

**UJI TOKSISITI ASAM  $\alpha$ -LINOLENIK RUMPUT LAUT *Ulva* sp. TERHADAP *Chattonella marina* DAN *Heterosigma akashiwo***

**TOXICITY ASSAY OF  $\alpha$ -LINOLENIC ACID FROM *Ulva* sp. SEAWEED ON *Chattonella marina* AND *Heterosigma akashiwo***

**Moch. Amin Alamsjah**

Fakultas Perikanan dan Kelautan - Universitas Airlangga  
Kampus C UNAIR Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. 031-5911451  
E-mail : alamsjah@unair.ac.id ; alamsjah\_70@yahoo.com  
Telp./Fax. 031-5028709, 5911451

**Abstract**

The higher toxicity of  $\alpha$ -linolenic acid from *Ulva* sp. seaweed showed the high algicidal activity against *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*. Among six species tested, *C. marina* and *H. akashiwo* was the most susceptible to this fatty acid, whereas LC<sub>50</sub> of  $\alpha$ -linolenic acid was estimated to be 3.22 and 0.58  $\mu$ g/mL, respectively. Furthermore,  $\alpha$ -linolenic acid also showed algicidal activity against *Alexandrium tamarense* and *A. taylori*. It is suggested that  $\alpha$ -linolenic acid is useful mitigation agents to Harmful Algal Bloom effect, especially on *Chattonella marina* and *Heterosigma akashiwo*.

**Key words :** *Ulva* sp.,  $\alpha$ -linolenic acid, *Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo*

**Pendahuluan**

Pada tiga dasawarsa terakhir telah banyak eksplorasi penemuan bahan aktif dari organisma maupun substansi laut yang dilakukan (Smit, 2004), seperti halnya eksplorasi bahan aktif rumput laut. Suzuki et al. (1998) telah mengisolasi bahan aktif algicidal dari crustose coralline algae, *Lithophyllum* spp., terhadap kelulushidupan Harmful Algal Bloom (HAB) *Heterosigma akashiwo* dan zoospora alga coklat *Laminaria religiosa*. Perbedaan aktifitas bahan aktif rumput laut dari kelompok PUFA diyakini juga memberikan perbedaan tekanan pertumbuhan Harmful Algal Bloom (HAB) species (Alamsjah et al., 2006). Namun, keberadaan bahan aktif dari jenis rumput laut *Ulva* sp. belum banyak diketahui terhadap kelulushidupan HAB species sehingga dapat dijadikan dasar pengembangan penggunaan bahan aktif rumput laut *Ulva* sp. lebih jauh.

**Materi dan Metode Penelitian**

Koleksi rumput laut *Ulva* sp.

Koleksi rumput laut dari intertidal area dikumpulkan selama 3 bulan pertama jangka waktu penelitian. Kerusakan ekologi selama pengambilan sampel diupayakan seminimal mungkin dengan tidak merusak algal stem. Semua sampel di bawa ke laboratorium dalam plastic bag yang mengandung air laut untuk mencegah evaporasi, kemudian mencucinya dengan distilled water untuk memisahkan potential contaminant. Untuk kelayakan

penggunaan selanjutnya, sebagian koleksi rumput laut dikeringkan selama 5 hari pada temperatur kamar dan digiling menjadi powder dengan menggunakan blender.

**Skreening aktifitas algicidal**

Fragment rumput laut diperlakukan dalam methanol dan water ekstraksi berdasarkan metoda Jeong et al. (2000) dengan minor modifikasi. Setiap 100 mg sampel kering di rendam dalam 5 ml methanol pada temperatur kamar selama 24 jam dan di filter melalui filter paper no. 2 (Advantec) dengan tekanan. Prosedur ekstraksi di ulang tiga kali kemudian digabung. Residual tissue dikeringkan dan selanjutnya di ekstraksi dengan distilled water selama 24 jam pada temperatur kamar.

**Ekstraksi, isolasi dan struktural determinasi substansi algicidal**

Rumput laut terpilih di blender dan di ekstraksi menggunakan methanol. Setelah melepaskan methanol dalam kondisi reduced pressure, selanjutnya residu dipisahkan antara air dan hexane. Hexane extract dikonsentrasikan dan di ekstrak dengan aqueous HCl dan dilanjutkan 50% aqueous MeOH. Hexane layer kemudian dikonsentrasikan sehingga meninggalkan deep green oily residue. Tahap berikutnya adalah chromatographi pada silica gel (63-230  $\mu$ m) dan di elusi dengan gradient hexane-EtOAc. Active fraction di kromatografi pada Octadecyl-S (50  $\mu$ m) dan di elusi dengan

90% methanol. Kemudian purifikasi HPLC dengan Cosmosil 5C18-MS-II, 20 x 250 mm, 80% CH<sub>3</sub>CN, flow rate 5 mL min<sup>-1</sup>. Active fraction dipurifikasi lagi dengan TLC RP-18 (Merck, 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 mm) menggunakan 85% CH<sub>3</sub>CN sebagai solvent untuk menghasilkan compound akhir. Struktural determinasi substansi algicidal rumput laut terseleksi dilanjutkan dengan menggunakan analisa NMR, MS dan IR spectroscopy.

