (5-OH) pada cincin flavonoid A [6].

Mekanisme penghambatan peroksidasi lipid oleh herbal spray *Spirulina sp.* melibatkan senyawa yang mampu menangkal radikal bebas. Salah satu senyawa yang dapat menghambat peroksidasi lipid untuk menangkap radikal bebas adalah senyawa polifenol, terutama senyawa flavonoid. Pada ekstrak *Spirulina sp.*, salah satu flavonoid yang telah teridentifikasi adalah kuersetin yang merupakan antioksidan yang baik dalam menangkap radikal bebas. Reaksi *scavenging* (penangkapan) radikal bebas oleh senyawa kuersetin diperlihatkan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Reaksi Penangkapan Kuersetin sebagai *Radical Scavenger*

Kuersetin akan mendonasikan sebuah atom hidrogen (H) dari gugus hidroksil (OH) fenolik saat bereaksi dengan radikal bebas (R\*). Reaksi ini akan menghasilkan suatu radikal fenoksil kuersetin (KO\*) yang kurang reaktif karena (KO\*) dapat mengalami perubahan

struktur resonansi dengan redistribusi elektron yang tidak berpasangan dalam struktur ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatikanya. KO\* akan bereaksi lebih lanjut membentuk senyawa yang tidak reaktif, yang kemungkinan melalui reaksi terminasi radikal-radikal. Melalui reaksi tersebut, kuersetin dapat menghambat peroksidasi lipid yang diinisiasi oleh radikal bebas.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian herbal spray berbasis bioaktif *Spirulina sp.* memberikan pengaruh terhadap perubahan luka sayatan pada tikus DM T1 yang telah diinduksi dengan MLD-STZ ditunjukkan dengan semakin berkurangnya panjang luka akibat terjadi penutupan luka, dan mampu menurunkan kadar MDA pada luka sayatan tikus DM T1 sebesar 32,73%.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Dods R.F., 1996, *Diabetes Mellitus. In Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation, 3rd Edition*, Mosby Inc, USA.
2. Karen, G.B. dan Iris R., 2010, *Imunologi Dasar*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
3. Brennan, F.M. dan B. McInnes, 2008, *Evidence that Cytokines Play a Role in Rheumatoid Arthritis*, vol.118(11):3537-3545, The Journal of Clinical Investigation.
4. Tandra, H., 2008, *Segala Sesuatu yang Harus Anda Ketahui tentang DIABETES*, hal:66-67, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
5. Kochhar, S.P and J.B. Rossell, 1990, *Detection, estimation and evaluation of anti oxidants in food systems*, Di dalam: Hudson, B.J.F (Ed), *Food Antioxidants*. Elsevier Applied Science, New York, Pp: 19-64
6. D. Amic, D. Davidovic-Amic, D. Beslo, N. Trinajstic, 2002, *Structure-Radical Scavenging Activity Relationships Of Flavonoids*, Croatia Chemica Acta 76 (1), pp. 55-61.