



## TOKSISITAS ORAL AKUT *Arthrospira maxima* DAN *Chlorella vulgaris* ISOLAT GLAGAH PADA TIKUS (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) GALUR WISTAR

### ACUTE ORAL TOXICITY STUDY OF *Arthrospira maxima* AND *Chlorella vulgaris* ISOLATED FROM GLAGAH COASTAL WATER ON WISTAR RATS (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769)

Laksmindra Fitria<sup>1\*</sup>, Tika Candra Dewi<sup>2</sup>, Kholidatus Silmi<sup>2</sup>, Mulyati<sup>1</sup>, Rahadian Yudo Hartantyo<sup>1</sup>, Slamet Widiyanto<sup>1</sup>, Eko Agus Suyono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Fisiologi Hewan, Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Program Studi Biologi, Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*Corresponding author: laksmindraf@ugm.ac.id

Naskah Diterima: 17 Desember 2020; Direvisi: 17 Maret 2021; Disetujui: 22 Mei 2021

#### Abstrak

*Arthrospira* (*Spirulina*) dan *Chlorella* adalah mikroalga yang telah dikenal bermanfaat bagi kesehatan sehingga banyak dikembangkan sebagai produk suplemen makanan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari tingkat ketoksikan dan keamanan mengkonsumsi *A. maxima* dan *C. vulgaris* yang diisolasi dari perairan Pantai Glagah di Provinsi D.I. Yogyakarta menggunakan tikus Wistar sebagai model praklinis. Studi toksisitas merupakan langkah awal sebelum dilakukan eksplorasi potensi, pemanfaatan, dan pengolahan kedua mikroalga ini sebagai produk suplemen kesehatan. Prosedur uji toksisitas mengikuti *Guideline* OECD No. 420. Parameter yang diamati meliputi berat badan, profil hematologis, evaluasi fungsi hati (aktivitas ALT dan kadar bilirubin), serta fungsi ginjal (kadar kreatinin dan asam urat). Berdasarkan hasil, dapat disimpulkan bahwa pemberian per oral *A. maxima* dan *C. vulgaris* hingga dosis 5.000 mg/kg bb tidak menunjukkan tanda-tanda ketoksikan, ditunjukkan dengan nilai untuk sebagian besar variabel yang berada dalam kisaran normal. Fluktuasi nilai yang terjadi merupakan wujud dinamika fisiologis normal. Dalam penelitian ini kami mendapat temuan bahwa *C. vulgaris* menunjukkan potensi sebagai antianemia. Oleh karena studi toksisitas ini adalah dosis tunggal dan terbatas untuk periode akut, maka perlu dilanjutkan dengan studi toksisitas dosis berulang dan periode yang lebih panjang, selain untuk mempelajari ketoksikan dan keamanan juga untuk menggali potensinya.

**Kata kunci:** *Arthrospira maxima*; *Chlorella vulgaris*; Mikroalga; Suplemen makanan; Toksisitas oral akut

#### Abstract

*Arthrospira* (*Spirulina*) and *Chlorella* are microalgae that possess benefits for health, therefore they are developed as food supplement products. This study aimed to determine the toxicity and the safety of consuming *A. maxima* and *C. vulgaris* isolated from Glagah coastal water in D.I. Yogyakarta Province using Wistar rats as preclinical model. Toxicity study is the first step before exploring the potential, utilization and processing of these microalgae as health supplement products. Toxicity test procedure was performed following OECD Guideline No. 420. Parameters observed included: body weight, hematological profile, and evaluation of liver function (ALT activity and bilirubin level) and renal function (creatinine and uric acid levels). Based on the results, it is concluded that oral administration of *A. maxima* and *C. vulgaris* up to dose of 5,000 mg/kg bw demonstrated no signs of toxicity, indicated by values for most of variables were within normal range. Fluctuation in values were manifestation of normal physiological dynamic. In this study, we found that *C. vulgaris* could be an antianemia potential. Since this toxicity study was a single-dose and limited to acute period, it is suggested to continue with repeated-dose toxicity studies with longer periods to examine the toxicity and the safety of both species besides exploring their potential.

**Keywords:** Acute oral toxicity; *Arthrospira maxima*; *Chlorella vulgaris*; Food Supplement; Microalgae

**Permalink/DOI:** <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v15i2.18716>

## PENDAHULUAN

Menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS, 2020a; 2020b), *Arthrospira* (dahulu disebut sebagai *Spirulina*) termasuk kelompok bakteri dari Filum *Cyanobacteria* (alga biru-hijau), sedangkan *Chlorella* termasuk kelompok tumbuhan dari Divisi *Chlorophyta* (alga hijau). Kedua mikroalga ini telah lama dikenal sangat bermanfaat bagi kesehatan sehingga banyak dikembangkan sebagai suplemen makanan. Spesies *Arthrospira* yang banyak dikomersilkan adalah *A. platensis* dan *A. maxima* (Hutadilok-Towatana et al., 2010), sedangkan spesies *Chlorella* adalah *C. vulgaris* (Azlan et al., 2020).

Kedua jenis alga sel tunggal ini kaya akan kandungan protein berkualitas tinggi, sehingga dikenal sebagai Protein Sel Tunggal (PST). Selain untuk suplemen kesehatan manusia, PST dapat diaplikasikan untuk perbaikan gizi dan penggemukan hewan ternak, pengolahan dan peningkatan nilai nutritif bahan pangan, hingga berbagai industri (Nasseri et al., 2011). Selain protein dan asam amino, *Arthrospira* dan *Chlorella* juga memiliki sejumlah kandungan nutrisi penting meliputi polisakarida, asam nukleat, lipid, asam lemak, sterol, vitamin, mineral, serta berbagai antioksidan (Hutadilok-Towatana et al., 2010; Wells et al., 2017; Azlan et al., 2020). Zat-zat tersebut merupakan komponen utama yang berperan dalam metabolisme tubuh manusia.

