

## Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Mikroalga Laut *Chlorella Vulgaris* Dengan Metode Stabilitas Sel Darah Merah Manusia

### *Antiinflammatory Activity From Marine Microalgae Chlorella vulgaris Extract Used Human Red Blood Cells Stability Method (HRBC)*

Dewi Kurnia<sup>1\*</sup>, Nadya Pridayanti<sup>1</sup>, Lia Marliani<sup>1</sup>, Idar<sup>1</sup>, Zeily Nurochman<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Prodi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Bandung

<sup>2</sup> Kelompok Keahlian Biokimia, Departemen Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Bandung, Bandung

\*E-mail: [dewi.kurnia@bku.ac.id](mailto:dewi.kurnia@bku.ac.id)

DOI: <https://doi.org/10.26874/jkk.v2i2.34>

Received: 13 Sept 2019, Revised: 28 Oct 2019, Accepted: 5 Nov 2019, Online: 30 Nov 2019

#### Abstrak

Obat-obatan yang biasa digunakan untuk mengatasi inflamasi adalah golongan steroid dan nonsteroid yang bila digunakan dalam jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang merugikan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan n-heksana, kloroform, dan etanol 96%. Hasil pemantauan KLT menunjukkan bahwa pada ekstrak *Chlorella vulgaris* terdapat senyawa golongan flavonoid, fenol, alkaloid, dan saponin steroid. Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak dilakukan dengan metode stabilitas sel darah merah (*Human Red Blood Cells* - HRBC). Dari hasil uji aktivitas antiinflamasi menunjukkan nilai  $IC_{50}$  untuk ekstrak n-heksan; kloroform dan etanol berturut-turut sebesar 150,399; 83,852 dan 92,349 ppm dengan nilai  $IC_{50}$  standar pembanding natrium diklofenak sebesar 54,149 ppm. Ekstrak kloroform diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi yang paling aktif yaitu sebesar 83,852 ppm. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform pada mikroalga *Chlorella vulgaris* berpotensi sebagai agen antiinflamasi yang dapat dikembangkan sebagai obat antiinflamasi alternatif dari bahan alam bahari.

**Kata kunci:** antiinflamasi, *Chlorella vulgaris*, *Human Red Blood Cells* (HRBC)

#### Abstract

Medications commonly used to treat inflammation are steroids and non-steroids which, if used over a long period, can cause adverse side effects. This research was conducted to determine the anti-inflammatory activity of the *Chlorella vulgaris* microalgae extract. Extraction was carried out by multilevel maceration method using n-hexane, chloroform, and ethanol. TLC monitoring results showed that the *Chlorella vulgaris* extract contained flavonoid, phenol, alkaloid, and steroid saponin compounds. The anti-inflammatory activity test of the extract was carried out used Human Red Blood Cell (HRBC) stability method with Na-diclophenac as a comparison standard. The results showed the inhibition value of red blood cell hemolysis ( $IC_{50}$ ) in n-hexane, chloroform and ethanol extracts respectively 150.399; 83.852 and 92.349% with the inhibition value of Na-diclophenac standard of 55.149%. Chloroform extract is known to have the most active anti-inflammatory activity which is 83.852 ppm. The results of this study indicate that the chloroform extract in *Chlorella vulgaris* microalgae has the potential as an anti-inflammatory agent that can be developed as an alternative anti-inflammatory drug from natural marine materials.

**Keywords:** anti-inflammatory, *Chlorella vurlgaris*, *Human Red Blood Cells* (HRBC)

## 1 Pendahuluan

Inflamasi merupakan respon kompleks biologi dari jaringan pembuluh darah terhadap stimulus berbahaya seperti patogen, sel-sel tubuh yang rusak, atau iritan. Proses inflamasi memiliki tanda-tanda antara lain adalah rubor (kemerahan), calor (panas), tumor (pembengkakan), dolor (nyeri), dan function laesa (perubahan fungsi) [1]. Hal ini merupakan respon protektif yang dilakukan oleh tubuh terhadap kerusakan jaringan yang disebabkan oleh berbagai stimulus [2]. Saat ini, sebagian besar penyakit inflamasi diobati dengan obat anti-inflamasi steroid dan nonsteroid yang menekan kadar sitokin pro-inflamasi, sintase nitrit oksida yang dapat diinduksi (iNOS), siklooksigenase-2, dan prostaglandin E2 (PGE2) [3]. Namun, penggunaan jangka panjang dari obat-obatan konvensional ini dapat menghasilkan efek samping yang merugikan [4].