#### Toxicity test pada red tide phytoplankton

Red tide phytoplankton species (*Chattonella marina*, *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium tamarense*, *A. taylori*, *Gymnodinium impudicum* dan *Heterocapsa circularisquama*) di kultur dalam medium ESM (Erd-Schreiber modified) pada pH 8,2 dalam kondisi iluminasi 40  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  dengan 40 watt fluorescent lamps FL40SD (Toshiba) dengan photoperiode 12L : 12D. Semua kultur menggunakan 100 ml Erlenmeyer flask sterilized dengan 50 ml medium. Uji toxicity test pada semua jenis phytoplankton diperlakukan pada 24 well microplate (1 ml/well) dengan beberapa konsentrasi yang berbeda struktur kimia substansi algicidal rumput laut terseleksi, selama 24 jam. Perhitungan kelulushidupan phytoplankton dilakukan dengan menggunakan haemocytometer.

#### Hasil dan Pembahasan

Melalui analisa NMR diperoleh bahan aktif dari rumput laut *Ulva* sp. adalah asam  $\alpha$ -linolenik dengan perincian sebagai berikut : NMR  $\delta_{\text{H}}$  (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,98 (t, 3H,  $J = 7,6$  Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,27-1,37 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>- x 4), 1,59-1,67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 2,01-2,11 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>- x 2), 2,35 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 2,77-2,85 (m, 4H, CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH x 2), 5,28-5,43 (m, 6H, -CH=CH- x 3), 7.26 (br. s, 1H, -COOH). NMR  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14,3 (-CH<sub>3</sub>), 20,6 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 24,8 (CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 25,6 (CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 27,2 (-CH<sub>2</sub>-CH=CH), 29,1 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>COOH), 29,1 (-CH<sub>2</sub>-), 29,2 (-CH<sub>2</sub>-), 29,6 (-CH<sub>2</sub>-), 29,7 (-CH<sub>2</sub>-), 34,0 (-CH<sub>2</sub>-COOH), 127,0 (-CH=CH-), 127,6 (-CH=CH-), 128,1 (-CH=CH-), 128,2 (-CH=CH-), 130,1 (-CH=CH-), 131,9 (-CH=CH-), 180,6 (COOH). EIMS  $m/z$ : 278 (M<sup>+</sup>, base), 228, 222, 108, 95, 79, 75, 67, 55. HRMS  $m/z$  (M<sup>+</sup>): Perhitungan untuk C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>: 278,2246 dan didapatkan 278,2229.

Pengaruh dari  $\alpha$ -linolenik terhadap raphidophyceae *C. marina* dan *H. akashiwo* menunjukkan hambatan terbesar, dimana

berdasarkan nilai LC<sub>50</sub> dari  $\alpha$ -linolenik terhadap *C. marina* sebesar 3,22  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan pengaruh asam  $\alpha$ -linolenik terhadap *H. akashiwo* sebesar 0,58  $\mu\text{g/mL}$  (Gambar 1 dan Tabel 1).

Tabel 1. Nilai LC<sub>50</sub> dari asam linoleik dan  $\alpha$ -linolenik terhadap beberapa HAB species dengan lama perlakuan 24 jam