Secara umum, sebelum suatu bahan alam diolah lebih lanjut untuk dikonsumsi oleh manusia, penapisan toksikologis perlu dilakukan. Uji toksisitas oral akut merupakan kajian praklinik tahap awal untuk mengetahui ada tidaknya ketoksikan sekaligus mempelajari keamanan penggunaannya, serta ada tidaknya efek samping dalam jangka waktu tertentu. Di samping itu digunakan untuk menggali potensi terapeutik, baik sebagai bahan pangan fungsional atau dikembangkan sebagai bahan obat (Parasuraman, 2011). Sejumlah studi toksisitas oral akut *Arthrospira* maupun *Chlorella* telah dipublikasikan, namun untuk spesies yang dibudidayakan di luar negeri menggunakan sediaan mikroalga dan hewan coba yang bervariasi. Pengujian oleh Krishnakumari et al. (1981) pada tikus Wistar menggunakan serbuk *A. platensis* dosis 800 mg/kg bb tidak bersifat toksik. Pemberian ekstrak metanolik *A. platensis* dosis 6.000 mg/kg bb pada mencit Swiss juga tidak menunjukkan tanda-tanda ketoksikan (Hutadilok-Towatana et al., 2008). Pemberian serbuk *C. vulgaris* dosis 2.000 mg/kg bb tidak bersifat toksik pada tikus Sprague-Dawley (Azlan et al., 2020), bahkan hingga dosis 5.000 mg/kg bb tidak bersifat toksik pada tikus Wistar (Himuro et al., 2014).

Pemeriksaan hematologi dalam studi toksisitas penting karena nilai parameter darah dapat memberikan gambaran yang jelas mengenai tanda-tanda ketoksikan dan adanya gangguan fisiologis baik yang bersifat minor maupun mayor. Darah merupakan medium transportasi berbagai substansi yang masuk ke dalam tubuh, termasuk toksikan, sehingga sel-sel darah senantiasa terpapar zat-zat tersebut. Pemeriksaan fungsi hati dan ginjal juga penting dalam studi toksisitas karena kedua organ ini memegang peranan utama dalam proses detoksifikasi, filtrasi, dan eliminasi limbah metabolisme serta zat-zat yang berbahaya bagi tubuh, termasuk toksikan. Kesehatan fungsi hati dapat diperiksa melalui berbagai aktivitas enzim seperti *alanine aminotransferase* (ALT), *aspartate aminotransferase* (AST), dan kadar bilirubin. Sementara itu, kesehatan fungsi ginjal dapat diamati menggunakan indikator kreatinin, urea, dan asam urat (Aamir et al., 2019; Sutrisni et al., 2019).

Sejauh ini belum ditemukan studi toksisitas oral untuk kedua mikroalga tersebut yang dibudidayakan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mempelajari toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* yang diisolasi dari perairan pantai Glagah di Provinsi D.I. Yogyakarta.

## MATERIAL DAN METODE

### Pengadaan Mikroalga

Mikroalga jenis *Arthrospira maxima* Setchel et Gardner dan *Chlorella vulgaris* Beijerinck telah diidentifikasi dan diisolasi dari perairan Pantai Glagah di Provinsi D.I. Yogyakarta. Keduanya kemudian dikultur di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi UGM menggunakan medium F/2 yang ditambah silika cair dengan konsentrasi 30 mg/L. Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini adalah yang telah dikeringkan menjadi bentuk serbuk. Mikroalga hasil kultur dipanen setelah 21

hari, dikeringkan pada suhu 45 °C hingga dicapai berat kering yang konstan (Widiyanto et al., 2018).

### Pengadaan Hewan Coba

Hewan coba berupa dua belas ekor tikus (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) galur Wistar berjenis kelamin betina umur dua bulan dengan kisaran berat awal 105,5–147,2 g. Hewan coba diperoleh dan dipelihara di fasilitas hewan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM) Unit IV. Semua prosedur yang berkaitan dengan hewan coba dalam penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik LPPT-UGM dengan diterbitkannya Sertifikat Kelaikan Etik No: 00044/04/LPPT/VIII/2016 tertanggal 01 Agustus 2016.

### Perlakuan

Sebelum percobaan, hewan diaklimasi selama satu minggu. Prosedur uji toksisitas mengikuti panduan uji toksisitas oral akut oleh OECD No. 420 (OECD, 2002) bagian *Sighting Study*. Tikus dibagi menjadi tiga kelompok ( $n = 4$ ) adalah kelompok yang dicekok *A. maxima* (AM), kelompok yang dicekok *C. vulgaris* (CV), dan kelompok kontrol yang dicekok air suling sebagai plasebo (K). Dosis pencekokan mikroalga adalah 5.000 mg/kg bb yang dilarutkan dalam 6 mL air suling. PENCEKOKAN berupa dosis tunggal (*single dose*) yang dilakukan dua kali, yaitu pada pagi dan sore hari masing-masing dengan volume 3 mL.

### Pengambilan Data

Parameter yang diamati meliputi kondisi fisik hewan coba secara umum serta perilaku dan aktivitas hariannya untuk melihat ada tidaknya gejala ketoksikan, berat badan, serta analisis darah untuk profil hematologis (hitung darah lengkap) dan biokimia klinis untuk evaluasi fungsi hati dan ginjal. Indikator fungsi hati berupa aktivitas ALT dan kadar bilirubin, sedangkan indikator fungsi ginjal berupa kadar kreatinin dan asam urat (Aamir et al., 2019; Sutrisni et al., 2019). Pengamatan kondisi fisik dan perilaku/aktivitas diamati setiap hari terutama hingga 4 jam setelah pencekokan. Penimbangan berat badan dan analisis darah dilakukan pada hari ke-0, 7, dan 14. Darah dikoleksi dari *sinus orbitalis* dalam kondisi hewan tertidur setelah dianestesi menggunakan injeksi Ketamine® (Kepro, Holland) rute intramuskular dosis 50 mg/kg bb. Pengujian profil hematologis dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi UGM menggunakan *fully-automated hematology analyzer* Sysmex®XP-100, sementara pengujian biokimia klinis dilakukan di LPPT-UGM Unit I menggunakan kit DiaSys® (Diagnostic Systems GmbH, Germany) dan *semi-automated clinical chemistry analyzer* Microlab®300. Pada hari terakhir percobaan, hewan dieutanasi dengan cara injeksi Ketamine® rute intramuskular dosis 100 mg/kg bb dilanjutkan dengan eksanguinasi (Hickman & Johnson, 2011; AVMA, 2020).

