

## Uji Toksisitas untuk Evaluasi Keamanan Pangan Rumput Laut Edibel Baru, *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp.

### Toxicity Test for Evaluating Food Safety of New Edible Seaweeds, *Enteromorpha* sp. and *Laurencia* sp.

Alim Isnansetyo\*, Indah Istiqomah, Retno Widaningroem, Triyanto, Rina Anggraeni Safia, Riesa Yosita & Senny Helmiati

Departemen Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*Corresponding author, email: isnansetyo@ugm.ac.id

Submitted 20 March 2018 Revised 31 October 2018 Accepted 01 June 2019

**Abstrak** Rumput laut merupakan bahan pangan dan sumber bahan bioaktif yang sangat berguna dalam industri makanan dan farmasi. Screening telah dilakukan untuk mendapatkan rumput laut yang tidak toksik dengan metode *Brine shrimp lethality test* (BLT). Dalam paper ini dipaparkan uji BLT terhadap dua jenis rumput laut terpilih dan dilanjutkan uji sitotoksitas. Rumput laut yang digunakan adalah *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. yang dikoleksi dari pantai selatan Gunungkidul. Uji sitotoksitas ini dilakukan dengan sel Vero (sel normal) dan sel HeLa (sel kanker). Sel HeLa dan Vero dikultur dalam medium M119 dengan penambahan 10% FBS dan diinkubasi pada 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub> hingga *confluent*. Sel dipanen dan dikultur dalam 96 microplate dengan kepadatan awal 2x10<sup>4</sup> sel/100 ml/well. Penambahan ekstrak hingga konsentrasi akhir 10.000 µg/ml dilakukan 24 jam setelah inkubasi. Inkubasi dilanjutkan selama 24 jam. Kemudian proliferasi sel diamati dengan metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dua jenis rumput laut yang diekstrak dengan air tersebut tidak toksik pada uji BLT. Uji sitotoksitas ekstrak yang direbus maupun tanpa perebusan tidak menunjukkan aktivitas sitotoksitas terhadap sel HeLa dan Vero. Tidak ditemukan penurunan proliferasi sel yang konsisten dan signifikan walaupun pada konsentrasi ekstrak yang sangat tinggi. *Concentration-dependent cell proliferation* juga tidak ditemukan. Hal ini menunjukkan bahwa rumput laut *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. tidak mempunyai aktivitas sitotoksik dan dapat dikonsumsi oleh manusia. Secara keseluruhan hasil penelitian ini memberikan petunjuk bahwa dua rumput laut yang diteliti dapat dikembangkan menjadi pangan baru bagi manusia.

**Kata Kunci** *Brine shrimp lethality test*; *Enteromorpha* sp.; keselamatan pangan; *Laurencia* sp.; uji toksisitas

**Abstract** Seaweeds are potential foodstuff and source of bioactive substances that are very useful in the food and pharmaceutical industries. The objective of this study was to evaluate toxicity of aqueous extracts of seaweeds by Brine shrimp lethality test (BLT) and cytotoxicity test. The seaweeds used in this study were *Enteromorpha* sp. and *Laurencia* sp. collected from the Gunungkidul coastal line. The cytotoxicity test was performed against a normal cells line of Vero cells and a cancer cells line of HeLa cells. The cells lines were cultured in M119 medium with addition of 10% FBS and incubated at 37°C in CO<sub>2</sub> incubator until confluent. Cells were harvested and cultured in 96 microplate with an initial density of 2x10<sup>4</sup> cells / 100 ml / well. The cells lines were treated with seaweed extracts at 24 hours after incubation. After additional 24 h incubation, the cell proliferation was observed by MTT method (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5- diphenyltetrazolium bromide. The results showed that the two aqueous extract were not toxic in the BLT test, and did not exhibited any cytotoxicity activity against HeLa and Vero cells lines. Concentration-dependent cell proliferation was also not found. This results indicated that *Enteromorpha* sp. and *Laurencia* sp. extracts were not cytotoxic and might be consumed safely. These overall result suggested that the two seaweeds might be developed to be a new foodstuff for humans.