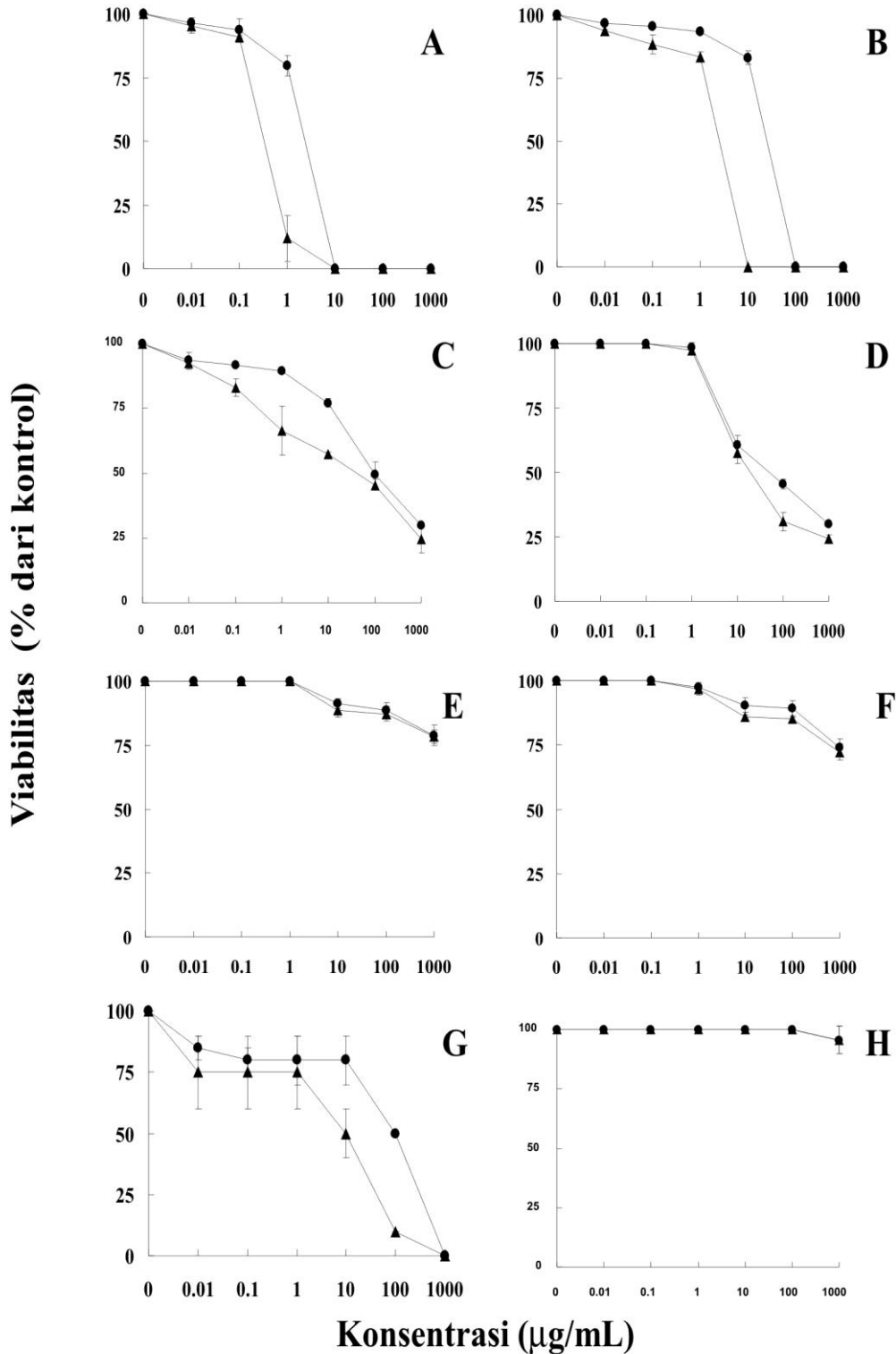
Species	LC <sub>50</sub> asam $\alpha$ -linolenik ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Alexandrium tamarense</i>	66,06
<i>Alexandrium taylori</i>	35,30
<i>Chattonella marina</i>	3,22
<i>Heterosigma akashiwo</i>	0,58
<i>Heterocapsa circularisquama</i>	>1000
<i>Gymnodinium impudicum</i>	>1000

Kemampuan toksik dari PUFA asam  $\alpha$ -linolenik di duga berhubungan dengan *amphiphatic property* yang dimiliki oleh struktur asam lemak tak jenuh, sehingga mengganggu bahkan merusak integritas membran sel red tide phytoplankton species. Struktur kimia dengan perbedaan jumlah double karbon asam lemak tak jenuh diamati juga berhubungan dengan aktifitas biologi yang dimiliki oleh red tide phytoplankton species *H. akashiwo*. Hasil dalam studi ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Suzuki *et al.* (1996) dan Sellem *et al.* (2000). Kakisawa *et al.* (1988) juga melaporkan bahwa PUFA sangat efektif dalam menekan kelulushidupan HAB species yang tidak mengandung dinding sel yang kuat. Ikawa (2004) mencoba menjelaskan tentang pengaruh hambatan yang dimiliki PUFA terhadap pertumbuhan phytoplankton dengan cara mempengaruhi lapisan lipid bilayer dari membran sel. Murata *et al.* (1989) dan Oda *et al.* (1992) juga melaporkan bahwa aktifitas toksik PUFA kemungkinan disebabkan adanya proses oksidasi, sedangkan Kogteva dan Bezuglov (1998) menyatakan bahwa aktifitas toksik PUFA kemungkinan karena peranannya sebagai second messenger yang mengatur fungsionalisasi aktifitas protein selanjutnya.