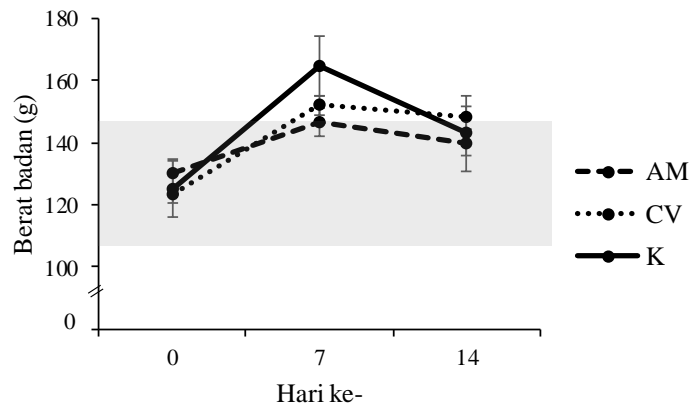
### Analisis Data

Data ditabulasi dan direkapitulasi menggunakan perangkat lunak Microsoft® Excel® v.2019, kemudian dianalisis berdasarkan statistik deskriptif (rerata  $\pm$  simpangan) dilanjutkan dengan uji *one-way* ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) menggunakan perangkat lunak IBM®SPSS® v.23. Hasil divisualisasikan ke dalam bentuk grafik garis. Pembahasan dilakukan secara dua arah untuk membandingkan antarkelompok dan antarwaktu berdasarkan hasil analisis statistik dan nilai rujukan. Nilai rujukan kisaran normal diperoleh dari paduk (*baseline*) yang merupakan nilai terendah hingga tertinggi populasi hewan coba dalam penelitian ini pada hari ke-0 (Weiss & Wardrop, 2011).

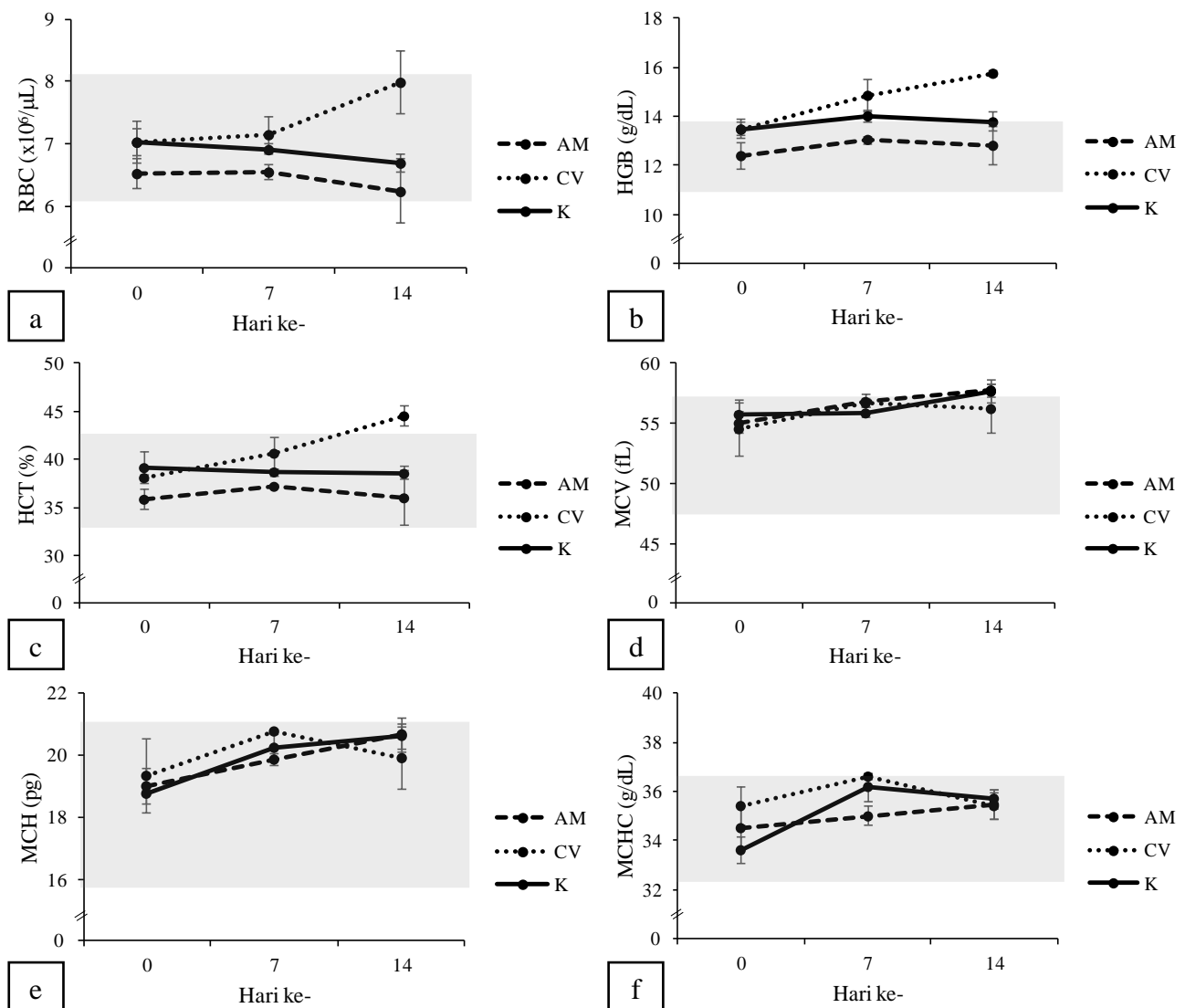
## HASIL

Berat badan hewan coba dapat menjadi indikator ketoksikan karena individu yang keracunan akan mengalami gangguan pencernaan sehingga menolak makan, akibatnya terjadi penurunan berat badan selama percobaan. Dalam penelitian ini, terjadi peningkatan berat badan namun kemudian terjadi penurunan (tidak signifikan). Oleh karena kontrol juga mengalami penurunan dan ketiga

