

TOKSISITAS AKUT EKSTRAK METANOL RUMPUT LAUT COKELAT *Sargassum echinocarpum*

Acute Oral Toxicity of Methanol Extract from Brown Algae Sargassum echinocarpum

Muhamad Firdaus*¹, Made Astawan², Deddy Muchtadi², Tutik Wresdiyati³, Sarwono Waspadji⁴, Setyawati S. Karyono⁵

¹Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya

²Dept. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

³Lab Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

⁴Dept. Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

⁵Lab. Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

Diterima 2 Juni 2012/Disetujui 27 Juli 2012

Abstract

The aim of this study was to evaluate acute toxicity of methanol extract of *Sargassum echinocarpum* on male and female of mice (*Mus musculus*) strain BALB/c two month age. *S. echinocarpum* was obtained from Talango Island in April 2008. The powder of *S. echinocarpum* was macerated by methanol (1:3) at 4 °C for 3 x 24 hours, then concentrated, dried, and extracted. The extract was screened to observe the phytochemical compounds. For acute toxicity extracts was given orally and once on one hour before feeding. The dose treatments were 0; 625; 1250; 2500; and 5000 mg/kg body weight (BW). Parameters measured were phytochemical contain, body weight during the study, 50 percent of lethal doses, and histology score of liver and kidney. The phytochemical study showed that methanol extract of *S. echinocarpum* contained tannins, polyphenols, saponins, glycosides, and steroids. On 1250 mg/kg BW or more, methanol extract of *S. echinocarpum* inhibited the increasing of body weight on mice, but, until 5000 mg/kg BW, it did not cause mortality on mice. On 1250 mg/kg BW or more, methanol extracts caused necrosis on hepatocyt and tubulus.

Key words: acute toxicity, methanol extract, *Sargassum echinocarpum*

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi toksistas akut ekstrak metanol *Sargassum echinocarpum* pada mencit (*Mus musculus*) strain BALB/c umur 2 bulan, jenis kelamin jantan dan betina. *S. echinocarpum* didapat dari perairan pulau Talango pada April 2008. Tepung *S. echinocarpum* dimaserasi menggunakan metanol (1:3) pada suhu 4 °C selama 3 x 24 jam, lalu dipekatkan, dikeringkan dan didapatkan ekstrak. Ekstrak ditapis untuk mengetahui kandungan fitokimianya. Ekstrak diberikan untuk uji toksistas akut secara oral dan sekali satu jam sebelum pemberian ransum. Dosis perlakuan meliputi: 0; 625; 1250; 2500; dan 5000 mg/kg bobot badan (BB). Parameter yang diamati: kenaikan bobot badan selama masa uji, dosis kematian 50 persen, dan skor histologis hati dan ginjal mencit uji. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol *S. echinocarpum* mengandung tanin, polifenol, saponin, glikosida, dan steroid. Pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* ≥ 1250 mg/kg BB dapat menghambat kenaikan bobot badan, namun hingga 5000 mg/kg BB tidak mengakibatkan kematian. Pengamatan histopatologis menunjukkan bahwa dosis pada 1250 mg/kg BB atau lebih dapat mengakibatkan nekrosis pada hepatosit dan tubulus.

Kata kunci: ekstrak metanol, *Sargassum echinocarpum*, toksistas akut

PENDAHULUAN

Sargassum adalah salah satu rumput laut yang banyak terdapat di perairan

Indonesia. Rumput laut cokelat ini kaya akan zat gizi dan bioaktif. Ada 11 jenis *Sargassum* yang ditemukan di perairan Indonesia, yaitu: *Sargassum binderi*, *S. crassifolium*, *S. plagyophyllum*, *S. mollerii*, *S. siliquosum*, *S. hystrix*, *S. gracilimum*, *S. duplicatum*, *S.*

*Korespondensi: Jln. Veteran Malang, Telp. +6281332774099 e-mail: muhamadfir@yahoo.com

cinereum, *S. polycystum* dan *S. echinocarpum* (Kadi 2005).