Agen antiinflamasi baru dari sumber alami dengan efek samping yang lebih sedikit adalah alternatif yang dapat dikembangkan untuk pemberian jangka panjang. Salah satu agen alternatif yang sedang diteliti adalah mikroalga. Mikroalga membentuk bagian dari sumber alami yang dapat menjadi sumber senyawa bioaktif, dan aktivitas anti-inflamasi mikroalga telah dilaporkan secara luas [5]. Beberapa mikroalga bahkan digunakan sebagai sumber obat-obatan, dan dimanfaatkan dalam industri farmasi. Salah satu mikroalga yang memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi adalah *Chlorella vulgaris*.

Penelitian tentang aktivitas mikroalga *Chlorella vulgaris* telah banyak dilakukan, antara lain pengujian aktivitas antibakteri, antioksidan, antidiabetes dan antiinflamasi. *Chlorella vulgaris* diduga mampu menyembuhkan luka berdasarkan kemampuannya sebagai imunostimulan, memiliki aktivitas antiinflamasi, serta mendukung pembentukan fibrin. *Chlorella* mengandung vitamin A ( $\beta$ -karoten), vitamin C, dan vitamin E [6] yang memiliki kemampuan sebagai imunostimulan [7].

Uji aktivitas antiinflamasi dapat dilakukan secara *in vitro* atau *in vivo*. Penentuan secara *in vivo* yang sering digunakan adalah induksi karagenan, induksi histamin, dan induksi asam asetat. Penentuan secara *in vitro* didasarkan pada mekanisme biokimia spesifik dan digunakan untuk skrining awal senyawa antiinflamasi, misalnya penghambatan siklooksigenase dan lipooksigenase, penghambatan makrofag, penghambatan protease dan uji stabilitas sel darah merah (HRBC) [8].

Sel darah merah (eritrosit) manusia telah banyak digunakan sebagai model studi interaksi obat dengan membran. Seperti obat yang memiliki efek anestesi dan obat anti inflamasi non steroid (OAINS) dapat mencegah lepasnya hemoglobin (Hb) dari sel darah merah (eritrosit) ketika terjadi kondisi hipotonik. Teori ini digunakan sebagai metode yang sangat berguna untuk menilai aktivitas antiinflamasi dari bermacam-macam senyawa secara *in vitro* [9]. Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antiinflamasi dari ekstrak mikroalga laut *Chlorella vulgaris* secara *in vitro* dengan metode stabilisasi membran HRBC (*Human Red Blood Cell*).

## 2 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan. Tahap pertama yaitu aktivasi dan kultivasi mikroalga *Chlorella vulgaris*. dalam medium Walne. Tahap kedua, pemanenan mikroalga menggunakan alat sentrifuga Beckmann J2-HS dengan rotor besar (JA 10) pada kecepatan  $5.000\times g$  selama 20 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dan pellet (biomassa basah) dikumpulkan. Tahap ketiga yaitu sampel mikroalga dilakukan pengeringan dengan metode *Freeze Dry*. Tahap keempat yaitu karakterisasi simplisia meliputi penentuan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut etanol, kadar sari larut air, dan susut pengeringan. Tahap selanjutnya adalah pemecahan sel dan ekstraksi dengan cara maserasi bertingkat. Sebanyak 10 g biomassa kering di maserasi dengan penambahan 50 mL n-heksan lalu disonikasi selama 10 menit dan diaduk dengan orbital shaker selama 24 jam, kemudian dipisahkan endapan lalu diuapkan dan diambil ekstrak kental, selanjutnya tambahkan kloroform, etanol 96% kemudian diuapkan dan diambil ekstrak kental. Tahap kelima yaitu pemantauan ekstrak dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis, dilakukan pemantauan pada ketiga ekstrak setelah itu disemprot dengan penampak bercak  $H_2SO_4$ ,  $AlCl_3$ , sitroborat,  $FeCl_3$ , Liebermann Burchard, dan Dragendorff.

