



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELLA (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) TERHADAP AKTIVITAS SITOKROM P450 CYP24A1 DAN KERUSAKAN SEL HEPAR TIKUS YANG TERPAPAR KARBON TETRAKLORIDA**

**TESIS**



**ELFIRA ROZA**  
**0921212026**

**PROGRAM PASCASARJANA**  
**ILMU BIOMEDIK**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**  
**PADANG 2013**

**THE EFFECT OF ROSELLE (*Hibiscus Sabdariffa Linn*) EXTRACT TO WISTAR RATS' CYTOCHROME P450 CYP24A1 ACTIVITIES AND INDUCED CARBON TETRACHLORIDE HEPATOXICITY**

BY

ELFIRA ROZA

ADVISORS

Prof. Dr. dr. Yanwirasti, PA (K) and Dr. dra. Eti Yerizel, MS

SUMMARY

Many degenerative diseases are caused by free radical reactions. Medicines and chemical compound have been found out able to increase free radicals. One of those chemical compounds is carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) which can affect body organs. But the major effect is in the liver as the metabolic process occurs in endoplasmic reticulum by cytochrome P450. It happens because the metabolism of  $\text{CCl}_4$  will produce  $\text{CCl}_3^*$  and  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$ . This  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  can disturb calcium regulation mechanism which will increase intracellular calcium due to the increasing amount of cytochrome P450 CPY24A1. It also can bind many macro molecule such as protein, lipid and DNA that will trigger the degeneration of hepatocytes. The damage can be in the degeneration of hydropic and lipid and necrosis forms.

Roselle (*hibiscus sabdariffa Linn*) is one of the plants contains antioxidant and has a function as a hepatoprotector. According to Health Ministry Decree

number 235/men.kes.par/VI/79 100 g fresh roselle calyces contain 9.2 g water, 11.45 g protein, 2.61 g fat, 12.0 g fiber, 6.90 g carbon, 1.263 mg calcium, 273.2 mg phosphor, 8.98 mg iron, 0.029 mg carotene, 0.118 mg thiamine, 0.277 mg riboflavin, 3.765m g niacin, 6.7 mg ascorbic acid. Roselle calyces also contain flavonoid (Mardiah, et al., 2009), saponnins, tannins, cyanogenic glycoside (Akanya et al., 1997), anthocyanins (Wang et al., 2000).

The effect of roselle (*hibiscus sabdariffa linn*) extract to wistar rats' cytochrome P450 CYP24A1 activities and induced carbon tetrachloride hepatotoxicity research was done to prove those believes above.

The samples were 24 wistar rats age 2 – 3 months old and weigh 200 – 250 g. They were randomly divided into 4 groups which are negative control group, positive control group (induced by CCl<sub>4</sub>), treatment I group ( induced by CCl<sub>4</sub> and was given 250 mg/kg BW roselle extract) and treatment II group (induced by CCl<sub>4</sub> and was given 500 mg/kg BW roselle extract). CCl<sub>4</sub> was given orally in single dosage 1 mg/kg/BW 24 hours. Roselle extract was given after CCl<sub>4</sub> for 6 days. In the 8<sup>th</sup> day, those rats were terminated for their blood and liver tissues. The blood was centrifuged to separate serum from other blood components. The serum was used to investigate cytochrome P450 CYP24A1 activities by using Elisa Method. Liver tissues were processed and made into slides colored with Hemotoxylin Eosin (HE). Those slides were read under Microscope CX21 3 D with 400x enlargement.

The ANOVA test shown  $p = 0.005$  ( $p < 0.05$ ) which means there were truly significant differences average activities of cytochrome P450 CYP24A1

among control groups and treatment groups. Analysis by using *Post Hoc Benferoni Test* found out that there were truly significant differences average activities of cytochrome P450 CYP24A1 between positive control group and treatment I group and between positive control group and treatment II group ( $p < 0.05$ ). While between treatment I group and treatment II group was found out no significant differences ( $p > 0.005$ ).

ANOVA test result of liver cell degeneration shown truly significant differences of the average of hydropic degeneration, lipid degeneration, and necrosis among control groups and treatment groups ( $p < 0.05$ ). Analysis by using *Post Hoc Benferoni Test* shown truly significant differences hydropic degeneration liver cell between positive control group and treatment I and between positive control group and treatment II group and between treatment I group and treatment II group ( $p < 0.05$ ). Analysis by using *Post Hoc Benferoni Test* shown truly significant differences lipid degeneration liver cell between positive control group and treatment II. There were no significant differences between positive control group and treatment I group and between treatment I group and treatment II group ( $p > 0.05$ ). Analysis by using *Post Hoc Benferoni Test* for average necrosis liver cells shown truly significant differences between positive control groups and treatment I group and between positive control group and treatment II group ( $p < 0.05$ ), while there were no significant differences found out between treatment I group and treatment II group ( $p > 0.05$ ).

$\text{CCl}_4$  free radicals can increase cytochrome P450 CYP24A1 activities and cause hydropic degeneration, lipid degeneration and necrosis. Those bad impacts



of  $\text{CCl}_4$  can be overcome by roselle's antioxidant. Roselle contains C vitamin, flavonoid and carotene which will work to cut the radical chain reaction. Therefore,  $\text{CCl}_4$  will not be metabolized into highly reactive compound. The antioxidant will also add electron to  $\text{CCl}_4$  metabolic product  $\text{CCl}_3^*$  and  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$ . Therefore the metabolic product will not be bound to macro molecules such as lipid, protein, and DNA and the hepatocytes degeneration can be avoided.

Based on those explanation above, it can be concluded that extract roselle treatments influence cytochrome P450 CYP24A1 activities and liver rat cell induced by  $\text{CCl}_4$ . It was suggested for advance researches about roselle's dosages treatment, length of time treatment, liver function examination by using other enzymes and toxicity caused by roselle usage.

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELA (*Hibiscus Sabdariffa* Linn)  
TERHADAP AKTIVITAS SITOKROM P450 CYP24A1 DAN  
KERUSAKAN SEL HEPAR TIKUS YANG TERPAPAR  
KARBON TETRAKLORIDA**

Oleh  
ELFIRA ROZA

Pembimbing  
Prof. Dr. dr Yanwirasti, PA (K) dan Dr.dra Eti Yerizel, MS

**RINGKASAN**

Radikal bebas merupakan penyebab timbulnya berbagai penyakit. Beberapa obat dan bahan kimia telah dikenal dapat meningkatkan radikal bebas, salah satunya adalah karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ).  $\text{CCl}_4$  dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh, namun efek  $\text{CCl}_4$  yang paling terlihat adalah pada hepar.  $\text{CCl}_4$  dimetabolisme di retikulum endoplasma sel hepar oleh sitokrom P450. Hepatotoksik yang ditimbulkan oleh  $\text{CCl}_4$  disebabkan oleh hasil metabolisemenya yaitu  $\text{CCl}_3^*$  dan  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$ .  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  dapat menyebabkan gangguan mekanisme pengaturan kalsium sehingga terjadi peningkatan kalsium intraseluler karena meningkatnya Sitokrom P450 CYP24A1.  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  dapat berikatan dengan makromolekul seperti protein, lemak dan DNA yang dapat memicu kerusakan hepatosit. Kerusakan hepatosit dapat berupa degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis.

Rosella merupakan salah satu tanaman yang banyak mengandung antioksidan dan berfungsi sebagai hepatoprotektor. Berdasarkan Menkes RI no.235/men.kes.par/VI/79, kandungan kelopak bunga rosella segar dalam 100 gr

yaitu air 9.2 gr, protein 1.145 gr, lemak 2.61 gr, serat 12.0 gr, abu 6.90 gr, kalsium 1,263 mg, fosforus 273.2 mg, zat besi 8.98 mg, karotena 0.029 mg, thiamine 0.117 mg, riboflavin 0.277 mg, niacin 3.765 mg, asam askorbat 6.7 mg. Kelopak bunga rosella juga mengandung flavonoid (Mardiah *et al.*, 2009), saponin, tannin, *cyanogenic glycoside* (Akanya *et al.*, 1997), dan Antosianin (Wang *et al.*, 2000).

Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan penelitian bagaimana pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan kerusakan sel hepar tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>.