Di Indonesia meski tidak tercatat dalam literatur obat tradisional, ternyata di lingkungan masyarakat pesisir beberapa jenis rumput laut sudah sejak lama digunakan untuk pengobatan. Studi etnofarmakologi di beberapa daerah di Indonesia diketahui bahwa 21 jenis dari 12 marga rumput laut sudah terbiasa digunakan sebagai obat tradisional, yang meliputi 11 jenis dari 7 marga alga merah, 7 jenis dari 4 marga alga hijau dan 3 jenis dari 1 marga alga cokelat (Anggadireja *et al.* 1996).

Bahan alam telah lama dan secara tradisional banyak digunakan oleh masyarakat untuk memelihara kesehatan bahkan untuk pengobatan penyakit. Masyarakat lebih menyukai menggunakan bahan alam untuk keperluan tersebut karena diketahui dan dipercayai serta sudah turun temurun tidak menimbulkan efek samping pada kesehatan. Studi manfaat fisiologis rumput laut bagi kesehatan baru dilakukan pada awal tahun 1980-an dan salah satu hasilnya bahwa *Sargassum* sp dapat beraktivitas hipoglikemik (Lamela *et al.* 1989).

Studi pendahuluan kami menunjukkan bahwa *S. echinocarpum* yang diperoleh dari Perairan Pulau Talango mempunyai aktivitas antioksidan, antihiperlipidemia, antikegemukan, antistres oksidatif, dan pencegah komplikasi diabetes melitus (Firdaus *et al.* 2007; Firdaus *et al.* 2010a; Firdaus *et al.* 2010b).

Pengembangan bahan alam menjadi agen atau bahan yang dapat memberikan manfaat kesehatan bagi manusia memerlukan studi aktivitas, kestabilan, dan keamanan (Hays *et al.* 2008). Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan informasi mengenai toksisitas akut ekstrak metanol *S. echinocarpum*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah rumput laut cokelat (*S. echinocarpum*) yang diperoleh pada bulan April 2008 dari Perairan Pulau Talango,

Kabupaten Sumenep, Jawa Timur; metanol p.a. (Merck); mencit (*Mus musculus*) strain BALB/c jantan dan betina berumur 2 bulan dari Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. Ekstrak metanol *S. echinocarpum* diperoleh berdasarkan metode Koivikko *et al.* (2005) yakni ekstraksi, sentrifugasi, evaporasi, dan pengeringan. Bahan lainnya adalah ransum, akuades, dan minyak wijen.

Metode Penelitian

Fitokimia

Analisis fitokimia terhadap ekstrak metanol dilakukan menurut Harborne (1984). Pengujian kualitatif ekstrak metanol *S. echinocarpum* meliputi tanin, polifenol, alkaloid, saponin, glikosida, steroid, flavonoid, dan terpenoid.

Toksitas akut (OECD 2001)

Seluruh prosedur pemeliharaan, penggunaan dan perlakuan terhadap hewan uji telah disetujui oleh komisi etik penelitian hewan, Universitas Brawijaya dengan nomor 34-KE tahun 2009.

Mencit dibagi secara acak dalam lima kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas enam ekor yang terdiri atas tiga ekor jantan dan tiga ekor betina. Mencit diaklimatisasi dalam laboratorium selama tujuh hari. Sebelum diperlakukan, mencit dipuaskan selama 3-4 jam dengan tetap diberi minum. Dosis ekstrak metanol *S. echinocarpum* yang diberikan berdasarkan Nagayama *et al.* (2002) dan OECD (2001) yaitu: 0, 625, 1250, 2500, dan 5000 mg/kg BB. Ekstrak diberikan secara oral dengan sonde satu jam sebelum pemberian ransum standar. Ransum standar dibuat dengan komposisi: karbohidrat 75%, protein 8%, lemak 5%, mineral 5%, vitamin 1%, serat 1%, dan air 5%. Karbohidrat bersumber dari pati jagung, protein dari kasein, lemak dari minyak jagung, dan serat dari *carboxy methyl cellulose* (CMC). Ransum dan air minum diberikan secara *ad libitum*, selanjutnya dalam 24 jam pertama hewan uji diamati jumlahnya yang mati, bila tidak ada

yang mati pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari dengan mengamati perubahan bobot badan harian. Penimbangan bobot badan dilakukan pada pagi hari sebelum pemberian ransum. Persentase kenaikan bobot badan dinyatakan sebagai persen nisbah perubahan bobot badan terhadap bobot badan awal.