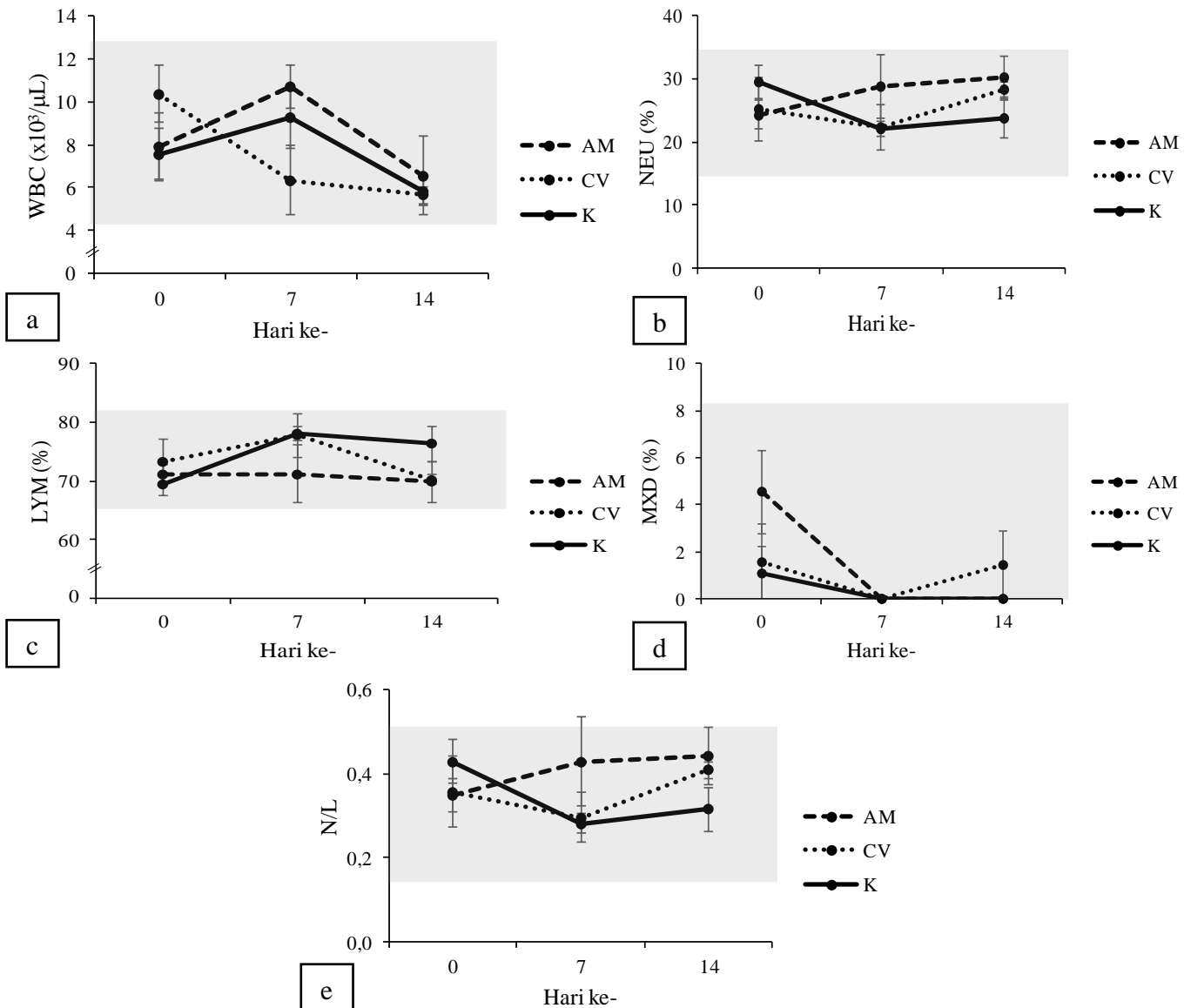
kelompok memiliki pola grafik yang relatif sama, maka hal ini bukanlah efek toksik mikroalga. Penurunan berat badan bersifat kritis dan berdampak klinis jika nilainya signifikan (Gambar 1).



**Gambar 1.** Berat badan tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok  = baseline (105,5–147,2 gram)



**Gambar 2.** Profil eritrosit tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. Jumlah eritrosit=  $6,12\text{--}8,03 \times 10^6/\mu\text{L}$  (a), kadar hemoglobin= 10,90–13,90 g/dL (b), hematokrit= 33,90–42,10 % (c), MCV= 47,60–57,50 fL (d), MCH= 15,80–21,00 pg (e), dan MCHC= 32,20–36,50 g/dL (f). AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok  = baseline



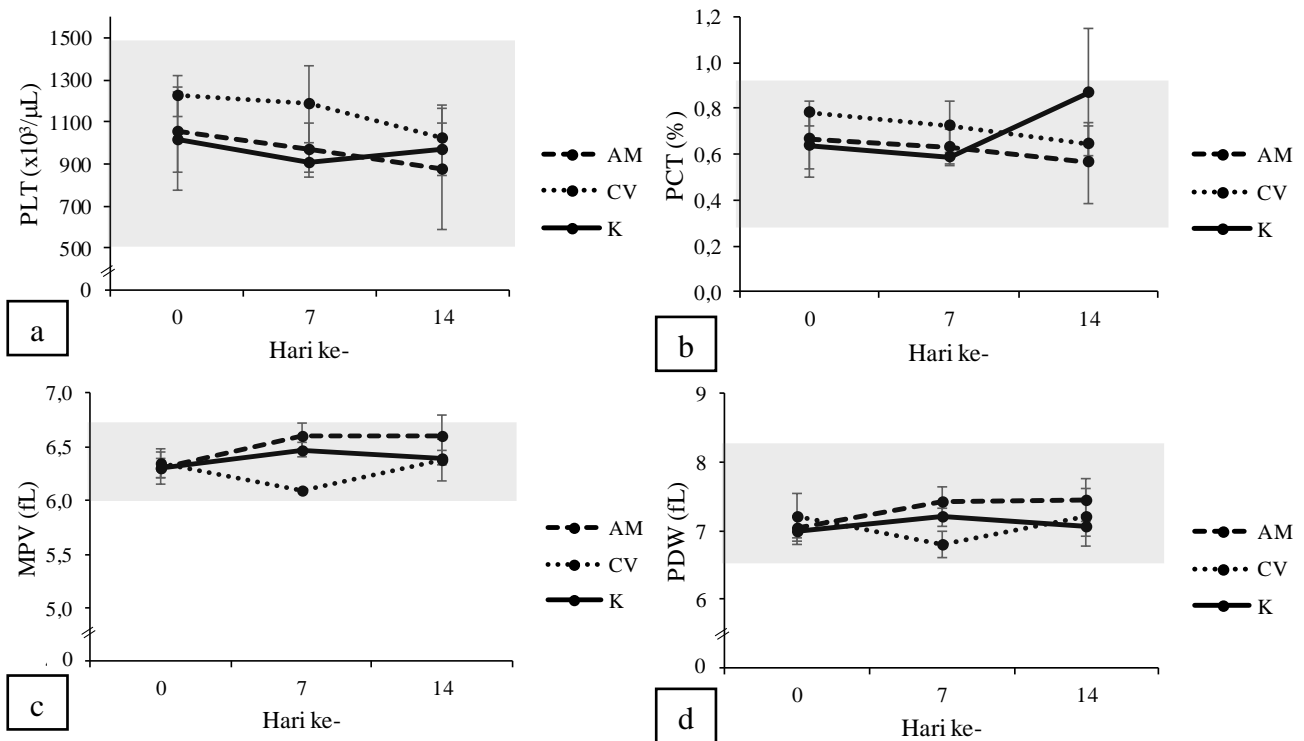
**Gambar 3.** Profil leukosit tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. Jumlah total leukosit=  $4,30\text{--}12,70 \times 10^3/\mu\text{L}$  (a), persentase neutrofil=  $14,10\text{--}34,40\%$  (b), persentase limfosit  $65,60\text{--}80,30\%$  (c), persentase eosinofil, basofil, dan monosit=  $0,00\text{--}8,20\%$  (d), rasio neutrofil terhadap limfosit=  $0,18\text{--}0,53$  (e). AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok  $\blacksquare$  = baseline