Penelitian ini menggunakan desain *post test only control group design*, yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas, Laboratorium Biomedik Universitas Andalas dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Andalas Padang. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus putih Strain Wistar berusia 2-3 bulan dengan berat 200-250 gr. Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif (mendapat CCl<sub>4</sub>), perlakuan I (mendapat CCl<sub>4</sub> dan ekstrak rosella 250 mg/kg bb) dan perlakuan II mendapat CCl<sub>4</sub> dan ekstrak rosella 500 mg/kg bb). CCl<sub>4</sub> diberikan secara oral dengan dosis tunggal sebanyak 1 mg/kg bb. 24 jam kemudian diberikan ekstrak rosella selama 6 hari. Pada hari ke-8, tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan darah dan jaringan hepar. Darah kemudian di sentrifus untuk memisahkan serum dari komponen darah lainnya. Serum digunakan untuk pemeriksaan aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dengan metode Elisa. Jaringan hepar dilakukan processing dan dibuat slide yang diwarnai

Hemotoksilin Eosin (HE), selanjutnya dilakukan pembacaan dibawah mikroskop CX 21, dalam 3 lapangan pandang dengan pembesaran 400x.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada uji Anova didapatkan  $p = 0,0005$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan rerata aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Analisa dengan Uji *Post Hoc Bonferoni* ditemukan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I dan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II ( $p < 0,05$ ), sedangkan antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

Hasil uji Anova terhadap kerusakan sel hepar menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ). Analisa dengan uji *Post Hoc Bonferoni* menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat signifikan rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I, antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II dan antara kelompok I dan kelompok perlakuan II ( $p < 0,05$ ). Uji *Post Hoc Bonferoni* rerata sel hepar yang mengalami degenerasi lemak menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II ( $p < 0,05$ ), sedangkan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I dan antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II tidak ditemukan perbedaan

yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Analisa dengan uji *Post Hoc Bonferoni* rerata sel hepar yang mengalami nekrosis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I dan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II ( $p < 0,05$ ), sedangkan antara kelompok perlakuan I dan perlakuan II tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

Radikal bebas  $\text{CCl}_4$  dapat meningkatkan aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan menyebabkan hepar mengalami degenerasi hidropik, degenerasi lemak dan nekrosis. Dampak buruk yang ditimbulkan oleh  $\text{CCl}_4$  dapat diatasi dengan antioksidan yang terdapat dalam rosella. Rosella mengandung vitamin C, Flavonoid dan karoten yang bekerja dengan memutus reaksi rantai radikal sehingga  $\text{CCl}_4$  tidak dimetabolisme menjadi senyawa reaktif tinggi. Antioksidan rosella juga dapat menyumbangkan elektron terhadap hasil metabolit  $\text{CCl}_4$  yaitu  $\text{CCl}_3^*$  dan  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$ , sehingga hasil metabolit tersebut tidak berikatan dengan makromolekul seperti lipid, protein dan DNA, sehingga hepatosit tidak mengalami kerusakan.

Berdasarkan hal di atas dapat ditarik kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian ekstrak rosella berpengaruh terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan kerusakan sel hepar pada tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ . Hendaknya dilakukan penelitian lanjutan tentang rosella dengan dosis, lama waktu pemberian, pemeriksaan fungsi hepar dengan enzim lain dan penelitian tentang toksisitas yang ditimbulkan dari penggunaan rosella.



## PROGRAM PASCA SARJANA BIOMEDIK

Tesis, April 2013

Oleh : ELFIRA ROZA

Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosela (*Hibiscus Sabdariffa Linn*) terhadap Aktivitas Sitokrom P450 CYP24A1 dan Kerusakan Sel Hepar Tikus yang Terpapar Karbon Tetraklorida

### ABSTRAK

Radikal bebas merupakan penyebab timbulnya berbagai penyakit. Salah satu sumber radikal bebas adalah karbon tertriklorida ( $\text{CCl}_4$ ). Efek radikal bebas akibat  $\text{CCl}_4$  terutama dapat dilihat pada hepar.  $\text{CCl}_4$  di metabolisme di retikulum endoplasma sel hepar oleh sitokrom P450.  $\text{CCl}_4$  dapat menyebabkan hepatosit mengalami degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis. Dampak buruk  $\text{CCl}_4$  dapat diatasi dengan pemberian antioksidan. Rosella merupakan tanaman yang kaya antioksidan dan diduga rosella bersifat sebagai hepatoprotektor yang dapat melindungi hepatosit dari serangan radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan kerusakan sel hepar tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ .

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post test only kontrol group design*. Jumlah sampel sebanyak 24 ekor tikus Strain Wistar yang berumur 2-3 bulan dengan berat 200-250 gr. Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif (mendapat  $\text{CCl}_4$ ), perlakuan I (mendapat  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 250 mg/kg bb) dan perlakuan II (mendapat  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 500 mg/kg bb). Aktivitas Sitokrom P450 CYP24A1 diperiksa dengan metode Elisa. Hepar diwarnai dengan Hemotoksilin Eosin dan dibaca dibawah mikroskop. Data dianalisis dengan uji Anova dengan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan rerata aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 pada kelompok kontrol negatif adalah  $6,61 \pm 5,47$  nmol/ml, pada kelompok kontrol positif terjadi kenaikan 4,36 kali yaitu  $28,83 \pm 8,42$ , kelompok perlakuan I adalah  $5,49 \pm 4,87$ , dan kelompok perlakuan II adalah  $1,50 \pm 0,84$ . Secara statistik didapatkan perbedaan yang sangat bermakna rerata aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Rerata degenerasi hidrofik kelompok kontrol negatif adalah  $0,00 \pm 0,00$  kelompok kontrol positif adalah  $35,83 \pm 2,75$ , dan kelompok perlakuan I adalah  $13,00 \pm 2,50$ , dan kelompok perlakuan II adalah  $2,44 \pm 1,07$ . Secara statistik didapatkan perbedaan yang sangat bermakna rerata degenerasi hidrofik antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Rerata degenerasi lemak kelompok kontrol negatif adalah  $0,17 \pm 0,18$ , kelompok kontrol positif adalah  $11,77 \pm 4,06$ , dan kelompok perlakuan I adalah  $7,78 \pm 2,85$ , dan kelompok perlakuan II adalah  $4,28 \pm 1,00$ . Secara statistik didapatkan perbedaan yang sangat bermakna rerata degenerasi lemak antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Rerata sel yang nekrosis pada kelompok kontrol negatif adalah  $0,00 \pm 0,00$ , kelompok kontrol positif adalah  $3,34 \pm 0,52$ , dan kelompok perlakuan I adalah  $1,89 \pm 0,72$ , dan kelompok perlakuan II adalah  $1,06 \pm 0,50$ . Secara statistik didapatkan perbedaan yang sangat bermakna rerata nekrosis antar kelompok ( $p < 0,05$ ).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak rosella dapat menurunkan aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan dapat menurunkan kerusakan sel hepar tikus yang terpapar karbon tetraklorida.

**Kata Kunci :** Karbon Tetraklorida, Sitokrom P450, Rosella, dan Kerusakan Sel Hepar.

## PROGRAM PASCA SARJANA BIOMEDIK

Tesis, April 2013

Oleh : ELFIRA ROZA

The Effect Of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa Linn*) Extract To Wistar Rats' Cytochrome P450 CYP24A1 Activities And Induced Carbon Tetrachloride Hepatotoxicity

### ABSTRACT

Many degenerative diseases are caused by free radical reactions. One of chemical compounds as the source of free radical is carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) which can affect body organs. But the major effect is in the liver as the metabolic process occurs in endoplasmic reticulum by cytochrome P450. The metabolized  $\text{CCl}_4$  can cause hepatocyt which degenerates hydropic and lipid and cause necrosis. The bad impact of  $\text{CCl}_4$  can be overcome by antioxidant. Roselle is a rich antioxidant plant, which also assumes has characteristic of hepatoprotector. It will protect hepatocytes from free radicals. This research is aimed to find out the effect of rosella extract treatment to cytochrome P450 CYP24A1 and induced  $\text{CCl}_4$  degenerated wistar rat liver cells.

This research was an experimental study using the post test only controlled group design. The samples were 24 wistar rats age 2 – 3 months old and weigh 200 – 250 g. They were randomly divided into 4 groups which are negative control group, positive control group (induced by  $\text{CCl}_4$ ), treatment I group ( induced by  $\text{CCl}_4$  and was given 250 mg/kg BW roselle extract) and treatment II group (induced by  $\text{CCl}_4$  and was given 500 mg/kg BW roselle extract). Cytochrome P450 CYP24A1 activities examined by Elisa Method. Liver tissues were colored with haemotoxylin-eosin and read under microscope. Data were analyzed by ANOVA test with 95% degree of trust.

The result of the research has shown that cytochrome P450 CYP24A1 activities in negative control group was  $6.61 \pm 5.47$  nmol/ml, and in positive control group increase 4.36 times, that is  $28.83 \pm 8.42$  nmol/ml and in treatment group was  $5.49 \pm 4.87$  nmol/ml and treatment II group was  $1.50 \pm 0.84$  nmol/ml. Statistically, it was found out that the differences average cytochrome P450 CYP24A1 activities among groups ( $p < 0.05$ ). The hydropic degeneration average of negative control group was  $0.00 \pm 0.00$ , positive control group was  $35.83 \pm 2.75$  and treatment I group was  $13.00 \pm 2.50$ , treatment II group was  $2.44 \pm 1.07$ . Statistically, it was found out the difference of the average of hydropic degeneration among groups ( $p < 0.05$ ). The lipid degeneration average of negative control group was  $0.17 \pm 2.85$  and positive control group was  $11.77 \pm 4.06$ , treatment I group was  $7.78 \pm 2.85$  and treatment II group was  $4.28 \pm 1.00$ . Statistically, it was found out the difference of lipid degeneration among groups ( $p < 0.05$ ). Cell necrosis average of negative control group was  $0.00 \pm 0.00$ , positive control group was  $3.34 \pm 0.52$ , treatment I group was  $1.89 \pm 0.72$  and treatment II group was  $1.06 \pm 0.50$ . It was found out the difference of cell necrosis among groups statistically ( $p < 0.05$ ).