Dosis Kematian 50% (*Lethal Dose 50%/LD₅₀*)

Nilai LD_{50} ditentukan berdasar nisbah jumlah hewan percobaan yang mati dan jumlah hewan uji tiap kelompok dan dinyatakan dalam persen. Nilai yang didapat selanjutnya dilihat nilai probitnya pada tabel harga probit, dosis perlakuan dikonversi menjadi log. Dosis toksistas akut 50% (LD_{50}) ditentukan berdasar hubungan persamaan linier antara konsentrasi dosis (dalam log) sebagai nilai absis (x) dan nilai probit sebagai ordinat (y).

Perubahan Histopatologi Hati dan Ginjal

Pengamatan histopatologi dilakukan pada akhir masa uji atau pada hewan uji yang mati untuk mengamati perubahan sel atau jaringan pada hati dan ginjal mencit uji. Mula-mula mencit dipingsankan dengan cara *dislocatio cervicalis*, selanjutnya perut dibedah. Hati dan ginjal diambil, dicuci, dan dimasukkan dalam cairan formalin 10%. Sediaan histopatologis meliputi tahapan: persiapan jaringan, pembuatan blok, pemotongan blok, pemasangan pita sayatan, pewarnaan, penjernihan dan *mounting*. Pewarnaan terhadap sayatan jaringan menggunakan haematoksilin dan eosin.

Pengamatan perubahan morfologi menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400X. Tiap bagian sampel masing-masing diwakili oleh sediaan dan perhitungan dilakukan pada tiga lapang pandang yang diambil secara acak. Pengamatan mikroskopis hati dan ginjal didasarkan pada perubahan jaringan.

Skor pembacaan perubahan histopatologis hati yaitu: 0 = normal, 1 = ringan, 2 = moderat,

dan 3 = parah. Hepatosit dinyatakan tidak mengalami nekrosis (normal) bila tidak ada piknosis, kariolisis, karioreksis, dan sel radang, Hepatosit dinyatakan nekrosis ringan bila perubahannya $<1/3$, moderat bila perubahannya $1/3-2/3$, dan parah bila perubahannya $>2/3$ tiap lapang pandang (Sigala *et al.* 2006).

Skor pembacaan perubahan histopatologis ginjal yaitu: 0 = normal, 1 = ringan, 2 = moderat, dan 3 = parah. Perubahan tubulus ginjal dinyatakan normal bila tidak ada dilatasi, sel epitel yang terkelupas, penggabungan antar tubulus, membran dasar tubulus yang hilang, dan nekrosis. Perubahan ringan bila perubahannya $<1/3$, moderat bila perubahannya $1/3-2/3$, dan parah bila perubahannya $>2/3$ tiap lapang pandang (Bayrak *et al.* 2008).

Analisis Data

Data persentase kenaikan bobot badan dan LD_{50} didapat dari rerata enam hewan uji. Data perubahan histopatologis dinyatakan sebagai rerata dari lima lapang pandang tiap preparat. Analisis data dilakukan dengan analisis keragaman satu arah dan perbedaan antar perlakuan diuji dengan beda nyata terkecil dengan tingkat kepercayaan 1%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mendapatkan gambaran secara kualitatif suatu simplisia atau ekstrak. Hasil uji fitokimia ekstrak metanol *S. echinocarpum* disajikan pada Tabel 1.

Tanin dan polifenol yang terdapat pada rumput laut cokelat menurut Singh and Bharate (2006) adalah florotanin. Hasil penapisan menunjukkan ekstrak metanol *S. echinocarpum* positif lemah mengandung saponin, hal ini kemungkinan karena keberadaan glikon dan steroidnya. Springbob dan Kutchan (2009) menyatakan saponin adalah glikosida yang aglikonnya berupa steroid atau triterpenoid. Steroid yang terkandung dalam *Sargassum* sp utamanya berupa fukosterol dan saringosterol,

Tabel 1 Fitokimia ekstrak metanol *S. echinocarpum*

Fitokimia	Keterangan
Tanin	+
Polifenol	+
Alkaloid	-
Saponin	+
Glikosida	+
Steroid	+
Flavonoid	-
Triterpenoid	-

seperti yang terdapat dalam *S. fluitans*, *S. vulgare*, *S. furcatum*, *S. carpophyllum*, dan *S. pallidum* (Liu et al. 2009).