Profil hematologis selain untuk mempelajari potensi hematotoksitas juga dapat memberi gambaran status fisiologis dan kesehatan hewan coba. Berdasarkan analisis profil eritrosit (Gambar 2A-F) dapat dilihat bahwa hampir semua nilai untuk semua variabel berada di dalam kisaran normal meskipun terjadi fluktuasi. Satu hal yang mencolok adalah peningkatan signifikan dari jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan hematokrit pada kelompok yang dicekok *C. vulgaris*. Hal ini menunjukkan adanya potensi mikroalga ini sebagai agen antianemia (Gambar 2A-C).

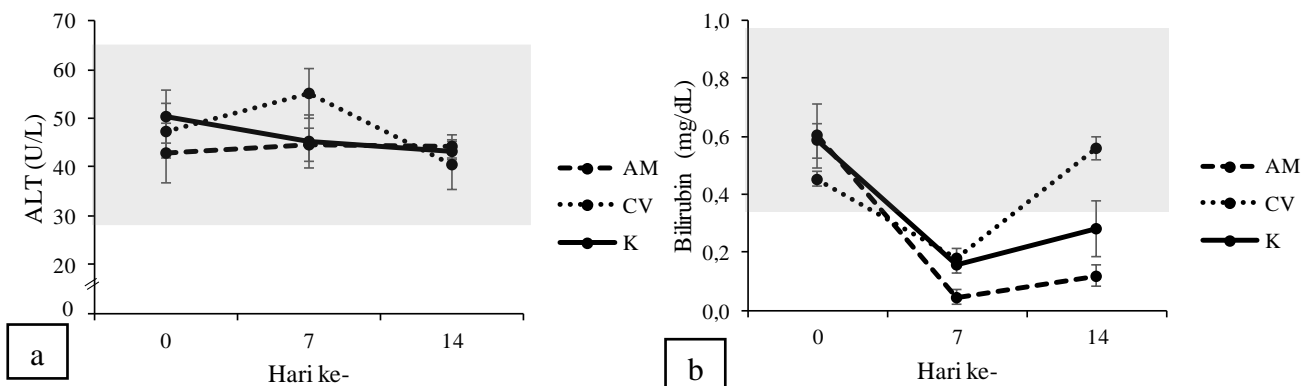
Hasil analisis profil leukosit juga menunjukkan hal yang sama, bahwa nilai semua variabel berada dalam kisaran normal. Tidak ada perubahan proporsi/persentase neutrofil, limfosit, maupun eosinofil, basofil, dan monosit (Gambar 3A-E). Peningkatan atau penurunan jumlah leukosit total maupun perubahan persentase leukosit diferensial di luar kisaran normal menandakan terjadi respons imun aktif terhadap zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kedua mikroalga ditolerir oleh tubuh, tidak dikenali sebagai antigen yang membangkitkan respons imun hewan coba. Rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L) juga dapat

digunakan sebagai indikator stres pada hewan coba. Hasil menunjukkan bahwa kedua mikroalga tidak menginduksi stres karena nilainya dipertahankan dalam kisaran normal (Gambar 3E).

Aktivitas trombosit dapat dipelajari dari jumlah dan proporsinya (PLT, PCT) serta ukurannya (MPV, PDW). Hasil analisis profil trombosit juga menunjukkan bahwa nilai untuk semua variabel berada dalam kisaran normal (Gambar 4A-D). Dengan demikian kedua mikroalga tidak memengaruhi aktivitas trombosit yang berdampak pada mekanisme hemostasis normal. Penurunan jumlah trombosit juga dapat dipengaruhi oleh faktor teknis saat pengambilan sampel darah, namun demikian penurunan ini masih berada dalam kisaran normal (Gambar 4A).



**Gambar 4.** Profil trombosit tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. Jumlah trombosit=  $516\text{--}1498 \times 10^3/\mu\text{L}$  (a), trombokrit= 0,31–0,91 % (b), MPV= 6,00–6,70 fL (c), dan PDW 6,60–8,20 fL (d). AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok  $\square$  = baseline