**Keywords** Brine shrimp lethality test; *Enteromorpha* sp.; food safety; *Laurencia* sp.; toxicity test

#### PENGANTAR

Rumput laut merupakan salah satu komoditas perikanan yang memiliki potensi pasar yang besar, khususnya di Asia. Disamping sebagai bahan baku pembuatan tepung agar dan carrageenan yang berguna dalam industri makanan, rumput laut juga berpotensi sebagai sumber bahan alam seperti antioksidan maupun senyawa lain yang berguna dalam industri farmasi maupun kosmetik (Cofrades *et al.*,

2010). Rumput laut terbukti memiliki manfaat kesehatan, diantaranya meningkatkan sistem imun (Bahar *et al.*, 2016) dan mencegah penyakit kronis, seperti kanker, serangan jantung, diabetes dan sebagainya (Brown *et al.*, 2014). Rumput laut juga dikonsumsi sebagai sayuran untuk di masak maupun sebagai salad karena memiliki rasa yang enak dan kandungan gizi yang tinggi. Akan tetapi rumput laut belum banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia.

Setidaknya terdapat 40 jenis rumput laut yang telah dikonsumsi oleh manusia di dunia. Beberapa jenis baru diantaranya *Alaria esculenta*, *Ecklonia maxima*, *Fucus* sp., *Eisenia bicyclis*, *Ascophyllum nodosum*, *Hizikia fusiforme*, *Porphyra* spp., *Postelsia palmaeformis*, *Undaria pinnatifida* (Teas et al., 2004), *Enteromorpha prolifera* (Hiqashi-Okaj et al., 1999), *Gelidium amansi*, *Gloiopeltis tenax*, *Grateloupia elliptica*, *Laminaria* spp., *Sargassum fulvellum* (Yan et al., 1999), *Saccorhiza polyschides* (Sánchez-Machado et al., 2004) dan *Ulva* spp. (Fleurence et al., 1995).

Sementara itu, isu tentang akumulasi senyawa beracun yang terserap oleh rumput laut dari lingkungan hidupnya mulai banyak dilaporkan (Bouga & Combet, 2015). Hal ini menjadi perhatian akan pentingnya jaminan kondisi lingkungan atau kualitas air dimana rumput laut tumbuh atau dipelihara. Hanya rumput laut yang hidup di lingkungan yang tidak tercemar atau bebas polusi yang layak untuk dikonsumsi. Kerrigen & Suckling (2018) melaporkan bahwa produktivitas budidaya rumput laut yang tinggi dapat dicapai melalui sistem *integrated multitrophic aquaculture* (IMTA). Hal ini menunjukkan bahwa budidaya rumput laut memiliki prospek yang baik untuk terus dikembangkan.

Pantai Gunungkidul merupakan wilayah berkapur yang belum mengalami pencemaran dan memiliki biodiversitas rumput laut yang melimpah. Pemanfaatan rumput laut di wilayah tersebut sangat terbatas baik dari segi jumlah spesiesnya maupun jenis pemanfaatannya. Isnansetyo et al. (2005) menemukan 32 jenis rumput laut di pantai Gunungkidul. Hal ini menunjukkan bahwa rumput laut dari pantai Gunungkidul sangat potensial untuk dikembangkan sebagai bahan pangan baru. Hal ini muncul sebagai salah satu konsekuensi adanya pencemaran global. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi toksisitas rumput laut yang belum biasa dikonsumsi yaitu *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. untuk mengetahui kelayakan dan keselamatan pangan rumput laut tersebut sebagai sumber pangan baru.