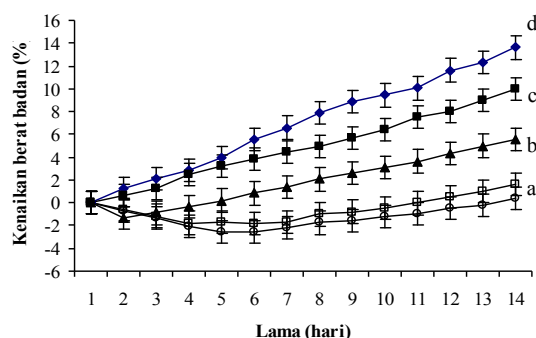
Bobot badan

Hasil analisis data menunjukkan bahwa kenaikan bobot badan mencit antar perlakuan pada akhir masa penelitian berbeda sangat nyata ($p < 0,01$), kecuali antara perlakuan dosis 2500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB yang tidak menunjukkan perbedaan ($p = 0,341$). Kenaikan bobot badan mencit uji akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* selama masa uji toksisitas disajikan pada Gambar 1.

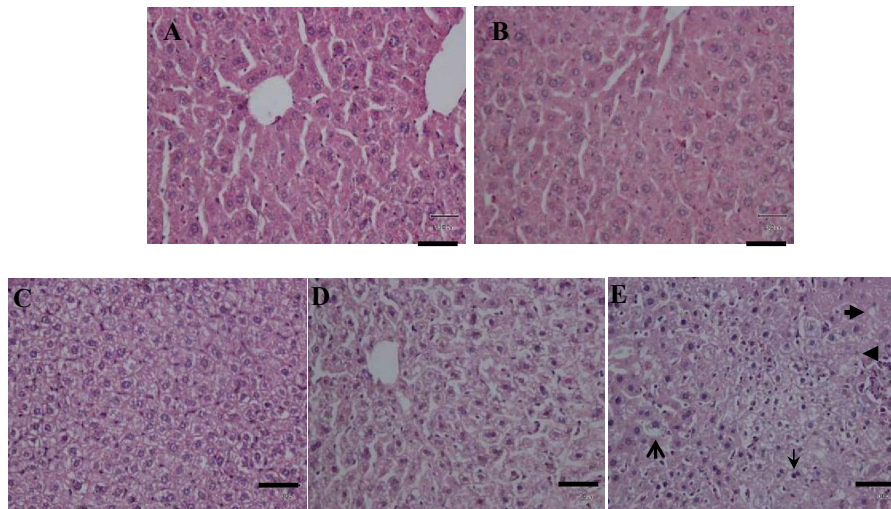
Kenaikan bobot badan hewan uji mengalami hambatan akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum*, kecuali perlakuan dosis 625 mg/kg BB. Perlakuan ini menunjukkan kecenderungan kenaikan

yang hampir sama dengan perlakuan kontrol negatif, walau pada akhir masa uji, keduanya mengalami perbedaan sangat nyata ($p < 0,01$). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dosis 625 mg/kg BB ekstrak metanol *S. echinocarpum* tidak mengakibatkan gangguan metabolisme dalam hewan uji. Nagayama et al. (2002) melaporkan bahwa mencit yang diberi ekstrak *Ecklonia kurome* tidak mengalami gangguan pertumbuhan. Pertumbuhan suatu organisme sangat tergantung pada penyerapan dan ketersediaan (*bioavailability*) zat gizi, termasuk protein, dalam tubuh. Ketiadaan hambatan kenaikan bobot badan ini menunjukkan bahwa proses penyerapan protein dalam saluran pencernaan tidak terganggu oleh keberadaan florotanin (Stern et al. 1996).

Perlakuan ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis 1250 mg/kg BB, 2500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB pada awal perlakuan mengakibatkan hambatan dan penurunan bobot badan hewan uji, namun selanjutnya hewan uji mengalami kenaikan bobot badan. Ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis 1250 mg/kg BB dapat mengakibatkan hambatan kenaikan bobot badan hingga hari ke-2, sedang dosis 2500 mg/kg BB dan 5000 mg/kg BB hingga hari ke-6. Stern et al. (1996) menyatakan ekstrak rumput laut cokelat dapat menghambat pertumbuhan organisme bila kadar yang dikonsumsi > 10 g tiap kg bobot badan, hal ini diakibatkan adanya kemampuan florotanin dalam ekstrak rumput laut cokelat untuk membentuk ikatan



Gambar 1 Persentase kenaikan bobot badan mencit akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* dengan konsentrasi 0 (◆), 625 (■), 1250 (▲), 2500 (□), dan 5000 mg/kg (○).