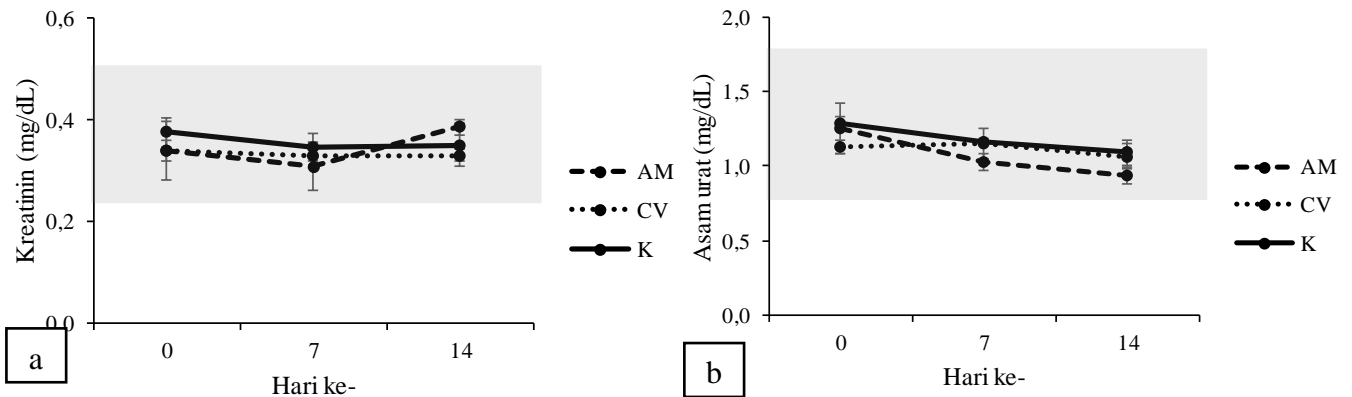


**Gambar 5.** Aktivitas ALT dan kadar bilirubin untuk evaluasi fungsi hati tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. ALT= 28,10–65,40 U/L (a) dan bilirubin= 0,37–0,98 mg/dL (b). AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok  $\square$  = baseline

Peningkatan ALT dan bilirubin mengindikasikan adanya gangguan fungsi hati, sebaliknya penurunan keduanya tidak bermakna atau dapat berarti terjadi perbaikan pada fungsi hati. Hasil menunjukkan bahwa nilai ALT pada semua kelompok berada dalam kisaran normal (Gambar 5A),

sementara itu kadar bilirubin sempat menurun hingga di bawah kisaran normal namun meningkat kembali. Penurunan ini bukan merupakan efek toksik kedua mikroalga karena kontrol juga mengalami kondisi serupa (pola grafik relatif sama pada ketiga kelompok) (Gambar 5B).

Kreatinin dan asam urat merupakan limbah metabolisme yang harus diekskresikan, sehingga jika kadarnya di dalam plasma darah tinggi maka menunjukkan adanya gangguan fungsi ginjal dalam mengeliminasi keduanya. Hasil menunjukkan bahwa kadar kreatinin dan asam urat berada dalam kisaran normal, yang berarti kedua mikroalga tidak menyebabkan kerusakan fungsi sel-sel ginjal dalam rangka filtrasi (Gambar 6A-B).



**Gambar 6.** Kadar kreatinin dan asam urat untuk evaluasi fungsi ginjal tikus sebagai hewan coba pada uji toksisitas oral akut *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* isolat Glagah. Kreatinin= 0,22–0,50 mg/dL (a) dan asam urat= 0,84–1,76 mg/dL (b). AM= *A. maxima*, CV= *C. vulgaris*, K= Kontrol. Tanda blok ■ = baseline

## PEMBAHASAN

Penggunaan mikroalga sebagai bahan pangan telah berlangsung lama (Hutadilok-Towatana et al., 2010; Wells et al., 2017; Azlan et al., 2020), hingga kini tidak ada laporan tentang kematian dan efek samping yang ditimbulkannya. Uji toksisitas klasik pada umumnya hanya menitikberatkan pada ada tidaknya kematian (mortalitas) hewan coba melalui perhitungan LD<sub>50</sub> atau LC<sub>50</sub> tanpa mempertimbangkan efek subletal. Padahal, tidak semua bahan yang diuji menyebabkan kematian, salah satunya bahan pangan yang telah lazim dikonsumsi. Oleh karena itu, *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) merancang panduan uji toksisitas yang tidak hanya menekankan pada efek letal namun juga efek subletal dan efek samping terhadap fisiologi tubuh secara menyeluruh. Selain itu, panduan tersebut juga mengikuti kaidah Kesejahteraan Hewan (3R) dengan meminimalisir jumlah hewan coba yang digunakan (Parasuraman, 2011). Panduan OECD No. 420 dipilih dengan pertimbangan bahwa bahan yang diuji bersifat nonletal berdasarkan informasi sejarah penggunaan *Arthrospira* dan *Chlorella* sebagai bahan pangan sumber protein (OECD, 2002).

Secara alami, dalam kondisi sehat tanpa pembatasan pakan dan stresor lainnya, berat badan hewan coba akan terus meningkat. Dalam penelitian ini, semua kelompok mengalami kenaikan berat badan pada separuh durasi percobaan namun kemudian mengalami penurunan. Administrasi per oral bahan yang bersifat toksik akan menekan nafsu makan sehingga hewan menolak makan, yang berdampak pada penurunan berat badan (Prasanth et al., 2015). Efek toksik juga dapat diamati dari konsistensi feses yang lembek atau cair (diare), serta perilaku/aktivitas hewan yang pasif (Abatan et al., 2006). Penurunan berat badan dalam percobaan ini bukan efek toksik mikroalga karena kontrol juga mengalami penurunan. Hal ini diduga karena pembatasan ransum pakan yang diberikan sebanyak 15 g/ekor/hari. Namun demikian, porsi ini merupakan rekomendasi konsumsi pakan harian tikus laboratorium oleh Komisi Nutrisi Hewan Laboratorium *National Research Council* (NRC, 1995), sehingga kecil kemungkinannya menyebabkan tikus kelaparan. Oleh karena itu, percobaan ini dilanjutkan dengan studi toksisitas tahap berikutnya guna mempelajari efek pemberian *Arthrospira* dan *Chlorella* untuk jangka waktu yang lebih lama terhadap pola pertumbuhan dan nafsu makan hewan coba.

Hasil analisis profil eritrosit, leukosit, dan trombosit menunjukkan bahwa hampir semua nilai berada dalam kisaran normal dengan pola yang fluktuatif. Peningkatan dan penurunan nilai hematologis yang terjadi dalam kisaran normal dan tidak signifikan merupakan wujud dinamika fisiologis normal dalam rangka homeostasis (Weiss & Wardrop, 2011), sehingga hal ini bukan merupakan efek positif maupun negatif mikroalga. Efek positif atau potensi mikroalga ditunjukkan secara jelas pada kelompok yang diberi *C. vulgaris*, di mana jumlah eritrosit, kadar hemoglobin, dan hematokrit meningkat secara signifikan hingga di atas kisaran normal. Hal ini menunjukkan potensi *C. vulgaris* sebagai agen antianemia. Hasil ini selaras dengan penelitian klinis oleh Nakano et al. (2010) terhadap sejumlah ibu hamil di Jepang yang menunjukkan bahwa suplementasi *C. pyrenoidosa* mengurangi risiko anemia selama kehamilan. Menurutnya *Chlorella* kaya akan folat, vitamin B-12 dan zat besi yang berperan dalam mengatasi anemia.