Tahap selanjutnya adalah uji stabilitas membran dengan menggunakan sampel darah yang telah disentrifugasi dan dicuci dan natrium diklofenak sebagai kontrol. Darah diambil dari sukarelawan yang tidak menggunakan obat NSAID selama 2 minggu. Darah sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi larutan alsever sebanyak 10 mL. Campuran uji



terdiri dari 2 mL hiposalin; 1,0 mL 0,15 M dapar natrium posfat (pH 7,4); 0,5 mL (10% v/v) suspensi sel darah merah dan 1,0 mL sampel uji dan larutan standar. Campuran uji diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, dan kemudian larutan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 560 nm. Persentase inhibisi hemolisis dihitung dengan menggunakan rumus [10]:

$$\%Inhibisi\ Hemolisis = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

Dimana:

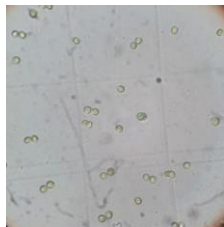
A<sub>1</sub> = serapan larutan kontrol

A<sub>2</sub> = serapan larutan uji/larutan standar uji

### 3 Hasil dan Diskusi

#### 3.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga yang digunakan adalah mikroalga laut *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia ITB. Kultur diperoleh dalam keadaan axenic yaitu hanya memiliki satu jenis mikroalga dalam medium cair, tidak terdapat kontaminan mikroorganisme lainnya. Bentuk sel dari mikroalga *Chlorella vulgaris* adalah bulat dan berwarna hijau (Gambar 1).



Gambar 1. Mikroalga *Chlorella vulgaris* di bawah mikroskop dengan perbesaran 40x

Pengumpulan biomassa mikroalga dilakukan dengan cara kultivasi menggunakan bioreaktor sederhana. Kondisi lingkungan kultivasi antara lain menggunakan suhu ruang ( $\pm 25-27$  °C), fotoperiode 12:12 (gelap:terang) dengan intensitas cahaya 10.000 lux dan aerasi selama 24 jam. Kultivasi mikroalga dilakukan dengan menggunakan medium Walne dan kepadatan sel dimulai dari  $1 \times 10^6$  sel/mL. Pemanenan dilakukan pada hari ke-8, saat pemanenan dilakukan perhitungan sel rata-rata. Untuk mengetahui kepadatan biomassa yang diperoleh, kemudian pemanenan mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan menggunakan alat sentrifuga

Beckmann J2-HS dengan rotor besar (JA 10) pada kecepatan  $8.000 \times g$  selama 20 menit sehingga diperoleh biomassa basah (Gambar 2). Selanjutnya biomassa basah dikeringkan cara beku-kering agar kandungan air pada biomassa tidak mengganggu proses ekstraksi serta sampel biomassa mikroalga bertahan lama dan tidak ditumbuhi oleh jamur.



Gambar 2. Biomassa Basah Hasil Sentrifuga Mikroalga *Chlorella vulgaris*

#### 3.2 Proses Elektrodeposisi

Ekstraksi menggunakan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etanol. biomassa kering yang digunakan 10 gram dengan masing-masing pelarut 50 mL, dilakukan tiga kali pengulangan, dilakukan selama 24 jam. Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil Rendemen Ekstrak Mikroalga *Chlorella vulgaris*

| Pelarut   | Rendemen (%) |
|-----------|--------------|
| n-heksana | 10,8         |
| Kloroform | 42,2         |
| Etanol    | 22,2         |