Gambar 2 Fotomikrograf hati mencit akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis 0 mg/kg BB (A), 625 mg/kg BB (B), 1250 mg/kg BB (C), 2500 mg/kg BB (D), dan 5000 mg/kg BB (E). (Perbesaran 400 x) (Pewarnaan H&E) (= 15 μ m). Keterangan: \blacktriangleleft = sel radang, \blackrightarrow = nekrosis, \blacktriangleright = vakuola, dan \blacktriangleright = steatosis.

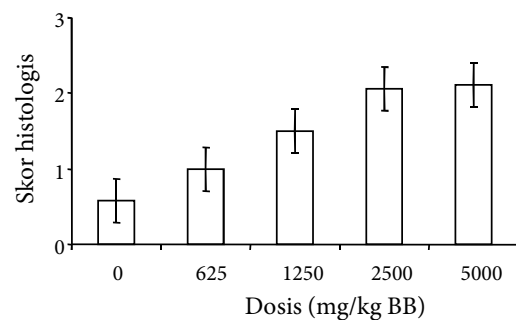
hidrogen dengan protein termasuk enzim dalam saluran pencernaan.

Dosis kematian 50% (LD_{50})

Hasil uji menunjukkan bahwa pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* sekali secara oral hingga dosis 5000 mg/kg BB tidak mengakibatkan kematian pada mencit uji, hal serupa dilaporkan oleh Nagayama *et al.* (2002) bahwa ekstrak *E. kurome* yang diberikan pada mencit pada suatu uji toksistas akut dengan dosis mencapai 5000 mg/kg tidak mengakibatkan kematian, hal ini menunjukkan bahwa komponen atau senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol *S. echinocarpum* tergolong senyawa yang relatif tidak toksik. Derelanko dan Holinger (1995) menggolongkan bahwa suatu bahan atau senyawa bila dikonsumsi secara oral pada hewan percobaan dengan dosis 5000 mg/kg BB dan tidak mengakibatkan kematian tergolong toksik yang moderat, dan bila lebih dari 15000 mg/kg BB dinyatakan sebagai senyawa yang tidak toksik.

Histopatologis hati dan ginjal

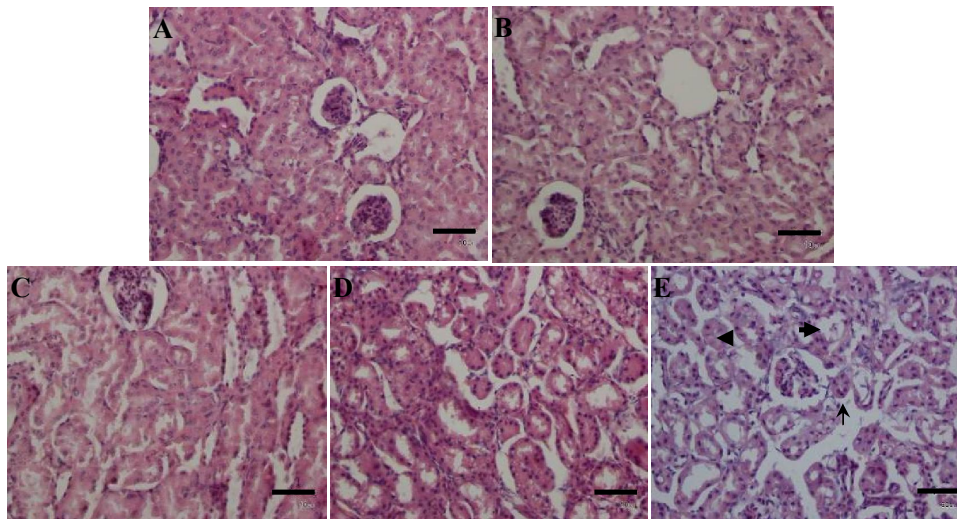
Hasil analisis data menunjukkan bahwa skor histologis hati mencit antar perlakuan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$). Fotomikrograf



Gambar 3 Skor histologis hati mencit akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum*.

dan skor histologis hati mencit yang diberi ekstrak metanol *S. echinocarpum* disajikan pada Gambar 2 dan 3.

Pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis >1250 mg/kg BB pada mencit uji telah dapat mengakibatkan perubahan histologis pada hepatosit hingga mengalami nekrosis. Sudha *et al.* (2008) dan Hsu *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemberian tanin >1500 mg/kg BB dapat mengakibatkan kerusakan hati (hepatotoksik). Ada dua hal yang memungkinkan tanin pada dosis tersebut bersifat hepatotoksik, yakni: (1) pada dosis tersebut, tanin dapat merusak membran mitokondria. Perusakan ini akan memicu pembentukan spesies oksigen

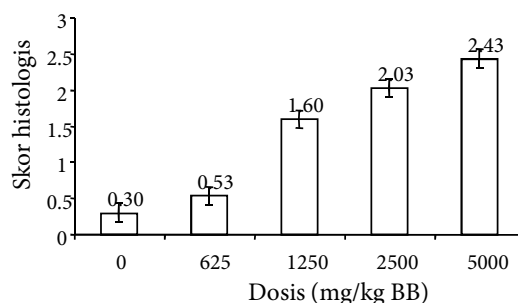


Gambar 4 Fotomikrograf tubulus ginjal mencit akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis 0 mg/kg BB (A), 625 mg/kg BB (B), 1250 mg/kg BB (C), 2500 mg/kg BB (D), dan 5000 mg/kg BB (E). (Perbesaran 400 x) (Pewarnaan H&E) (= 15 µm). Keterangan: ◀ = dilatasi, ▶ = nekrosis, ► = epitel terkelupas.

reaktif hingga dapat memberi efek sitotoksik dan (2) pemberian dosis yang sangat besar sekaligus dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. Damjanov (1996) menyatakan bila rangsangan luar yang mengenai jaringan atau sel melebihi kapasitas sel beradaptasi, maka akan terjadi cedera sel tak balik dan akhirnya sel mati (nekrosis).

Hasil analisis data menunjukkan bahwa skor histologis ginjal mencit antar perlakuan berbeda sangat nyata ($p < 0,01$). Fotomikrograf dan skor histologis ginjal mencit yang diberi ekstrak metanol *S. echinocarpum* disajikan pada Gambar 4 dan 5.

Pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum* dosis >1250 mg/kg BB pada mencit uji telah dapat mengakibatkan perubahan histologis pada tubulus ginjal hingga mengalami nekrosis. Sudha *et al.* (2008) dan Hsu *et al.* (2011) menunjukkan bahwa pemberian tanin >1500 mg/kg BB dapat mengakibatkan kerusakan ginjal dan nefrotoksik, hal ini dimungkinkan karena adanya efek lipid peroksidasi dan pemekatan tanin pada tubulus. Rodrigo dan Rivera (2002) menyatakan kerusakan atau kematian sel ginjal dapat diakibatkan oleh stres oksidatif. Hervas *et al.* (2003) menyatakan lipid peroksidasi



Gambar 3 Skor histologis ginjal mencit akibat pemberian ekstrak metanol *S. echinocarpum*..

dapat dipicu oleh pemberian tanin >1500 mg/kg BB melalui mekanisme perusakan membran mitokondria. Desphande (2002) menyatakan bahwa tubulus mudah mengalami kerusakan atau nekrosis oleh zat dari luar karena jaringan ini merupakan tempat pemekatan zat sebelum diekskresikan dari tubuh.