*Arthrospira* juga memiliki potensi antianemia yaitu dari spesies *A. platensis* dalam percobaan Simsek et al. (2009) pada tikus dan Kambou et al. (2015) pada kelinci. Percobaan klinis oleh Selmi et al. (2011) juga menyatakan bahwa suplementasi *Arthrospira* dapat mengatasi anemia namun tidak disebutkan spesiesnya. Pustaka mengenai potensi antianemia *A. maxima* belum ditemukan, berdasarkan hasil penelitian ini juga tidak menunjukkan hal tersebut.

Salah satu fungsi hati adalah untuk detoksifikasi dan degradasi senyawa toksik endogen maupun eksogen, oleh karena itu sel-sel hati (hepatosit) rentan terhadap kerusakan yang berdampak pada gangguan fungsi hati. *Alanine aminotransferase* (ALT) yang dahulu disebut sebagai *serum glutamic pyruvic transaminase* (SGPT) merupakan enzim intrasel sehingga keberadaannya dalam cairan darah mengindikasikan adanya kerusakan hepatosit (Wiedmeyer, 2018). Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas ALT pada semua kelompok berada dalam kisaran normal, yang berarti mikroalga tidak mengganggu struktur dan fungsi normal hati atau tidak bersifat hepatotoksik. Penelitian oleh Altinok-Yipel et al. (2020) bahkan menunjukkan potensi *Arthrospira* dan *Chlorella* sebagai agen hepatoprotektif.

Selain ALT, indikator fungsi hati yang lain adalah kadar bilirubin. Peningkatan kadar bilirubin berkorelasi positif dengan tingkat kerusakan fungsi hati (Wiedmeyer, 2018). Hasil penelitian ini menunjukkan sebaliknya, yaitu terjadi penurunan kadar bilirubin secara signifikan hingga di bawah kisaran normal. Menurut Wiedmeyer (2018), penurunan kadar bilirubin jarang terjadi kemungkinan karena adanya zat yang menginduksi produksi enzim untuk metabolisme bilirubin. Faktor lain adalah hemoglobin yang terdapat di cairan darah akibat hemolisis atau dapat juga presipitasi imunoglobulin yang salah diinterpretasikan sebagai bilirubin. Karena penurunan bilirubin terjadi pada semua kelompok dan nilainya kembali meningkat ke dalam kisaran normal, maka hal ini bukanlah efek toksik kedua mikroalga ini. Namun demikian, studi toksisitas lanjut perlu dilakukan untuk memastikannya.

Kreatinin merupakan limbah katabolisme aktivitas otot yang menjadi penanda umum fungsi ginjal. Peningkatan kadar kreatinin dalam cairan darah mengindikasikan gangguan fungsi glomerulus dan memberikan gambaran seberapa banyak nefron yang berfungsi baik maupun yang rusak (Bounous & Harpur, 2018). Hasil menunjukkan bahwa kadar kreatinin pada semua kelompok berada dalam kisaran normal, yang berarti kedua mikroalga tidak bersifat nefrotoksik atau menyebabkan kerusakan fungsi ginjal.

Meskipun mikroalga kaya akan nutrisi yang bermanfaat bagi kesehatan, akan tetapi juga mengandung asam nukleat dalam jumlah besar. Di dalam tubuh, asam nukleat berupa purin akan dimetabolisme menjadi asam urat. Kerusakan fungsi ginjal dapat menyebabkan kegagalan ekskresi asam urat sehingga menyebabkan penyakit *gout* (penumpukan asam urat pada sendi) dan batu ginjal (Garcia et al., 2017). Seperti halnya pada hasil pengukuran kadar kreatinin, kadar asam urat pada semua kelompok berada dalam kisaran normal. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa administrasi per oral *A. maxima* ataupun *C. vulgaris* hingga dosis 5.000 mg/kg bb aman untuk fungsi ginjal. Namun demikian, studi toksisitas yang dilakukan ini adalah untuk pemberian dosis tunggal (*single-dose*), sehingga studi toksisitas tahap berikutnya dengan dosis berulang (*repeated-dose*) harus dilakukan untuk mempelajari ketoksikan dan keamanan *A. maxima* maupun *C. vulgaris* jika dikonsumsi secara terus menerus dalam jangka waktu yang lebih panjang,



## SIMPULAN DAN SARAN

Pemberian per oral *Arthrospira maxima* dan *Chlorella vulgaris* hingga dosis maksimum uji toksisitas oral akut, yaitu 5.000 mg/kg bb tidak menunjukkan tanda-tanda ketoksikan atau *no observed adverse effect level* (NOAEL), ditunjukkan dengan nilai untuk sebagian besar variabel yang berada di dalam kisaran normal dan bersifat fluktuatif. Analisis statistik menyatakan bahwa sebagian besar peningkatan dan penurunan nilai bersifat tidak signifikan, sehingga hal tersebut merupakan dinamika fisiologis normal. Dengan demikian, disimpulkan bahwa kedua mikroalga ini dapat dikategorikan sebagai bahan yang praktis tidak toksik dan aman dikonsumsi. Bahkan pada penelitian ini ditemukan bahwa *C. vulgaris* menunjukkan potensi yang signifikan sebagai agen antianemia.

Oleh karena studi toksisitas ini adalah untuk dosis tunggal dan terbatas untuk periode akut, maka perlu dilanjutkan dengan studi toksisitas untuk dosis berulang dan periode yang lebih panjang. Selain untuk mempelajari tingkat ketoksikan dan keamanan *A. maxima* maupun *C. vulgaris* jika dikonsumsi secara terus menerus dalam jangka waktu lama, studi juga dilakukan untuk menggali potensi antianemia dan kemungkinan potensi-potensi lainnya yang belum tampak dalam percobaan ini.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian dengan Biaya Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) dan Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun 2016 yang diberikan kepada Dr. Slamet Widiyanto, M.Sc., Dra. Mulyati, M.Si., dan Dr. Eko Agus Suyono, M.App.Sc.