Based on the result of the research, it can be concluded that the roselle extract can reduce cytochrome P450 CYP24A1 activities and lessen the degeneration of the rat liver cells that were induced by carbon tetrachloride.

Keywords: *Carbon Tetrachloride, Cytochrome P450, Roselle and Liver Cell Degeneration*

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Peneliti lahir di Padang Lawas Kabupaten Agam, pada tanggal 09 September 1981. Peneliti adalah anak pertama dari empat bersaudara dari Bapak Zainal dan Ibu Nelma. Peneliti menyelesaikan Sekolah Dasar Negeri 33 Kecamatan X Koto, Kabupaten Tanah Datar tahun 1994. Peneliti menamatkan pendidikan di SMP Xaverius Bukittinggi tahun 1997, kemudian melanjutkan sekolah di Sekolah Perawat Kesehatan (SPK) Yarsi Bukittinggi dan tamat pada tahun 2000. Tahun 2004 penulis menamatkan pendidikan DIII Kebidanan di Politeknik Kesehatan Padang. Tahun 2004 s/d 2005 penulis bekerja di Klinik Bersalin Anggrek Padang. Tahun 2005 peneliti menikah dengan Ganto Sori dan dikaruniai 2 orang putri, Gadiza Nabila Ramadhan (7 tahun) dan Kezia Anacha Giantory (4 tahun). Penulis menyelesaikan pendidikan DIV Bidan Pendidik di Poli Teknik Kesehatan Padang pada tahun 2006, dan bekerja di Stikes Dharma Lanbouw. Padang Tahun 2009 peneliti diberi kesempatan melanjutkan pendidikan di Program Pascasarjana Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadirat Allah SWT, atas segala rahmat, karunia, taufik serta hidayah-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) Terhadap Aktivitas Sitokrom P450 dan Kerusakan Sel Hepar Pada Tikus yang Terpapar Karbon Tetraklorida.

Dalam menyelesaikan tesis ini, banyak kesulitan dan hambatan yang dilalui, namun berkat rahmat-Nya serta bimbingan, dorongan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya tesis ini dapat diselesaikan, dengan hati yang tulus dan penuh rasa syukur saya sampaikan ucapan terima kasih banyak kepada yang terhormat:

- Prof. Dr. dr Yanwirasti, PA (K) dan Dr. dra. Eti Yerizel, MS, selaku pembimbing yang telah ikhlas dan penuh kesabaran, membimbing, membantu, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan serta memberikan saran dan dukungan moril secara terus menerus, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.
- Dekan Fakultas Kedokteran Dr. dr. Masrul, SpGK dan Ketua Program Studi Ilmu Biomedik yang lama Prof. Dr. dr. Fadil Oenzil, Ph.D, SpGK dan Ketua Program Studi Ilmu Biomedik yang baru Dr. dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk

mengikuti pendidikan pada Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Andalas Padang.

- Tim Penguji Prof. Dr. dr Fadil Oenzil, Ph.D, SpGK, Prof Dr. Nuzulia Irawati, MS, dan dr Aswiyanti Asri, Msi. Med, SpPA yang telah bersedia menguji dan memberikan masukan untuk menyempurnakan tesis ini.
- Teknisi dan analis Syafriman, S.Pt, dr, Heni Wahyuni, Sp.PA dan Rita , yang telah banyak memberikan bantuan dalam melaksanakan penelitian.
- Semua rekan Peminatan Kesehatan Ibu dan Anak serta rekan-rekan angkatan 2009 program Studi Ilmu Biomedik, terima kasih atas kerjasama serta dukungannya dalam suka dan duka selama menjalani pendidikan.
- Suami dan anak-anak tercinta yang telah memberikan semangat dan dukungan baik moril maupun materil hingga saya dapat menyelesaikan pendidikan.

Semoga amal baik dari semua pihak mendapatkan imbalan yang berlipat ganda dari Allah SWT. Akhirnya disadari sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, untuk itu diharapkan adanya penelitian yang sejenis untuk mendapatkan hasil yang lebih baik dan semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Padang, April 2013

Elfira Roza



## DAFTAR ISI

<b>SUMMARY.....</b>	<b>i</b>
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSRTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>x</b>
<b>HALAMAN PERSYARATAN.....</b>	<b>xi</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....</b>	<b>xiv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xx</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xxi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xxii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	7

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Radikal Bebas.....	8
2.2 Karbon Tetraklorida.....	14
2.3 Sitokrom P450.....	18
2.4 Anti Oksidan.....	21
2.5 Rosela.....	26
2.6 Hepar.....	33

## **BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS**

3.1 Kerangka Konsep.....	42
3.2 Hipotesis.....	43

## **BAB IV METODE PENELITIAN**

4.1 Jenis dan Desain Penelitian.....	44
4.2 Lokasi Penelitian.....	44
4.3 Populasi dan Sampel.....	44
4.4 Variabel Penelitian.....	46
4.5 Definisi Operasional.....	46
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	48
4.7 Rancangan Penelitian.....	50
4.8 Posedur Kerja.....	51
4.9 Teknik Analisa Data.....	56

## **BAB V HASIL PENELITIAN**

5.1 Aktivitas Sitokrom P450 CYP24A1.....	57
5.2 Kerusakan Sel Hepar.....	59

## **BAB VI PEMBAHASAN**

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosela Terhadap Sitokrom P450 CYP24A1 Pada Tikus Yang Terpapar CCl <sub>4</sub> .....	65
6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosela Terhadap Kerusakan Sel Hepar Tikus Yang Terpapar CCl <sub>4</sub> .....	69

## **BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan .....	79
7.2 Saran.....	79

## **DAFTAR PUSTAKA**

## **LAMPIRAN**

## DAFTAR TABEL

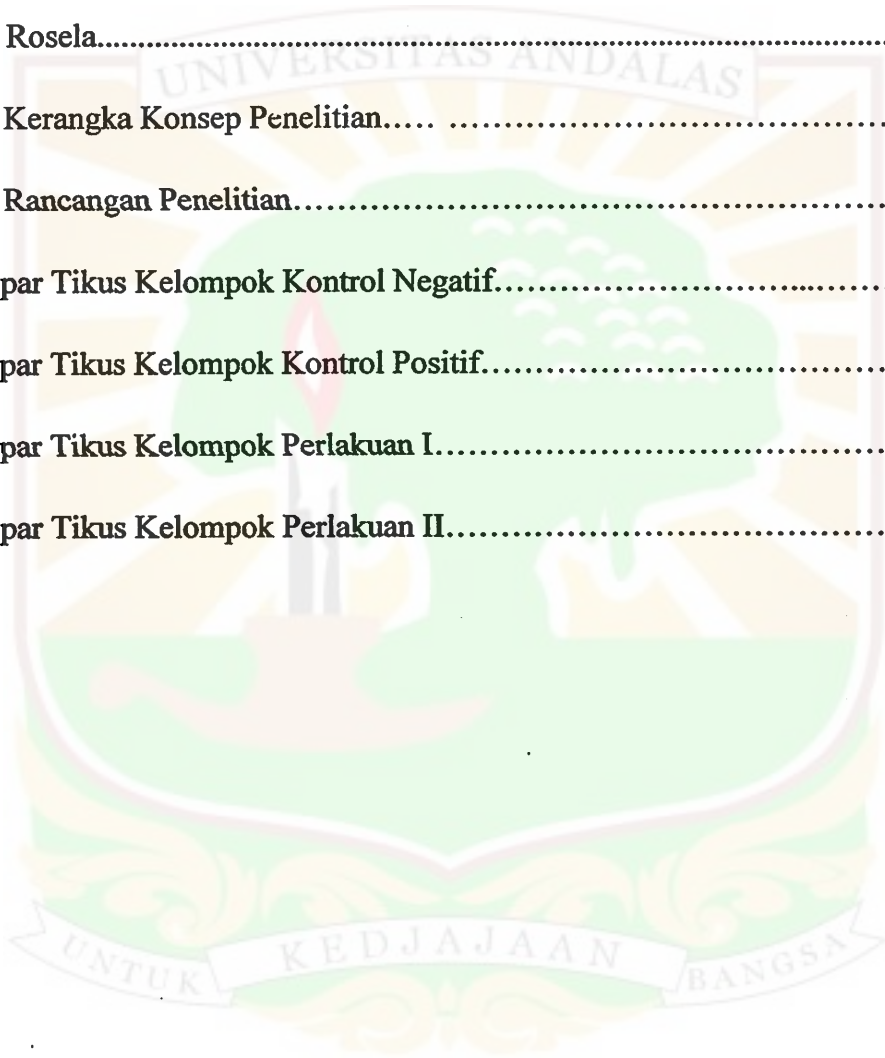
### Tabel

2.1 Kandungan Bunga Rosela.....	30
5.1 Rerata Kadar Sitokrom P450 CYP24A1 Tikus Pada Kelompok Penelitian.....	57
5.2 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferoni</i> Terhadap Rerata Kadar Sitokrom P450 CYP24A1 Pada Kelompok Penelitian.....	58
5.3 Rerata Sel Hati Tikus Yang Mengalami Degenerasi Hidrofik, Degenerasi Lemak Dan Nekrosis Pada Kelompok Penelitian.....	59
5.4 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferoni</i> Terhadap Rerata Degenerasi Hidrofik Pada Kelompok Penelitian.....	60
5.5 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferoni</i> Terhadap Rerata Degenerasi Lemak Pada Kelompok Penelitian.....	60
5.6 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji <i>Post Hoc Bonferoni</i> Terhadap Rerata Nekrosis Pada Kelompok Penelitian.....	61