KESIMPULAN

Ekstrak metanol *S. echinocarpum* mengandung tanin, polifenol, saponin, glikosida, dan steroid, tergolong toksik yang moderat, dan aman dikonsumsi pada dosis < 1250 mg/kg BB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada DP2M DIKTI melalui program PHB dan Hibah Doktor tahun 2009 atas bantuan pendanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggadiredja J, Irawati S, Kusmiyati. 1996. Potensi dan manfaat alga Indonesia dalam bidang farmasi. Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Alga. Juni 1996. Jakarta.
- Bayrak O, Bavbek N, Karatas OF, Bayrak R, Catal F, Cimentepe E, Akbas A, Yildirim E, Unal D, Akcay A. 2008. *Nigella sativa* protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Nephrology Dialysis Transplantation* 23(7): 2206-2212.
- Damjanov I. 1996. *Histopathology*. New York: Williams and Wilkins.
- Derelanko MJ, Hollinger MA, editor. 1995. *CRC Handbook of Toxicology*. Boca Raton: CRC Press.
- Desphande SS. 2002. *Handbook of Food Toxicology*. New York: Marcel Dekker.
- Firdaus M, Astawan M, Muchtadi D, Wresdiyati T, Waspadji S, Karyono SS. 2007. Efisiensi antiradikal florotanin *Sargassum polycystum* dan *Sargassum echinocarpum* yang terlarut dalam berbagai pelarut polar. *Jurnal Penelitian Perikanan* 9: 157-161.
- Firdaus M, Astawan M, Muchtadi D, Wresdiyati T, Waspadji S, Karyono SK. 2010a. Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by *Sargassum echinocarpum* extract. *Medical Journal of Indonesia* 19: 32-35.
- Firdaus M, Astawan M, Muchtadi D, Wresdiyati T, Waspadji S, Karyono SS. 2010b. Effects of brown algae extract to function of aorta endothelium cells in diabetic rats. *Indonesian Journal of Pharmaceutical* 21: 151-157.
- Harborne JB. 1984. *Phytochemical methods*. 2nd edition. London: Chapman and Hall.
- Hays NP, Galassetti PR, Coker RH. 2008. Prevention and treatment of type 2 diabetes: Current role of lifestyle, natural product, and pharmacological interventions. *Pharmacology & Therapeutics* 118(2): 181-191.
- Hervás G, Pérez V, Giráldez FJ, Mantecón AR, Almar MM, Frutos P. 2003. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology* 129(1): 44-54.
- Hsu YW, Tsai CF, Chen WK, Huang CF, Yen CC. 2011. A subacute toxicity evaluation of green tea (*Camellia sinensis*) extract in mice. *Food and Chemical Toxicology* 49: 2624-2630.
- Kadi A. 2005. Beberapa catatan kehadiran marga Sargassum di Perairan Indonesia. *Oseana* 30: 1-14.
- Koivikko R, Lopenen J, Honkanen T, Jormalainen V. 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology* 31(1): 195-212.
- Lamela M, Anca J, Villar R, Otero J, Calleja JM. 1989. Hypoglycemic activity of several seaweed extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 27(1-2):35-43.
- Liu X, Wang CY, Shao CL, Wei YX, Wang BG, Sun LL, Zheng CJ, Guan HS. 2009. Chemical constituents from *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Agardh. *Biochemical Systematics and Ecology* 37(2): 127-129.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. 2002. Bacterial activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 889-893.
- [OECD] Organisation of Economic Co-operation and Development. 2001. Acute Oral Toxicity. OECD Guideline for testing of chemicals No. 425. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg425.pdf> [5 Februari 2009].
- Rodrigo R, Rivera G. 2002. Renal damaged mediated by oxidative stress: A

- hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radical Biology & Medicine* 33(3): 409-422.
- Sigala F, Theocharis S, Sigalas K, Markantonis-Kyroudis S, Papalabros E, Triantafyllou A, Kostopanagiotou G, Andreadou I. 2006. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. *Journal of Pineal Research* 40(3): 270-279.
- Singh IP, Bharate SB. 2006. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Report* 23(4): 558-591.
- Springbob K, Kutchan TM. 2009. Introduction to the different classes of natural products. In: Osbourn AE, Lanzotti V, editor. *Plant-derived Natural Products*. Heidelberg: Springer.
- Stern JL, Hagerman AE, Steinberg PD, Winter FC, Estes JA. 1996. A new assay for quantifying brown algal phlorotannins and comparisons to previous methods. *Journal of Chemical Ecology* 22(7): 1273-1293.
- Sudha, Munuswamy, Gnanamani A, Deepa G, Sudha M, Madhavacharyulu E, Deivanai K, Sadulla S. 2008. In vivo studies on evaluation of potential toxicity of unspent tannins using albino rats (*Rattus norvegicus*). *Food and Chemical Toxicology* 46(6): 2288-2295.