## BAHAN DAN METODE

### Koleksi dan Ekstraksi Rumput Laut

*Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. dikoleksi dari wilayah intertidal Pantai Gunung Kidul. Masing-masing jenis rumput laut tersebut dikumpulkan, dimasukkan dalam kantong plastik, dimasukkan dalam *cool box* dan dibawa ke laboratorium. Masing-masing sampel dicuci dengan air tawar kemudian diekstrak menggunakan aquadest dengan perbandingan 25 g rumput laut dan 75 mL aquadest. Ekstraksi dilakukan menggunakan blender selama 10 menit, kemudian dibagi menjadi dua bagian. Satu bagian langsung disentrifus pada 3000 g selama 10 menit, sementara satu bagian yang lain direbus terlebih dahulu selama 15 menit kemudian disentrifus. Supernatan diambil dan disimpan dalam freezer hingga digunakan untuk uji sitotoksitas. Sebelum dilakukan uji sitotoksitas, masing-masing sampel dipekatkan dengan *freeze dryer* dan diukur konsentrasinya dengan cara mengambil cuplikan untuk dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C.

### Penetasan Artemia

Penetasan artemia dilakukan di wadah berbentuk

corong yang berisi air laut 30 ppt. Di bagian dasar corong diletakkan aerasi supaya kista artemia terus melayang di badan air dan tidak mengendap di dasar. Setelah penetasan selama 24 jam, nauplii *Artemia* digunakan pada uji *Brine shrimp lethality test*. *Artemia* dapat bertahan hidup 3-5 hari pasca menetas tanpa diberi pakan.

### Uji Toksisitas Rumput Laut dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Uji toksisitas ekstrak rumput laut dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST). Metode ini merupakan salah satu metode uji toksisitas bahan alam dengan menggunakan nauplii artemia. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian nauplii. Uji BST ini dilakukan menggunakan petridisk 10 mL dengan konsentrasi ekstrak 1000 µg/mL. Nauplii artemia sebanyak 10 ekor dimasukkan dalam petridisk yang telah berisi larutan ekstrak rumput laut dengan salinitas 25 ppt. Masing-masing sample diuji toksisitasnya dengan ulangan sebanyak 3 kali.

### Uji Sitotoksitas

Sel yang digunakan dalam uji ini adalah sel Vero dan sel HeLa (sel kanker). Sel HeLa dan vero dikultur pada medium M199 (Sigma) dengan penambahan 10% FBS (Sigma) dan antibiotik Panstrep (Gibco) (2 mL) dan Fungison (Gibco) (1 mL). Sel-sel tersebut dikultur pada suhu 37°C dalam incubator CO<sub>2</sub> hingga confluent.

Setelah inkubasi medium diganti dengan medium baru, kemudian sel dipanen dengan cara ditetesi tripsin dan dibiarkan selama 10 menit agar sel HeLa terlepas dari dasar botol kultur. Sel HeLa dan sel Vero yang dipanen kemudian dikultur kembali pada *96-well microplate* dengan kepadatan awal 2x10<sup>4</sup> sel/100 ml/well. Sel Vero tumbuh lebih cepat dibanding sel HeLa. Sel vero mendekati *confluent* pada masa inkubasi 24 jam sementara sel HeLa mendekati *confluent* pada masa inkubasi 48 jam. Penambahan ekstrak rumput laut dilakukan pada waktu 24 jam pasca kultur di mikroplate agar kultur sel Vero tidak tertalu padat.

Penambahan ekstrak rumput laut diawali dengan menuang medium kultur sel dan mengganti dengan medium yang baru yang sudah ditambahkan ekstrak rumput laut dengan konsentrasi akhir 10.000; 8.000; 4.000; 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 16,125 dan 8,626 µg/ml. Kontrol positif dan negatif selalu dilakukan pada tiap plate uji. Kontrol negatif adalah kultur sel yang hanya ditambah aquadest steril sebagai pelarut ekstrak rumput laut. Kontrol positif adalah sumuran yang hanya berisi medium kultur sel. Treatment ekstrak rumput laut dilakukan selama 24 jam.