## DAFTAR GAMBAR

### Gambar

2.1 Sintesis CCL <sub>4</sub> .....	15
2.2 Bunga Rosela.....	28
3.1 Bagan Kerangka Konsep Penelitian.....	42
4.1 Bagan Rancangan Penelitian.....	50
5.1 Sel Hepar Tikus Kelompok Kontrol Negatif.....	62
5.2 Sel Hepar Tikus Kelompok Kontrol Positif.....	62
6.3 Sel Hepar Tikus Kelompok Perlakuan I.....	63
6.4 Sel Hepar Tikus Kelompok Perlakuan II.....	63





## **DAFTAR LAMPIRAN**

- Lampiran 1 : Master Tabel**
- Lampiran 2 : Hasil Pengolahan Data**
- Lampiran 3 : Surat Keterangan Lulus Kaji Etik**
- Lampiran 4 : Surat Keterangan Selesai Penelitian Dari Laboratorium Farmasi**
- Lampiran 5 : Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian Dari Laboratorium Biomedik**
- Lampiran 6 : Surat Keterangan Selesai Melakukan Penelitian Dari Laboratorium Patologi Anatomi**
- Lampiran 7 : Hasil Pemeriksaan Sitokrom P450 CYP24A1 dengan metode Elisa**
- Lampiran 8 : Gambar Sel Hepar**
- Lampiran 9 : Foto Penelitian**

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan salah satu penyebab timbulnya berbagai penyakit. Nampaknya radikal bebas juga berperan pada beberapa patogenesis kelainan hepar. Radikal bebas dapat dihasilkan dari dalam tubuh dan luar tubuh. Radikal bebas memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya, sehingga bersifat reaktif untuk bereaksi dengan molekul lain. Radikal bebas dapat merusak makromolekul seperti merusak lipid membran sel, DNA, dan protein yang menyebabkan stres oksidatif sel (Valko *et al.*, 2006).

Dalam keadaan normal, produk radikal bebas tidak akan menyebabkan kerusakan hepar, oleh karena hepar memiliki sistem protektor antioksidan yang terbaik dibanding organ lain (Ali, 1997). Namun dalam beberapa keadaan, dimana terdapat peningkatan radikal bebas yang disebabkan oleh pemicu, maka dapat terjadi dampak negatif pada sel hepar (Cochrane, 1991). Beberapa obat dan bahan kimia yang telah dikenal dapat meningkatkan radikal bebas adalah karbon tetraklorida ( $CCL_4$ ), galaktose dan haloten (Feter, 1992).

Sifat toksik  $CCL_4$  telah terbukti dari beberapa penelitian, bahwa dosis yang kecil sekalipun dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh termasuk susunan syaraf pusat, hepar, ginjal dan peredaran darah. Namun efek  $CCL_4$  yang paling terlihat adalah pada hepar. Kerusakan hepar akibat paparan  $CCL_4$  tergantung pada dosis yang diberikan.

Pada keracunana akut dapat terjadi kerusakan sel pada hepar. Kerusakan sel terjadi sebagai akibat peningkatan kalsium intraseluler serta kehilangan homeostatis kalsium, penurunan ATP, kerusakan permeabilitas membran sel dan kerusakan yang bersifat ireversibel pada mitokondria. Kerusakan sel dapat berupa degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis (Cotrain, *et al.*, 1999).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Dahiru (2003), bahwa pemberian CCL<sub>4</sub> dengan dosis tunggal 1.0 mg/kg berat badan dapat menyebabkan peningkatan aktivitas enzim SGPT, SGOT dan total protein pada hepar tikus percobaan.

Penelitian yang dilakukan oleh Yanwirasti (1997) tentang perlindungan sel hepar tikus percobaan oleh vitamin A terhadap serangan radikal bebas yang ditimbulkan oleh keracunan karbon tetraklorida menunjukkan bahwa CCL<sub>4</sub> dapat menimbulkan kerusakan sel hepar berupa perubahan gambaran histologis sel hepar, meningkatnya kadar lipid peroksidasi darah dan hepar yang ditandai dengan meningkatnya kadar malondialdehid (MDA) hepar dan plasma sebagai hasil akhir degradasi lipid peroksida.

Tingkat racun CCL<sub>4</sub> yang diberikan kepada hewan menghasilkan akumulasi lemak di hepar akibat penyumbatan dalam sintesis lipoprotein yang membawa trigliserida dari organ ini. Struktur retikulum endoplasma sel hepar menjadi terdistorsi, sintesis protein hepar melambat, dan aktivitas enzim yang terletak di retikulum endoplasma, seperti glukosa-6-fosfat menurun, serta

menurunnya kemampuan retikulum endoplasma menyerap ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase.

$\text{CCL}_4$  merupakan salah satu bahan kimia yang bersifat hepatotoksik.  $\text{CCL}_4$  dimetabolisme oleh reaksi rantai sitokrom P450 dependen monooksigenase melalui enzim flavoprotein reduktase. Retikulum endoplasma hepar sangat kaya sitokrom P450, yang memetabolisme sejumlah besar bahan kimia.

Menurut Slater (1984) dalam Yanwirasti (1999), Efek hepatotoksik  $\text{CCL}_4$  tergantung pada aktivitas metabolik  $\text{CCL}_4$  yang berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hepar melalui interaksi dengan transpor elektron NADPH sitokrom P450. Dalam retikulum endoplasma hepar  $\text{CCL}_4$  dimetabolisme oleh sitokrom P450 CYP2E1 menghasilkan zat yang reaktif yaitu  $\text{CCL}_3^\circ$  (Jeon, 2003, dalam Panjaitan 2007). Radikal bebas  $\text{CCL}_3^\circ$  akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk  $\text{CCL}_3\text{O}_2^\circ$  yang jauh lebih reaktif dari pada  $\text{CCL}_3^\circ$ .  $\text{CCL}_3\text{O}_2^\circ$  bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida. Akibatnya fungsi biologis biomolekuler akan terganggu.

$\text{CCL}_3\text{O}_2^\circ$  juga menyebabkan inisiasi lipid peroksidase oleh  $\text{H}^\bullet$  abstraksi, yang berakibat penurunan GSH dan kerusakan mekanisme pengaturan  $\text{Ca}^{2+}$ , sehingga terjadi peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler yang menyebabkan sintesis  $\text{NO}^\bullet$ . Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler meningkatkan kerusakan protein, DNA, dan aktivasi phospholipase, peningkatan lipid peroksidase, selanjutnya terjadi peningkatan *cytotoxic aldehyd* (Haliwell and Gutteridge, 2004).

Sitokrom P450 memiliki banyak famili yang berhasil ditemukan hingga kini, yaitu berjumlah sekitar 150 isiform, diantaranya adalah CYP1 (*polycyclic aromatic hydrocarbon-inducibel*), CYP2 (*phenobarbital family*), CYP3 (*steroid-inducibel*) dan CYP4. Beberapa isoenzim sitokrom P450 diantaranya adalah CYP3A1 dan CYP24A1. CYP24A1 berperan dalam memelihara homeostatis kalsium dalam sel (Haliwell *and* Gutteridge, 2004).

Penelitian secara invitro, dengan menggunakan *cell lines* epithelial hepar manusia, ternyata dari famili sitokrom P450 hanya sitokrom P450 1A2 dan sitokrom P450 3A4 yang aktif pada metabolisme AFB<sub>1</sub> yang menginduksi pembentukan epoksid AFB<sub>1</sub>, sedangkan sitokrom P450 2A6 dan sitokrom P450 2B6 tidak memiliki peranan yang berarti (Mace *et al.*, 1997).

Penelitian yang dilakukan oleh Lestariana (1997) tentang pengaruh kandungan vitamin A dalam ransum terhadap efek toksik aflatoksin B1 pada tikus menemukan bahwa pada tikus yang mengalami defisiensi vitamin A dan diberikan aflatoksin B1 terjadi peningkatan kadar sitokrom P450 total.

Hasil penelitian Hamid (2009) menemukan bahwa pemberian 7,12-dimetilbenz( $\alpha$ )antrasen (DMBA) dapat meningkatkan ekspresi CYP1A1 pada tikus percobaan.