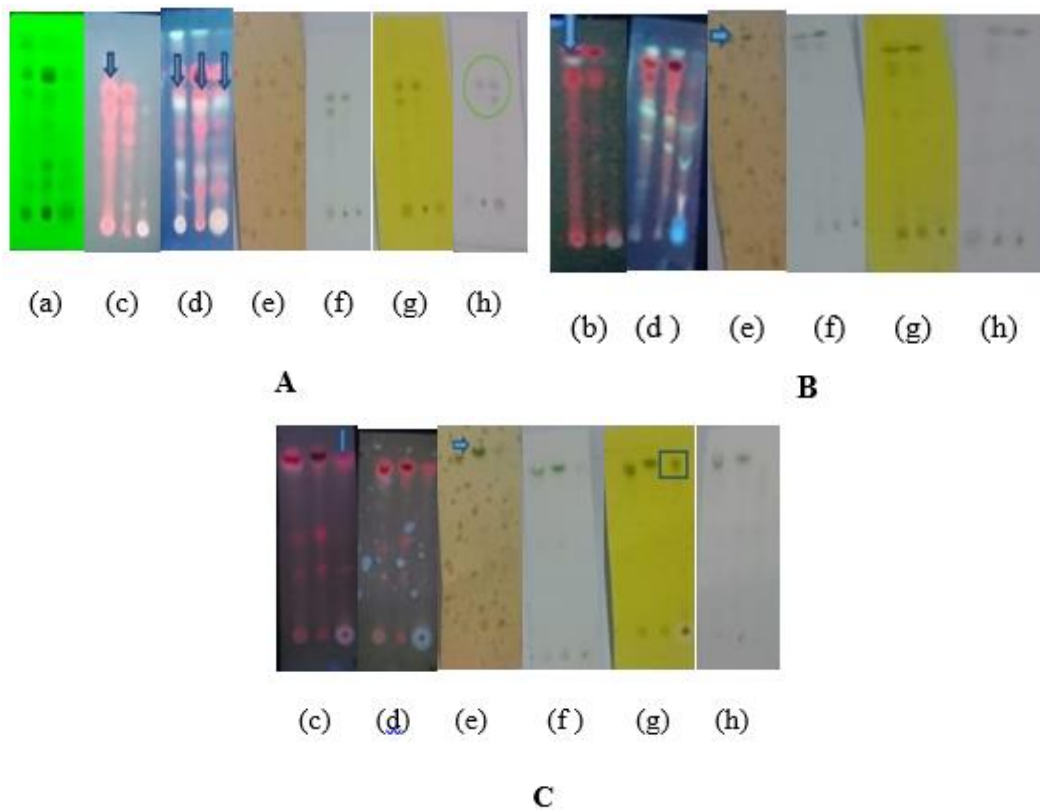
Pemantauan ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol dilakukan dengan menggunakan fase diam KLT Silika Gel F254 dengan menggunakan pengembang n-heksana – etil asetat (7 : 3), n-heksana – kloroform – etanol (5 : 4 : 1), etil asetat – etanol - aquadest (9 : 0,5 : 0,5). Penampak bercak yang digunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%, FeCl<sub>3</sub> 10%, AlCl<sub>3</sub>, sitroborat, Dragendorf, dan Liebermann Burchard. Hasil dari pemantauan ekstrak dapat dilihat pada Gambar 3.

Penampak bercak yang dipakai diantaranya H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% sebagai penampak bercak universal dimana bisa melihat seluruh komponen senyawa dalam ekstrak. Lalu digunakan penampak bercak FeCl<sub>3</sub> 10% untuk melihat adanya golongan senyawa fenol ditunjukkan dengan hasil positif yaitu bercak berwarna biru kehitaman dengan latar kuning. Kemudian digunakan penampak bercak

$AlCl_3$  untuk mendeteksi flavonoid dengan hasil positif yaitu bercak warna biru.

Selanjutnya digunakan penampak bercak sitroborat untuk melihat adanya golongan senyawa flavonoid ditunjukkan dengan hasil positif yaitu adanya bercak berwarna kuning kehijauan saat dilihat dibawah sinar lampu UV 365 nm. Penampak bercak Liebermann Burchard

digunakan untuk menunjukkan adanya saponin steroid yang ditunjukkan dengan bercak berfluorosensi hijau dan biru dan saponin triterpenoid yang ditunjukkan dengan bercak berwarna orange kemerahan. Penampak bercak Dragendorff digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa alkaloid ditandai dengan bercak berwarna coklat kehitaman.