Pertumbuhan sel diamati dengan metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide [Sigma]) assay (Isnansetyo & Kamei, 2003). Sebanyak 10 ml medium kultur M199 ditambah dengan 1 mL MTT, dicampur merata. Setelah campuran medium MTT disiapkan, maka kultur sel HeLa pada mikroplate dituang agar sisa medium dan sel yang mati (tidak melekat pada plate) terbuang. Selanjutnya masing-masing sumuran diisi oleh campuran MTT sebanyak 100 µl/well dan diinkubasi selama 4 jam pada incubator CO<sub>2</sub> bersuhu 37°C. Stop solution ditambahkan kedalam masing-masing

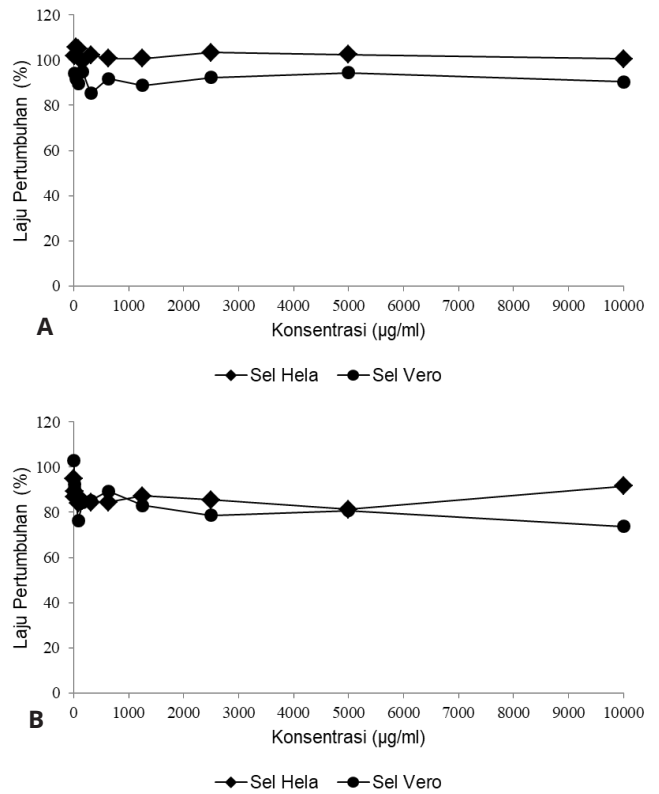
sumuran dengan dosis 100 µl/well kemudian plate tersebut disimpan pada suhu ruang 12 jam. Pertumbuhan dideteksi dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 550 nm. Tingkat pertumbuhan sel yang dipapar dengan ekstrak rumput laut dibandingkan dengan kontrol negatif, yang dinyatakan dalam persen (%).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

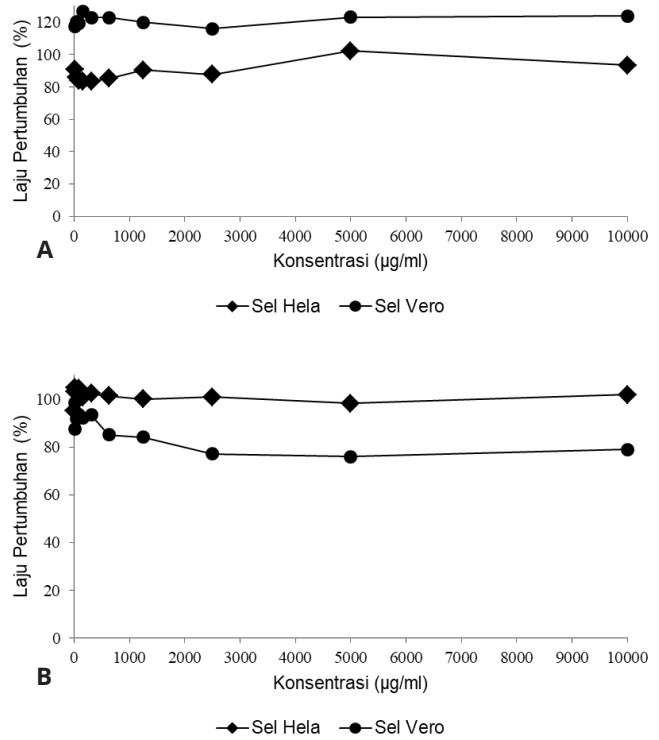
*Enteromorpha* sp. mengandung polisakarida dalam persentase yang tinggi (Zhao, 2014) sehingga menjadi sumber pangan potensial. Hasil uji toksisitas menggunakan metode *Brain Shrimp Letality Test* menunjukkan bahwa sebagian ekstrak air dari *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. hingga konsentrasi 1000 µg/mL tidak toksik terhadap *Artemia* sp. *Artemia* yang dipapar dengan ekstrak rumput laut tersebut mempunyai *survival rate* 100%. Hal ini menunjukkan bahwa rumput laut tersebut mempunyai peluang untuk dikembangkan sebagai bahan pangan baru. Akan tetapi uji toksisitas ini perlu dilanjutkan hingga aras sel untuk menjamin keamanan pangan. Oleh karena itu dilanjutkan uji sitotoksitas.