Pemberian DDB (dimetil 4, 4<sup>1</sup>- dimetoksi 5, 6, 5<sup>1</sup>, 6<sup>1</sup> dimetilenedioksi bifenil -2, 2<sup>1</sup>-dikarboksilat) 200 mg/kg berat badan selama 40 hari secara signifikan ( $p < 0,05$ ), meningkatkan aktivitas sitokrom P450 1A1 sehingga meningkatkan frekuensi pengikatan AFB<sub>1</sub> ke DNA (Liu *et al.*, 1995).



Dalam keadaan normal, sistem proteksi tubuh dapat meredam oksidasi dengan memproduksi antioksidan yang memadai, tetapi pada keadaan dimana terdapat pemicu pembentukan radikal bebas, diperlukan pemberian antioksidan eksogen yang memadai.

Tanaman sebagai bahan obat telah dimanfaatkan masyarakat Indonesia sejak dahulu, salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai obat saat ini adalah bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa Linn*). Hal ini dikarenakan hampir seluruh bagian tanaman dapat dipergunakan untuk kebutuhan pengobatan (Heri, 2005).

Rosella mengandung senyawa yang dapat menjaga fungsi hepar, baik sebagai hepatoprotektor maupun sebagai obat bila kerusakan hepar terjadi. Sebagai antioksidan rosella, mengandung metanol, asam askorbat,  $\beta$ -karoten, antosianin, asam protokatekuat, yang dapat mencegah kerusakan hepar akibat radikal bebas. Kandungan metanol dan polifenol pada rosella berperan sebagai anti inflamasi yang mencegah kerusakan sel bertambah parah (Aspan *et al.*, 2010).

Menurut menkes RI no. 235/men.kes.par/VI/79, kandungan kelopak bunga rosella segar dalam 100 gram yaitu air 9,2 gr, protein 1,145 gr, lemak 2,61 gr, serat 12.0 gr, abu 6,90 gr, kalsium 1,263 gr, fosforus 273,2 mg, zat besi 8,89 gr, karotena 0,029 mg, thiamin 0,117 mg, riboflavin, 0,277 mg, niacin 3,765 mg, asam aksorbat 6,7 mg.

Penelitian terdahulu yang dilakukan Ariati (2012) memperlihatkan bahwa pemberian fraksi air kelopak bunga rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) berpengaruh terhadap penurunan kadar SGPT tikus yang diberi  $CCL_4$  secara bermakna.

Penelitian yang dilakukan oleh Dahiru (2009) tentang efek ekstrak rosella terhadap kerusakan hati akibat karbon tetraklorida menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rosella 250 mg/kg berat badan dan 500 mg/kg berat badan dapat menurunkan kadar SGOT dan SGPT dan protein total pada hati, tetapi bagaimana efek ekstrak rosella dalam menurunkan toksisitas  $CCL_4$  melalui metabolisme oleh sitokrom P450 belum diketahui.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan perubahan kerusakan hepar tikus yang terpapar  $CCL_4$ .

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 tikus yang terpapar karbon tetraklorida?
2. Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa Linn*) terhadap kerusakan sel hepar tikus yang terpapar  $CCL_4$ ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengkaji pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dan kerusakan hepar tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1.3.2.1 Mengkaji pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>.

1.3.2.2 Mengkaji pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap kerusakan sel hepar tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Bagi peningkatan ilmu**

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktivitas sitokrom P450 dan kerusakan sel hepar tikus akibat keracunan CCL<sub>4</sub>.

### **1.4.2. Bagi Masyarakat**

Dapat menganjurkan pemilihan ekstrak rosella untuk mencegah pembentukan radikal bebas.

### **1.4.3. Untuk Terapan**

Bila penelitian ini terbukti, dapat memberikan masukan pada dinas kesehatan untuk menganjurkan pemanfaatan rosella sebagai minuman yang berkhasiat.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Radikal Bebas

##### 2.1.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan (*unpaired electron*) pada bagian terluar orbitnya, sehingga menjadi komponen yang tidak stabil dan menjadi sangat reaktif. Elektron yang tidak berpasangan ini, akan berusaha menarik elektron dari molekul lainnya untuk mendapatkan kembali konfigurasi pasangan elektron, oleh karena itu radikal bebas sangat reaktif (Pham-Huy *et al.*, 2008). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah (Sibuea, 2004).

Dalam kepustakaan kedokteran, pengertian radikal bebas sering dibaurkan dengan oksidan, karena keduanya memiliki sifat-sifat yang mirip. Aktivitas keduanya sering menghasilkan akibat yang sama, akan tetapi sebenarnya melalui proses yang berbeda. Keduanya harus dibedakan. Oksidan mempunyai pengertian senyawa penerima elektron (*electron acceptor*). Jadi radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak semua oksidan merupakan radikal bebas (Suryohudoyo, 2000).

### 2.1.2 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh dan dari luar tubuh (Pham-Huy *et al.*, 2008):

#### 1. Dari dalam tubuh

- a. Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh yang timbul sebagai akibat dari berbagai proses enzimatik di dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada proses respirasi sel, pada proses pencernaan dan pada proses metabolisme. Diproduksi oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, retikulum endoplasma, dan inti sel.
- b. Radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh yang timbul sebagai akibat dari bermacam-macam proses non-enzimatik di dalam tubuh, merupakan reaksi oksigen dengan senyawa organik dengan cara ionisasi dan radiasi. Contohnya adalah proses inflamasi dan iskemia.

#### 2. Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh

Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh didapat dari polutan, seperti asap rokok, asap kendaraan bermotor, radiasi sinar matahari, makanan berlemak, kopi, alkohol, obat, bahan racun, pestisida, minyak goreng jelantah (*deep frying*) dan masih banyak lagi yang lainnya. Peningkatan radikal bebas pun dapat dipicu oleh stres atau olah raga yang berlebihan.



### 2.1.3 Perusakan Sel Oleh Radikal Bebas

Perusakan sel oleh radikal bebas reaktif didahului oleh kerusakan membran sel, melalui terjadinya rangkaian proses sebagai berikut (Halliwell *and* Gutteridge, 2004):

1. Terjadi ikatan kovalen antara radikal bebas dengan komponen-komponen membran (enzim-enzim membran, komponen karbohidrat membran plasma), sehingga terjadi perubahan struktur dari fungsi reseptor.
2. Oksidasi gugus tiol pada komponen membran oleh radikal bebas yang menyebabkan proses transpor lintas membran terganggu.
3. Reaksi peroksidasi lipid dan kolesterol membran yang mengandung asam lemak tidak jenuh majemuk (PUFA = poly unsaturated fatty acid ). Hasil peroksidasi lipid membran oleh radikal bebas, berefek langsung terhadap kerusakan pada membran sel, antara lain dengan mengubah fluiditas, struktur dan fungsi membran, dalam keadaan yang lebih ekstrim akhirnya akan menyebabkan kematian sel.

Efek biologik peroksidasi lipid membran bergantung antara lain pada populasi sel yang bersangkutan dan profil asam lemak pada membran fosfolipid. Contoh membran mitokondria dan mikrosom sensitif terhadap peroksidasi lipid karena kandungan PUFA pada fosfolipid membran cukup tinggi. Umumnya semua membran peka terhadap reaksi peroksidasi lipid dalam derajat yang berbeda-beda. Kerusakan struktur subseluler secara langsung mempengaruhi pengaturan metabolisme. Sebagai contoh adalah disrupsi membran lisosom

menyebabkan pelepasan enzim-enzim hidrolitik lisosom yang selanjutnya mampu mengakibatkan kerusakan intraseluler, dan memperkuat kemampuan radikal bebas dalam menginduksi kerusakan sel (Halliwell *and* Gutteridge, 2004).

#### **2.1 4 Dampak Negatif Radikal Bebas**

Menurut Greenwald (1990) dalam Yanwirasti (1997) dampak negatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas adalah :

1. Merusak komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan integritas dan kehidupan sel. Radikal bebas ini akan merusak tiga jenis senyawa yang penting dalam mempertahankan integritas sel yaitu :
  - a. Asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen fosfolipid penyusun membran sel.
  - b. DNA, yang merupakan perangkat genetik.
  - c. Protein, yang memegang berbagai peran seperti enzim, reseptor antibodi dan pembentukan matriks serta sitoskeleton.
2. Merusak membran sel

Komponen terpenting membran sel adalah fosfolipid dan kolesterol. Dua komponen utama mengandung asam lemak tak jenuh, yang rawan terhadap serangan radikal bebas terutama radikal hidroksil. Radikal ini dapat menimbulkan reaksi rantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Akibat akhir dari reaksi rantai ini adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel. antara lain aldehid-aldehid, seperti malondialdehid, 9 hidroksil-

nonenal serta berbagai hidrokarbon seperti etanan dan pentana. Dapat pula terjadi ikatan silang antara dua rantai asam lemak atau asam lemak dan rantai peptida. Semua ini mengakibatkan kerusakan parah membran sel, serta membahayakan kehidupan sel.