## REFERENSI

- Abatan, M. O., Lateef, I., & Taiwo, V. O. (2006). Toxic effect of non-steroidal anti-inflammatory agents in rats. *African Journal of biomedical Research*, 9(3), 219-223. doi: 10.4314/ajbr.v9i3.48909.
- Altinok-Yipel, F., Tekeli, I. O., Ozsoy, S. Y., Guvenc, M., Sayin, S., & Yipel, M. (2020). Investigation of hepatoprotective effect of some algae species on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(5), 463-467. doi: 10.1080/13813455.2019.1702062.
- Aamir, K., Khan, H. U., Hossain, C. F., Afrin, M. R., Shaik, I., Salleh, B., ... Arya, A. (2019). Oral toxicity of arjunolic acid on hematological, biochemical and histopathological investigations in female Sprague Dawley rats. *PeerJ*, 7, e8045. doi: 10.7717/peerj.8045.
- AVMA. (2020). *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition*. Illinois, USA: American Veterinary Medical Association.
- Azlan, N. Z., Ghafar, N. A., Yusof, Y. A. M., & Makpol, S. (2020). Toxicity study of *Chlorella vulgaris* water extract on female Sprague Dawley rats by using the organization for economic cooperation and development (OECD) guideline 420. *Journal of Applied Phycology*, 32, 3063-3075. doi: 10.1007/s10811-020-02195-0.
- Bounous, D., & Harpur, E. (2018). Evaluation of renal function and injury. In D. M. Kurtz, & G. S. Travlos (Eds.), *The clinical chemistry of laboratory animals third edition*. Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Garcia, J. L., de Vicente, M., & Galan, B. (2017). Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1017-1024. doi: 10.1111/1751-7915.12800.
- Hickman, D. L., & Johnson, S. W. (2011). Evaluation of the aesthetics of physical methods of euthanasia of anesthetized rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 695-701.
- Himuro, S., Ueno, S., Noguchi, N., Uchikawa, T., & Watanabe, K. (2014). Safety evaluation of mutagenicity, acute and subacute toxicity study of *Chlorella vulgaris* CK-22 in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*, 1(4), 151-159 doi: 10.2131/fts.1.151.

- Hutadilok-Towatana, N., Reanmongkol, W., Satitit, S., Panichayupakaranant, P., & Ritthisunthorn, P. (2008). A subchronic toxicity study of *Spirulina platensis*. *Food Science and Technology Research*, 14(4), 351-358. doi: 10.3136/fstr.14.351.
- Hutadilok-Towatana, N., Reanmongkol, W., & Panichayupakaranant, P. (2010). Evaluation of the toxicity of *Arthrospira (Spirulina) plantensis* extract. *Journal of Applied Phycology*, 22(5), 599-605. doi: 10.1007/s10811-009-9499-5
- ITIS. (2020a). *Chlorella* Beijerinck, 1890. Retrieved from: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=5811#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=5811#null)
- ITIS. (2020b). *Arthrospira* Sitzenberger Ex Gomont, 1893. Retrieved from: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=1090#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=1090#null)
- Kambou, P. S., Bleyere, M. N., Attemene, S. D. D., Tiahou, G. G., Dembele, A., & Sess, D. E. (2015). Antianaemic effect of *Spirulina* in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), a made and used food supplement in Côte d'Ivoire. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 3(9), 725-732.
- Krishnakumari, M. K., Ramesh, H. P., & Venkataraman, L. V. (1981). Food safety evaluation: Acute oral and dermal effects of the algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. *Journal of Food Protection*, 44(12), 934-935.
- Nakano, S., Takekoshi, H., & Nakano, M. (2010). *Chlorella pyrenoidosa* supplementation reduces the risk of anemia, proteinuria and edema in pregnant women. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 25-30. doi: 10.1007/s11130-009-0145-9.
- Nasseri, A. T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2011). Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 103-116 doi: 10.3923/ajft.2011.103.116.
- NRC. (1995). *Nutrient requirement of laboratory animals: Rat (fourth revised edition)*. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture National Research Council. Washington D. C., USA: National Academy Press.
- OECD. (2002). *Test no. 420 acute oral toxicity - fixed dose procedure. OECD guideline for testing of chemicals: Section 4*. Paris: OECD Publishing.
- Parasuraman, S. (2011). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2(2), 74-79. doi: 10.4103/0976-500X.81895.
- Prasanth, K. M., Suba, V., Ramireddy, B., & Srinivasa, B.P. (2015). Acute and subchronic oral toxicity assessment of the ethanolic extract of the root of *Oncoba spinosa (Flacourtiaceae)* in Rodents. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(10), 1849-1855. doi: 10.4314/tjpr.v14i10.16.
- Selmi, C., Leung, P. S. C, Fischer, L., German, B., Yang, C. Y., Kenny, T. P., ... Gershwin, M. E. (2011). The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(3), 248-254. doi: 10.1038/cmi.2010.76.
- Simsek, N., Karadeniz, A., Kalkan, Y., Keles, O. N., & Unal, B. (2009). *Spirulina platensis* feeding inhibited the anemia- and leucopenia-induced lead and cadmium in rats. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1304-1309 doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.041.
- Sutrisni, N. N. W., Soewandhi, S. N., Adnyana, I. K., & Sasongko, L. D. N. (2019). Acute and subchronic (28-day) oral toxicity studies on the film formulation of k-carrageenan and konjac glucomannan for soft capsule application. *Scientia Pharmaceutica*, 87(9). doi: 10.3390/sci pharm87020009.
- Weiss, D. J., & Wardrop, K. J. (2011). *Schalm's Veterinary Hematology sixth edition*. Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., ... Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29, 949-982. doi: 10.1007/s10811-016-0974-5.
- Widiyanto, S., Mulyati., Fitria, L., Hartantyo, R. Y., & Suyono, E. A. (2018). Biochemical compounds and sub-chronic toxicity test of *Chlorella* sp. and *Spirulina* sp. isolated from Glagah Coastal Water. *Journal of Biological Researches*, 24(1), 58-64. doi: 10.23869/bphjbr.24.1.20189.

Wiedmeyer, C. E. (2018). Evaluation of hepatic function and injury. In D. M. Kurtz, & G. S. Travlos (Eds.). *The clinical chemistry of laboratory animals third edition*. Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.