Uji sitotoksitas ekstrak *Enteromorpha* sp. dengan menggunakan sel HeLa (sel Kanker) menunjukkan laju pertumbuhan 81,3-94,9% untuk sampel yang direbus dan 99,5-105,6% untuk sampel tanpa perebusan. Sampel yang sama menunjukkan laju pertumbuhan 73,8-103,0% dan 88,2-93,0% pada sel Vero. Sedangkan sel HeLa yang dipapar dengan ekstrak *Laurencia* sp. yang direbus dan tanpa perebusan masing-masing 95,1-104,8% dan 83,4-102,3%. Sel Vero yang dipapar dengan ekstrak yang sama mempunyai laju pertumbuhan 75,9-104,5% dan 116,3-126,6%. Persentase pertumbuhan tersebut merupakan pertumbuhan relatif terhadap kontrol yang tidak dipapar ekstrak rumput laut. Walaupun dihasilkan pertumbuhan relatif yang bervariasi, akan tetapi tidak diperoleh penurunan pertumbuhan yang konsisten dan signifikan terhadap peningkatan konsentrasi ekstrak (Gambar 1 dan 2). sehingga tidak diperoleh *dose-dependent cells proliferation* pada sel HeLa dan sel Vero yang dipapar ekstrak *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak air *Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. tidak mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa dan sel Vero.

Sebagai perbandingan, Rocha et al. (2007) melaporkan bahwa ekstrak kasar dichloromethane:chloroform dari *Styopodium zonale* menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker melanoma manusia (*human melanoma cancer cell*). Ekstrak aseton dari *Lobophora variegata* dan *Caulerpa racemosa* juga menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel tersebut. Akan tetapi, ekstrak aseton dari *Spatoglossum schroederi* tidak menunjukkan aktivitas. Penelitian ini menunjukkan bahwa selain jenis rumput laut yang digunakan, solvent yang digunakan dalam ekstraksi juga memberikan pengaruh terhadap aktivitas ekstrak. Stevan et al. (2001) menggunakan sel HeLa untuk evaluasi sitotoksitas polisakarida dari beberapa rumput laut. Fucoidan dari alga coklat menunjukkan aktivitas penghambatan proliferasi sel HeLa.



Gambar 1. Sitotoksitas Esktrak Rumput Laut *Enteromorpha* sp. dengan perebusan (A) dan tanpa perebusan (B) pada Konsentrasi hingga 10.000 µg/ml terhadap sel HeLa dan Vero.



Gambar 2. Sitotoksitas Esktrak Rumput Laut *Laurencia* sp. dengan perebusan (A) dan tanpa perebusan (B) pada Konsentrasi hingga 10.000 µg/ml terhadap sel HeLa dan Vero.

Ekstrak air panas dari *S. hemiphyllum* menunjukkan sitotoksik terhadap sel Vero. Akan tetapi ekstrak yang sejenis dari *D. dichotoma* and *P. australis* mempunyai toksisitas yang moderat terhadap sel Vero dengan  $CC_{50}$  values (cytotoxic concentration) masing-masing 925 and 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Wang *et al.*, 2008). Dari perbandingan tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rumput laut yang diuji dalam penelitian ini semuanya tidak sitotoksik. Dalam konsentrasi yang sangat tinggi (10.000  $\mu\text{g/ml}$ ) masih menghasilkan proliferasi sel yang tinggi dan tidak dapat mencapai  $LC_{50}$ .