### 3. Merusak DNA

Radikal bebas dapat menimbulkan berbagai perubahan pada DNA yang antara lain berupa hidrøksilasi basa timin dan sitosin, pembukaan inti purin dan pirimidin, serta terputusnya rantai fosfodieser DNA. Bila kerusakan tidak terlalu parah, maka masih bisa diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA. Namun apabila kerusakan terlalu parah, rantai DNA terputus-putus, kerusakan tak dapat diperbaiki dan replikasi sel akan terganggu. Perbaikan DNA sering mengalami mutasi, karena dalam memperbaiki DNA tersebut, sistem perbaikan DNA cenderung membuat kesalahan dan apabila mutasi ini mengenai sel-sel tertentu yang disebut protoonkogen, mutasi tersebut dapat menyebabkan kanker.

### 4. Dampak negatif terhadap protein

Oksidan dapat merusak protein, karena dapat mengadakan reaksi dengan asam-asam amino yang menyusun protein tersebut. Akibatnya protein tersebut akan kehilangan fungsi biologisnya sehingga enzim kehilangan aktivitasnya.

#### **2.1.4 Peran Radikal Bebas Pada Metabolisme Fisilogik Di Mikrozon Hepar**

Pada proses oksidasi reduksi sistem enzim mikrozon hepar, berperan beberapa sistem enzim yaitu Sitokrom P450 reduktase dan sitokrom P450 serta NADH dan oksigen molekuler (Cooreia, 1995).

Tahapan oksidasi tersebut adalah :

- i. Terjadinya ikatan kompleks bahan kimia dengan sitokrom P450.
2. Oksidasi kompleks bahan kimia P450.
3. Terbentuknya oksigen reaktif (radikal bebas) pada kompleks bahan kimia P450.
4. Terbentuknya metabolit yang sudah teroksidasi.

Pada langkah ke empat ini, terbentuk radikal bebas yang bertindak sebagai oksidator. Terbentuknya radikal bebas ini sesuai dengan kebutuhan metabolisme, ataupun bahan berlebihan akan dipungut oleh sistem protektor non enzimatik (superoksida dismutase, glutation peroksidase, atau katalase). Beberapa ahli memperkirakan hasil radikal bebas metabolik tidak langsung merusak sel, tetapi melalui mekanisme tidak langsung yaitu aktivitas fosfolipaseA2, akumulasi lisofosfatide, aktivasi enzim reparasi "poli ADP ribose polimerase", yang selanjutnya diikuti kerusakan oksidatif dari DNA. Jadi dapat disimpulkan bahwa terbentuknya radikal bebas berlebihan pada proses fisiologik tergantung adanya induser bahan kimia lingkungan (Cooreia, 1995).

## 2.2 Karbon Tetraklorida (CCL<sub>4</sub>)

Karbon tetraklorida (CCL<sub>4</sub>) merupakan cairan tidak berwarna, yang digunakan dalam industri sebagai "*degreases*" dan pelarut organik. Karbon tetraklorida banyak digunakan sebagai bahan pendingin (*refrigerator*) lemari es dan bahan profelan untuk kaleng aerosol. Karbon tetraklorida juga digunakan sebagai bahan pembersih untuk keperluan rumah tangga dan sebagai pemadam api karena sifatnya yang tidak mudah terbakar. Saat ini, karbon tetraklorida masih banyak digunakan sebagai pestisida dari golongan *chloride hydrocarbone* oleh petani di Indonesia (WHO, 2002).

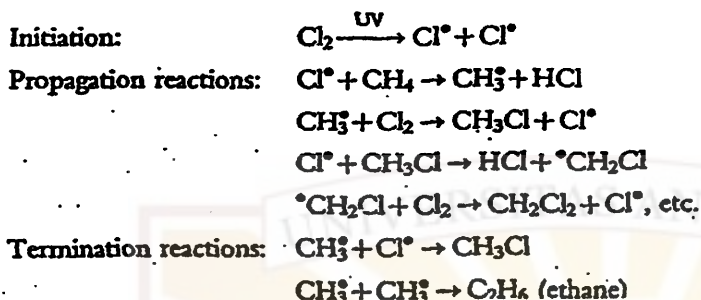
Karbon tetraklorida tidak dapat larut dalam air, namun dapat larut dalam alkohol, kloroform, ether, dan minyak volatil. Karbon tetraklorida cair berwarna jernih dan mudah menguap sehingga jarang ditemukan dalam bentuk cair. Sebagian besar CCL<sub>4</sub> di lingkungan dapat ditemukan dalam bentuk gas, hanya sedikit yang terlarut dalam air. Sifatnya stabil, meskipun dapat diuraikan oleh reaksi kimia untuk mencapai kadar separuhnya. Pada rentang tahun 1980-1990 diperkirakan kadar CCL<sub>4</sub> di atmosfer mencapai 0,5-1 mg/m<sup>3</sup>. Karbon tetraklorida menyebabkan kerusakan lapisan ozon dan pemanasan global.

### 2.2.1 Sintesis CCL<sub>4</sub>

CCL<sub>4</sub> dapat dihasilkan di laboratorium dengan mereaksikan gas klorin dengan hidrokarbon metan, CH<sub>4</sub>. Reaksi CCL<sub>4</sub> dan CL<sub>2</sub> terjadi dengan bantuan sinar UV yang menyediakan energi yang cukup untuk menyebabkan *hemolytic*



*fission* pada ikatan kovalen molekul halogen. Reaksi kemudian berlanjut sebagai reaksi rantai radikal, yaitu:



Gambar 2.1 sintesis  $\text{CCL}_4$  (Halliwell *and* Gutteridge, 2004)

$\text{CH}_4$  berturut-turut diubah menjadi thloromethane ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ , metilklorida), diklorometana ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), trichloroniethane ( $\text{CHCl}_3$ , kloroform), dan tetrachloromethane (karbontetraklorida).  $\text{CHCl}_3$  merupakan anestesi pertama yang secara luas digunakan dalam operasi, diperkenalkan oleh dokter Skotlandia Sir James Young Simpson pada tahun 1847 (Halliwell *and* Gutteridge, 2004).

### 2.2.2 Toksisitas $\text{CCL}_4$

Beberapa informasi menyebutkan bahwa pengaruh karbon tetraklorida bagi kesehatan dapat menyebabkan kerusakan hati, ginjal, sistem syaraf dan penyakit lainnya (ECO-USA, 2006). Dalam lingkungan kehidupan, manusia dan hewan terinduksi karbon tetraklorida terutama melalui udara. Rata-rata saat ini seluruh populasi terinduksi karbon tetraklorida dengan dosis 0,10-0,27 mg/kg berat badan (WHO, 2002). Dosis yang lebih tinggi dapat terjadi pada industri yang menggunakan bahan baku karbon tetraklorida. Karbon tetraklorida dapat diabsorpsi melalui saluran pernafasan dan pencernaan pada manusia dan binatang.

Karbon tetraklorida terdistribusi keseluruh tubuh dengan konsentrasi tertinggi di hepar, otak, ginjal, otot, lemak, dan darah (WHO, 2002).

CCL<sub>4</sub> sebagai pelarut lipid memudahkan senyawa tersebut dapat menyeberangi membran sel dan terdistribusi ke semua organ. Sifat toksik CCL<sub>4</sub> telah terbukti dari beberapa penelitian, bahwa dosis yang kecil sekalipun dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh termasuk susunan syaraf pusat, hepar, ginjal dan peredaran darah (Haliwell *and* Gutteridge, 2004).

Pada prinsipnya kerusakan sel hepar akibat pemberian CCL<sub>4</sub> disebabkan oleh pembentukan radikal bebas, peroksidasi lemak, dan penurunan enzim-enzim antioksidan. Kerusakan hepar secara histologis dapat berupa infiltrasi lemak, nekrosis sentrolobuler, dan akhirnya sirosis (Gene *et al.*, 1999).

CCL<sub>4</sub> menyebabkan kerusakan pada sel melalui reaksi antara metabolitnya yang bersifat radikal bebas dengan struktur-struktur seluler jaringan hepar. Efek hepatotoksik CCL<sub>4</sub> tergantung pada aktivitas metabolik CCL<sub>4</sub> yang berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hepar melalui interaksi dengan transpor elektron NADPH sitokrom P450.

Di retikulum endoplasma hepar CCL<sub>4</sub> dimetabolisme oleh sitokrom P450 CYP3A1 sehingga menghasilkan zat yang reaktif yaitu CCL<sub>3</sub><sup>o</sup>. Radikal bebas CCL<sub>3</sub><sup>o</sup> akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk CCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>o</sup> yang jauh lebih reaktif dari pada CCL<sub>3</sub><sup>o</sup>. CCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>o</sup> bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida. Akibatnya fungsi biologis biomolekuler akan terganggu. CCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>o</sup> berikatan kovalen dengan makromolekul.