Keterangan: ↓ : positif bercak flavonoid  
 → : positif fenol  
 ○ : positif saponin steroid  
 □ : positif alkaloid

Gambar 3. Hasil pemantauan ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan KLT kromatogram lapis tipis ekstrak n-heksana, kloroform dan etanol dari mikroalga *Chlorella vulgaris*, fase diam silica gel F254 dan pengembang (A) n-heksana – etil asetat (7 : 3), (B) n-heksana – kloroform – etanol ( 5 : 4 :1), (C) etil asetat – etanol - aquadest ( 9 : 0,5 :0,5 ). (1) ekstrak n-heksana, (2) ekstrak kloroform, (3) ekstrak etanol, (a) Sinar UV  $\lambda$  254 nm, (b) Sinar UV  $\lambda$  366 nm, (c) penampak bercak sitroborat dibawah sinar UV 366 nm, (d) penampak bercak  $H_2SO_4$  10%, (e) penampak bercak  $FeCl_3$ , (f) penampak bercak  $AlCl_3$ , (g) penampak bercak Dragendorff, (h) penampak bercak Liebermann burchard.

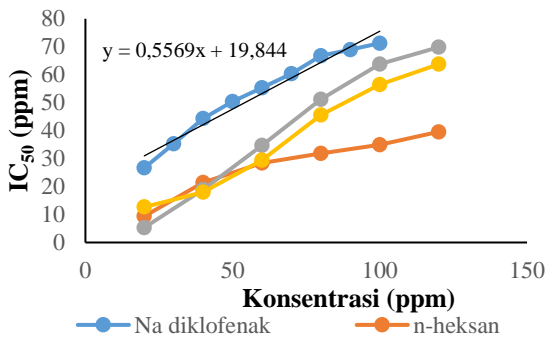
Dari hasil ketiga pengujian dengan fase gerak non polar, semi polar dan polar yang disempromot dengan beberapa macam penampak bercak dapat disimpulkan bahwa pada ekstrak non polar diperkirakan terdapat senyawa flavonoid, fenol dan saponin steroid, pada ekstrak semi polar

diperkirakan terdapat senyawa flavonoid dan ekstrak polar terdapat senyawa flavonoid, fenol, dan alkaloid.

### 3.3 Uji Aktivitas Anti-inflamasi

Stabilisasi membran sel darah merah telah digunakan sebagai metode untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi secara in vitro. Pada pengujian antiinflamasi dari ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* terlebih dahulu dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm yang dilarutkan dengan larutan isosalin. Kemudian dibuat larutan seri konsentrasi yaitu 20; 40; 60; 80; 100 dan 120 ppm. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 560 nm. Sampel uji yang memiliki aktivitas antiinflamasi dilihat dari penurunan absorbansinya. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin kecil absorbansinya, sehingga kestabilan pada membran semakin besar. Semakin kecil serapan yang terdeteksi pada campuran larutan uji, maka membran sel darah merah semakin stabil dan sedikit mengalami lisis [11]. Setelah pengukuran dan diperoleh data absorbansi kemudian dihitung persen inhibisinya. Persen inhibisi adalah kemampuan suatu sampel untuk menstabilisasi sel darah merah yang didapat dari perbandingan antara absorbansi kontrol uji dengan larutan uji. Hasil pengujian aktivitas antiinflamasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Untuk memperoleh nilai IC<sub>50</sub> dibuat terlebih dahulu kurva persamaan garis regresi linier (Gambar 4). Berdasarkan persamaan garis regresi linier tersebut didapat nilai IC<sub>50</sub> dari Na diklofenak, ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol berturut-turut sebesar 54,149 ppm; 150,399 ppm; 83,852 ppm; dan 92,349 ppm.



Gambar 4. Kurva persen inhibisi hemolisis ekstrak *Chlorella vulgaris*

Tabel 2. Data aktivitas antiinflamasi ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris*

| Ekstrak   | Konsentrasi (ppm) | Inhibisi Hemolisis (%) | IC <sub>50</sub> (ppm) |
|-----------|-------------------|------------------------|------------------------|
| n-heksana | 20                | 9,390                  |                        |
|           | 40                | 21,429                 |                        |
|           | 60                | 28,411                 | 150,399                |