Hasil penelitian ini memberikan gambaran yang jelas bahwa dua jenis rumput laut yang diuji sitotoksitasnya adalah aman untuk dikonsumsi manusia dan lebih lanjut dapat dikembangkan menjadi produk pangan untuk meningkatkan gizi masyarakat. Penelitian selanjutnya adalah mengevaluasi kandungan gizi dan uji coba pemberian secara oral pada mencit untuk mengetahui perubahan fisiologis dan toksisitasnya.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

*Enteromorpha* sp. dan *Laurencia* sp. yang diuji tingkat sitotoksitasnya adalah aman untuk dikonsumsi manusia dan dapat dijadikan sebagai alternatif bahan pangan untuk peningkatan gizi masyarakat.

### Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai kandungan gizi dan uji lanjut terhadap hewan uji yang berbeda untuk mengetahui perubahan fisiologis maupun toksisitasnya perlu dilaksanakan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada melalui program Hibah Penelitian Fakultas Pertanian UGM.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bahar, B., J.V. O'Doherty., T.J. Smyth & T. Sweeney. 2016. A comparison of the effects of an *Ascophyllum nodosum* ethanol extract and its molecular weight fractions on the inflammatory immune gene expression in-vitro and ex-vivo. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 37: 276-285
- Bouga, M & E. Combet. 2015. Emergence of seaweed and seaweed-containing foods in the UK: Focus on Labelling, Iodine Content, Toxicity and Nutrition. *Foods* 4 (2): 240-253
- Brown, E.M, P.J. Allsopp., P.J. Magee., C.I.R Gill., S. Nitecki., C.R. Strain & E.M. McSorley. 2014. Seaweed and human health. *Nutr. Rev* 72: 205-2016
- Cofrades, S., L\_Lopez., C. Bravo., S. R-Capillas., M.T. Bastida., F.Larrea & J-Colmenero. 2010. Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Science and Technology International*. DOI: 10.1177/1082013210367049

Fleurence, J., C. Le Coeur., S. Mabeau., M. Maurice & A. Landrein. 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of Applied Phycology* 7: 577-582.

Hiqashi-Okaja, K., S. Otanib & Y. Okai. 1999. Potent suppressive effect of a Japanese edible seaweed, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori) on initiation and promotion phases of chemically induced mouse skin tumorigenesis. 140: 21-25.

Isnansetyo A., Trijoko & E.P. Setyowati. 2005. Skrining, isolasi dan pemurnian senyawa antibakteri dan anti-jamur dari rumput laut dan sponge. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing XIII/1 Perguruan Tinggi. LPPM UGM. 32 p.

Isnansetyo, A & Y. Kamei. 2003. MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov., against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 480-488.

Kerrigen, D & C.C. Suckling. 2018. A meta-analysis of integrated multitrophic aquaculture: extractive species growth is most successful within close proximity to open-water fish farms. *Review in Aquaculture* 10 (3): 560-52

Rocha, F.D., A.R. Soares., P. J. Houghton., R.C. Pereira., M.A.C. Kaplan & V.L. Teixeira. 2007. Potential Cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. *Phytother. Res.* 21: 170-175.

Sánchez-Machado, D.I., J. López-Cervantes., J. López-Hernández & P. Paseiro-Losada.. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry.* 85: 439-444.

Stevan, F.R., M.B. Oliveira., D.F. Bucchi., Nosedá., M. Iacomini & M.E. Duarte. 2001. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology.* 33 (4): 477-84.

Teas, J., S. Pino., A. Critchley & L. E. Braverman. 2004. Variability of Iodine Content in Common Edible Seaweeds. *Thyroid.* 14: 836-841.

Wang, H., E. V. Ooi & P.O. Ang Jr. 2008. Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B.* 9 (12): 969-976.

Yan, X., Y. Chuda., M. Suzuki & T. Nagata. 1999. Fucosantins as a major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 605-607.

Zhao, C. Purification and composition analysis of polysaccharide from edible seaweed *Enteromorpha prolifera* and polysaccharides depolymerized enzymes from microorganisms. *Res J Biotechnol* 9 (1): 30-36.