$\text{CCL}_3\text{O}_2^\circ$  juga menyebabkan inisiasi lipid peroksidase oleh  $\text{H}^*$  abstraksi, dan peningkatan CYP24A1 dan kerusakan mekanisme  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration, sehingga terjadi peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler. Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler meningkatkan kerusakan protein, DNA, dan aktivasi phospholipase. selanjutnya terjadi peningkatan *cytotoxic aldehyd* dan kerusakan sel (Haliwell and Gutteridge, 2004).

$\text{CCL}_4$  mengaktivasi sel kupffer. Kerusakan (nekrosis) hepatosit juga memicu aktivasi sel kupffer. Sel kupffer yang teraktivasi, dapat melepaskan berbagai mediator pro inflamasi yang dapat memperberat kerusakan hepatosit. Selain itu sel kupffer juga dapat melepaskan ROS yang juga memperberat kerusakan hepatosit (EHC, 1999; Webber *et al*, 2003).

Tingkat racun  $\text{CCL}_4$  yang diberikan kepada hewan menghasilkan akumulasi lemak di hepar akibat penyumbatan dalam sintesis lipoprotein yang membawa trigliserida dari organ ini. Struktur retikulum endoplasma sel hepar menjadi terdistorsi, sintesis protein hepar melambat, kemampuan retikulum endoplasma menyerap ion  $\text{Ca}^{2+}$  dengan  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase menurun. Oleh karena itu terjadi peningkatan pada konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler. Membran nuclear dihancurkan dan akhirnya terjadi nekrosis sel hepar di daerah pusat dari lobus (Haliwell and Gutteridge, 2004).

Pemberian berbagai antioksidan, (termasuk vitamin B, prometazin, propil galat dan GSH) atau inhibitor P450, menyebabkan penurunan toksisitas  $\text{CCL}_4$  secara paralel dengan penurunan peroksidasi lipid pada hewan. Hewan yang

kekurangan vitamin E lebih rentan terhadap CCL<sub>4</sub>. Hewan neonatal memiliki tingkat P450 rendah dan lebih tahan terhadap toksisitas CCL<sub>4</sub>.

### 2.3 Sitokrom P450

Dalam organ dan jaringan binatang terdapat sejumlah enzim yang mampu memetabolisme senyawa larut dalam lemak menjadi senyawa larut dalam air yang selanjutnya mudah disekresikan (Okita and Masters, 1992).

Enzim yang terlibat dalam fase hidroksilasi metabolisme xenobiotik adalah sistem enzim monooksigenase. Sistem enzim ini terdiri dari komponen-komponen yang antara lain adalah enzim NADPH sitokrom P450 reduktase dan sitokrom P450 yang dilokalisasi dari jaringan hati (Murray, 1990 ; Okita and Masters, 1992).

Istilah sitokrom menunjuk pada suatu keluarga protein heme. Sistem enzim ini mengkatalis oksidasi berbagai senyawa. Sitokrom P450 juga terdapat pada prokariot. Subtrat untuk enzim ini meliputi senyawa yang disintesis secara endogen antara lain steroid, asam-asam lemak dan senyawa-senyawa eksogen seperti obat-obatan, senyawa penambah (aditif) makanan atau senyawa bioproduksi industri. Senyawa-senyawa tersebut dapat masuk tubuh melalui makanan, injeksi, pernafasan, dan absorpsi melalui kulit. Sistem enzim tersebut terlibat dalam reaksi-reaksi berikut :

1. Inaktivasi atau aktivasi senyawa asing yang digunakan untuk terapi.



2. Perubahan kimiawi senyawa tidak aktif menjadi molekul reaktif tinggi yang dapat mengakibatkan kerusakan sel, kematian sel atau mengalami mutasi.
3. Biosintesis steroid.
4. Metabolisme asam lemak dan derivatnya (Murray, 1993).

Enzim Sitokrom P450 ini tersebar luas di segala spesies, termasuk bakteri. Enzim ini terdapat paling banyak di sel hati dan eritrosit, meskipun terdapat di semua jaringan. Pada hati dan sebagian besar jaringan lain, sitokrom P450 terutama terdapat di membran retikulum endoplasma halus. Di mikrosom hati, sitokrom P450 dapat membentuk hingga 20% dari protein total (Murray, 2006).

Sitokrom P450 terlibat dalam oksidasi berbagai substrat dengan menggunakan O<sub>2</sub>. Satu atom oksigen memasuki substrat dan yang lainnya membentuk air. Seperti reaksi yang dikenal sebagai reaksi oksidase mono-oksigenase atau *mixed-function*. Fungsi dari sitokrom P450 membutuhkan zat pereduksi (Rh<sub>2</sub>).

Substrat untuk sitokrom P450 termasuk insektisida, seperti heptaklor dan aldrin, hidrokarbon seperti benzpyrene dan toluena dan obat-obatan seperti phenacetin, amfetamin, metadon dan parasetamol. Biasanya produk dari reaksi dengan P450 kurang beracun dibanding substrat, tapi ini tidak selalu terjadi, P450 yang diturunkan dari produk metabolisme parasetamol dan hidrokarbon karsinogenik seperti benzpyrene yang menyebabkan banyak kerusakan sel (Halliwell and Gutterige, 2004).



Adrenal korteks mitokondria mengandung sitokrom P450 yang terlibat dalam hidroksilasi kolesterol untuk memberikan hormon steroid adrenal (misalnya aldosteron, hidrokortison dan kortikosteron) tetapi elektron yang dibutuhkannya disumbangkan oleh protein non-heme besi yang dikenal sebagai adrenodoxin. Sebuah enzim flavoprotein transfer elektron dari NADPH untuk adrenodoxin (Haliwell *and* Gutterige, 2004).

Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar sitokrom P450 dapat diinduksi baik oleh senyawa endogen maupun senyawa eksogen. Sebagai contoh pemberian fenobarbital (PB) atau obat-obat lain yang mengakibatkan retikulum endoplasma halus mengalami hipertrofi dan dalam waktu 4-5 jam terjadi peningkatan 3 sampai 4 kali jumlah sitokrom P450. Pada saat proses induksi berlangsung juga terjadi peningkatan transkripsi mRNA untuk sitokrom P450. Penelitian lain menunjukkan bahwa alkohol dan aseton keduanya menginduksi dua gena subfamili sitokrom P450 yang berbeda dan dengan mekanisme yang berbeda. Di satu pihak induksi terjadi pada tingkat transkripsi mRNA. Pemberian senyawa organik sedikit saja menyebabkan peningkatan protein sitokrom P450IIE1 tanpa mempengaruhi jumlah mRNA. Pada tikus yang menderita diabetes, jumlah sitokrom P450IIE1 terinduksi menjadi 6 kali disertai peningkatan mRNA 10 kali tanpa peningkatan transkripsi gena. Induksi sitokrom P450 oleh suatu senyawa juga dapat menginduksi senyawa lain yang mengakibatkan hal-hal yang tidak diharapkan dan diinginkan. Induksi tersebut dapat meningkatkan metabolisme senyawa itu sendiri atau senyawa lain yang dapat digunakan sebagai substrat untuk sitokrom P450 (Okita *and* Masters, 1992).

Xenobiotik tertentu bersifat sangat toksik bahkan pada kadar rendah. Perubahan xenobiotik menjadi suatu metabolit reaktif dikatalis oleh sitokrom P450, dan perubahan metabolit reaktif menjadi metabolik nontoksik dikatalis oleh GSH-transferase atau epoksida hidrolase (Murray, 2006).

Menurut Craddock *et al* (1989), jumlah sitokrom P450 dapat meningkat sesuai dengan bertambahnya umur, dan dikatakan bahwa di awal kehidupan anak, tidak ditemukan sitokrom P450. Andaikata ada, jumlahnya sangat rendah. Peningkatan jumlah sitokrom P450 dari janin sampai menjadi anak tergantung pada banyak faktor misalnya jenis kelamin, status gizi dan sebagainya. Kana-zawa *et al* (1991) melaporkan bahwa jumlah sitokrom P450 tergantung pada status nutrisi, jenis kelamin, galur dan cemaran lingkungan. Pemberian ransum defisiensi vitamin C pada tikus dapat menurunkan jumlah sitokrom P450, sedangkan pemberian pestisida, hidrokarbon aromatis polisiklik meningkatkan kandungan sitokrom P450 di hepar.

## **2.4 Anti Oksidan**

### **2.4.1 Pengertian Anti Oksidan**

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu zat yang dapat menghambat/memperlambat proses oksidasi. Oksidasi adalah jenis reaksi kimia yang melibatkan pengikatan oksigen, pelepasan hidrogen atau pelepasan elektron. Proses oksidasi adalah peristiwa alami yang terjadi di alam dan dapat terjadi dimana-mana, tak terkecuali di dalam tubuh (Haliwell *and* Gutteridge, 2004).

Dalam pengertian biokimia, antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron, namun dalam arti biologis, pengertian antioksidan lebih luas yaitu semua senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan (Suyohudoyo, 2000).