Bahan aktif rumput laut *Ulva* sp. berupa asam  $\alpha$ -linolenik menunjukkan sebagai substans yang mampu menekan pertumbuhan red tide phytoplankton, selain kelebihan dari komponen asam lemak tak jenuh yang relatif stabil dibandingkan asam lemak jenuh. Sargent *et al.* (1987) juga melaporkan bahwa penyimpanan kandungan asam lemak jenuh sangat dipengaruhi kondisi lingkungan dan sangat berbeda dengan asam lemak tak jenuh

yang relatif stabil. Pada akhirnya, biosintesis PUFA asam  $\alpha$ -linolenik dari *Ulva* sp. diharapkan dapat dieksplorasi lebih lanjut untuk

dijadikan bahan aktif algicidal yang potensial dalam mengontrol keberadaan HAB species.



Gambar 1. Efek toksik dari (●) asam linoleik dan (▲) asam  $\alpha$ -linolenik terhadap (A) *Chattonella marina*, (B) *Heterosigma akashiwo*, (C) *Alexandrium tamarense*, (D) *A. taylori*, (E) *Gymnodinium impudicum*, (F) *Heterocapsa circularisquama*, (G) *Brachionus plicatilis* and (H) *Artemia* sp. Tiap point menunjukkan rata-rata dari tiga kali ulangan dan setiap garis bar menunjukkan besaran SD.

### Kesimpulan dan Saran

Faktor pertimbangan utama dalam melakukan seleksi metoda untuk mengontrol HAB species adalah efektivitas, toksisitas, biaya dan cara aplikasinya. Distribusi *Ulva* sp. hampir dapat ditemukan di seluruh perairan dunia sehingga peluang untuk menganalisa berbagai bahan aktif algicidal yang dimiliki sebagai terobosan baru bagi pengembangan eksplorasi bioteknologi sumber daya perairan. Berdasarkan karakteristik tersebut, *Ulva* sp. sangat potensial sebagai biokontrol untuk HAB species, dimana bahan aktif asam  $\alpha$ -linolenik dari *Ulva* sp. mampu menekan pertumbuhan HAB species.

### Daftar Pustaka

- Alamsjah MA, Ishibashi F, Kitamura H, Fujita Y (2006) The effectiveness of *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) as algicidal substances on harmful algal bloom species. *Aquacult. Sci.* 54: 325-334.
- Ikawa M (2004) Algal polyunsaturated fatty acids and effects on plankton ecology and other organisms. *UNH Center Freswat. Biol. Res.* 6: 17-44.
- Jeong JH, Jin HJ, Sohn CH, Suh KH, Hong YK (2000) Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. *J. Appl. Phycol.* 12: 37-43.
- Kakisawa H, Asari F, Kusumi T, Toma T, Sakurai T, Oohusa T, Hara Y, Chiharai M (1988) An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon okamuranus*. *Phytochem.* 27: 731-735.
- Kogteva GS, Bezuglov VV (1998) Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochem. (Moscow)* 63: 6-15.
- Murata H, Sakai T, Endo M, Kuroki A, Kimura M, Kumanda K (1989) Screening of removal agents of a red tide plankton *Chattonella marina* with special reference to the ability of the free radicals derived from the hydrogen peroxyde and polyunsaturated fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1075-1082.
- Oda T, Ishimatsu A, Shimada M, Takeshita S, Muramatsu T (1992) Oxygen-radical-mediated toxic effects of the red tide flagellate *Chattonella marina* on *Vibrio alginolyticus*. *Mar. Biol.* 112: 505-509.
- Sargent JR, Parkes RJ, Mueller-Harvey I, Henderson J (1987) Lipid biomarkers in marine ecology. In Sleight MA (ed) *Microbes in the sea*. Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom, 119-138.
- Sellem F, Pesando D, Bodennec G, Abed AE, Girard JP (2000) Toxic effects of *Gymnodinium cf. mikimotoi* unsaturated fatty acids to gametes and embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Water Res.* 34: 550-556.
- Smit AJ (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245-262.
- Suzuki M, Wakana I, Denboh T, Tatewaki M (1996) An allelopathic polyunsaturated fatty acid from red algae. *Phytochem.* 43: 63-65.
- Suzuki Y, Takabayashi T, Kawaguchi T, Matsunaga K (1998) Isolation of an allelopathic substance from the crustose coralline algae, *Litophyllum* spp., and its effect on the brown alga, *Laminaria religiosa* Miyabe (Phaeophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 225: 69-77.