|               |         |        |        |
|---------------|---------|--------|--------|
| Kloroform     | 80      | 31,902 |        |
|               | 100     | 34,952 |        |
|               | 120     | 39,567 |        |
|               | 20      | 5,337  |        |
|               | 40      | 18,900 |        |
|               | 60      | 34,751 | 83,852 |
| Etanol        | 80      | 51,164 |        |
|               | 100     | 63,804 |        |
|               | 120     | 69,823 |        |
|               | 20      | 12,681 |        |
|               | 40      | 18,018 |        |
|               | 60      | 29,494 | 92,349 |
| Na Diklofenak | 80      | 45,626 |        |
|               | 100     | 56,421 |        |
|               | 120 ppm | 63,724 |        |
|               | 20 ppm  | 26,685 |        |
|               | 30 ppm  | 35,273 |        |
|               | 40 ppm  | 44,342 |        |
| Diklofenak    | 50 ppm  | 50,401 |        |
|               | 60 ppm  | 55,297 | 54,149 |
|               | 70 ppm  | 60,353 |        |
|               | 80 ppm  | 66,774 |        |
|               | 90 ppm  | 68,941 |        |
|               | 100 ppm | 71,268 |        |

Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> berarti aktivitas antiinflamasinya semakin besar. Berdasarkan hasil yang didapat nilai IC<sub>50</sub> dari Na diklofenak, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol tergolong aktif karena aktivitas antiinflamasi digolongkan sangat aktif bila nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50 ppm, digolongkan aktif bila nilai IC<sub>50</sub> 50 – 100 ppm, digolongkan sedang bila nilai IC<sub>50</sub> 101–250 ppm, dan digolongkan lemah bila nilai IC<sub>50</sub> 250-500 ppm, serta digolongkan tidak aktif bila nilai IC<sub>50</sub> lebih besar dari 500 ppm.

#### 4 Kesimpulan

Ekstrak n-heksana, kloroform, dan etanol dari mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki aktivitas antiinflamasi. Nilai IC<sub>50</sub> dari standar Na-diklofenak, ekstrak n-heksana, dan ekstrak etanol berturut-turut sebesar 54,149; 150,399; 83,852 dan 92,349 ppm. Ekstrak kloroform memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang paling mendekati nilai standar Na-diklofenak. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antiinflamasi tertinggi dari ketiga pelarut yang digunakan adalah ekstrak kloroform dengan persentase inhibisi sebesar 69,283 ppm pada konsentrasi 120 ppm.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia (Kemenristekdikti) atas pendanaan penelitian ini melalui Hibah Penelitian Dosen Pemula (Nomor : 0009/P3M/E.PE/III/2019).

### Daftar Pustaka

- [1] Akmalia, Rina Adilla, dkk. 2016. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) secara in vitro. Samarinda.
- [2] Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation, *Nature*, 454(7203), 436.
- [3] Pohanka, M., Snopkova, S., Havlickova, K., Bostik, P., Sinkorova, Z., Fusek, J., ... & Pikula, J. (2011). Macrophage-assisted inflammation and pharmacological regulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway, *Current medicinal chemistry*, 18(4), 539-551.
- [4] McGettigan, P., & Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS medicine*, 10(2), e1001388.
- [5] Jung, H. A., Jin, S. E., Ahn, B. R., Lee, C. M., & Choi, J. S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and chemical toxicology*, 59, 199-206.
- [6] Bengwayan, P. T., Laygo, J. C., Pacio, A. E., Poyaoan, J. L. Z., Rebugio, J. F., & Yuson, A. L. L. (2010). A comparative study on the antioxidant property of *Chlorella* (*Chlorella* sp.) tablet and glutathione tablet. *E-International Scientific Research Journal*, 2(1), 25-35.
- [7] Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2), 63-92.
- [8] Shen, T. Y. (1981). Toward more selective antiarthritic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 24(1), 1-5.
- [9] Kumar V, Zulfiqar A. B, Dinesh K, N.A Khan, IA Chashoo. 2011. Evaluation of Anti-Inflammatory Potential of Leaf Extracts of *Skimmia anquetilia*. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 627-630
- [10] Shenoy, S.K.S., Prabhu, K., Maradi, R., Bairy, K.L and Shanbhag, T., (2010). Evaluation of Antii-Inflammatory of Activity *purpureae* in Rats, *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*: 193-195.
- [11] Lutfiana. 2013. Uji Aktivitas Anti Inflamasi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam) dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah secara In vitro. Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