#### 2.4.2 Jenis-Jenis Antioksidan

Dalam meredam dampak negatif oksidan ditetapkan strategi dua lapis yaitu mencegah terhimpunnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan dan mencegah reaksi rantai yang berkelanjutan. Berdasarkan dua mekanisme pencegahan dampak negatif oksidan tersebut, antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu ;

1. Antioksidan pencegah.

Tujuan anti oksidan ini adalah mencegah terbentuknya radikal bebas hidroksil yaitu radikal yang paling berbahaya, contohnya enzim katalase, glutathion peroksidase dan sistein.

2. Antioksidan pemutus rantai

Dalam kelompok antioksidan ini termasuk vitamin E, Vitamin C, betakaroten, glutathion dan sistein (Suryohudoyo, 2000).

Anti oksidan juga dapat dibedakan menjadi :

1. Antioksidan Enzimatik

Antioksidan ini terdiri atas :

- 1) Enzim-enzim yang dapat mengubah Reaksi Oxygen Species (ROS).

Contoh: Superoksida Dismutase, Katalase, dan Glutathion.

- 2) Molekul-molekul yang mengemblok aktivitas enzim. Contoh: Allopurinol, Xanthine Oksidase Inhibitor.
- 3) Molekul-molekul yang dapat menangkap ion metal yang merupakan katalis potensial dari reaksi radikal bebas.

## 2. Antioksidan Non- Enzimatik

Antioksidan ini bereaksi dengan radikal bebas secara langsung (*mole to mole*), dipakai selama radikal bebas berlangsung. Misalnya : Vitamin A (Beta-Karoten), vitamin B2, Vitamin C, Vitamin E, Glutation, Manitol, Probuocol, N-Acetyl Cystein, dan Co-Enzim Q10.

Menurut Sri (2006), berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibedakan menjadi:

### 1. Antioksidan Endogen

Antioksidan endogen adalah antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri yang berupa enzim antara lain:

#### a. Superoksida Dismutase (SOD)

Enzim SOD yang terletak di mitokondria membutuhkan Mn (mangan) sedangkan dalam sitosol bekerjanya enzim SOD memerlukan bantuan Cu (tembaga) dan Zn (seng). Dengan demikian pengendalian tahap awal radikal bebas yang terbentuk pada tingkat awal memerlukan bantuan mineral Mn, Cu, dan Zn. Selenium (Se) juga merupakan mineral yang berperan sebagai antioksidan. Keempat mineral tersebut perlu tersedia cukup dalam makanan.

b. Glutathione Peroksidase

Glutathione Peroksidase adalah enzim yang berperan dalam menghilangkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalam tubuh dan mempergunakannya untuk merubah glutathione (GSH) menjadi glutathione teroksidasi (GSSG). Enzim tersebut mendukung aktivitas enzim SOD bersama-sama dengan enzim katalase dan menjaga konsentrasi oksigen akhir agar stabil dan tidak berubah menjadi prooksidan. Enzim ini berada di eritrosit (sel darah merah).

c. Katalase

Enzim katalase berada pada *endoplasmic reticulum* dalam sel, pada *pulmonary epithelium type II*, pada *clara cell* dan ada pula di dalam *alveolar macrophage* (Mukono, 2005). Enzim ini disamping mendukung aktivitas enzim SOD juga dapat mengkatalis perubahan berbagai macam peroksida dan radikal bebas menjadi oksigen dan air.

2. Antioksidan Eksogen

Antioksidan eksogen adalah antioksidan alami yang diperoleh dari tanaman diantaranya adalah vitamin C, betakaroten, vitamin E (tokoferol), flavonoid dan senyawa fenolik.

a. Vitamin C (Asam Askorbat)

Vitamin C adalah substansi yang larut dalam air. Vitamin C merupakan antioksidan yang berperan penting dalam membantu menjaga kesehatan sel, meningkatkan penyerapan asupan zat besi dan memperbaiki



sistem kekebalan tubuh. Sumber vitamin C yang penting berada dalam makanan terutama berasal dari buah-buahan dan sayur-sayuran.

b. **Betakaroten**

Betakaroten merupakan salah satu bentuk pigmen dari karoten (carotenoid). Betakaroten merupakan salah satu bentuk senyawa karoten sebagai penawar yang kuat untuk oksigen reaktif. betakaroten sebagai antioksidan yang larut dalam lemak yang dapat menjaga terhadap proses pengrusakan oksidasi dinding sel yang terdiri dari lemak.

c. **Vitamin E (Tokoferol)**

Vitamin E adalah substansi yang larut dalam lemak merupakan antioksidan utama dalam semua membran seluler dan melindungi asam lemak tak jenuh terhadap peristiwa oksidasi. Berbagai penelitian menunjukkan tokoferol dapat menghambat pertumbuhan kanker payudara manusia pada kultur melalui induksi berhentinya sintesis DNA, diferensiasi sel, dan apoptosis. Vitamin E berfungsi mencegah penyakit hati, membantu memperlambat penuaan karena oksidasi, serta mensuplai oksigen ke darah sampai ke seluruh tubuh.

d. **Flavonoid**

Senyawa flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat berwarna kuning yang ditemukan pada tumbuhan. Senyawa flavonoid ini umumnya memiliki sifat antioksidan sehingga mampu menghambat aktivasi karsinogen.

#### e. Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik merupakan antioksidan yang berperan dalam penghambatan karsinogenik dan menghambat proliferasi sel sehingga mampu menghambat perkembangan tumor setelah inisiasi melalui *cell cycle arrest* (Jenny *et al*, 2006).

### 2.5 Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

#### 2.5.1. Taksonomi

Klasifikasi tanaman rosella adalah (Mardiah *et al.*, 2009) :

Regnum	: Plantae
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Familia	: Malvaceae
Genus	: <i>Hibiscus</i> L.
Spesies	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

### 2.5.2. Nama Lain

Tanaman rosella dapat tumbuh baik di daerah yang beriklim tropis dan yang beriklim subtropis. Habitat asli rosella berasal dari Nigeria, tetapi dapat tumbuh dan berkembang di seluruh dunia (Aspan *et al.*, 2010). Menurut Mardiah *et al* (2009), Rosela mempunyai habitat yang sangat luas, terbentang dari India hingga Malaysia, namun saat ini tanaman rosella telah tersebar luas di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia. Karena itu rosella mempunyai nama umum yang berbeda-beda di berbagai daerah (Mardiah *et al.*, 2009).

Tumbuhan Hibiscus sabdariffa Linn ini dalam bahasa Indonesia disebut rosella. Hibiscus sabdariffa Linn di daerah Sunda dikenal dengan nama gamel walanda, di daerah Ternate dengan nama kasturi rortha, di daerah Jawa Tengah dengan nama mrambos hijau, di Padang dengan nama Asam Jarot, di daerah Sumatra Selatan dengan nama kesew jawe, dan di daerah Muara Enim dikenal dengan nama asam rejang (Maryani dan Kristiana, 2008; Mardiah *et al.*, 2009).

### 2.5.3. Karakteristik dan Morfologi

Tanaman rosella merupakan herba tahunan yang bergetah. Tinggi tanaman ini dapat mencapai ketinggian 0.5–3 meter, serta mengeluarkan bunga hampir sepanjang tahun. Batangnya berbentuk bulat, tegak, berkayu dan berwarna merah. Daunnya berupa daun tunggal, berbentuk bulat telur, pertulangan daunnya menjari, berujung tumpul, tepi bergerigi dan dengan pangkal berlekuk. Panjang daunnya 6-15 cm dan dengan lebar daun 5-8 cm. Tangkai daun bulat berwarna hijau dengan panjang 4-7 cm (Mardiah *et al.*, 2009).

Bunga tanaman rosella yang keluar dari ketiak daun merupakan bunga tunggal, artinya pada setiap tangkai tanaman rosella hanya terdapat satu bunga. Bunga dari tanaman rosella ini mempunyai 8-11 helai kelopak bunga yang berbulu dengan panjang sekitar 1 cm, dengan pangkal yang saling berlekatan, dan berwarna merah. Kelopak bunga ini sering dianggap sebagai bunga oleh masyarakat, bagian inilah yang sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman (Maryani dan Kristiana, 2008). Mahkota bunga berbentuk corong terdiri dari 5 helaian, panjangnya sekitar 3-5 cm. Tangkai sari yang merupakan tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran pendek dan tebal, panjang sekitar 5 mm dan lebar sekitar 5 mm. Putik berbentuk tabung berwarna kuning atau merah (Mardiah *et al.*, 2009).

Buah berbentuk kotak kerucut, berambut, terbagi menjadi 5 ruang, berwarna merah. Bentuk biji menyerupai ginjal, berbulu dengan panjang 5 mm dan lebar 4 mm. Saat masih muda, biji berwarna putih dan setelah tua berubah menjadi abu-abu (Mardiah *et al.*, 2009; Devi, 2009).



Gambar 2.3 Bunga Rosella



Tanaman rosella dapat tumbuh disegala macam tanah akan tetapi yang paling cocok pada tanah yang subur dan gembur atau tanah yang mempunyai struktur yang dalam, bertekstur ringan dan berdrainase baik. Rosella masih dapat toleran terhadap tanah masam dan agak alkalin, tetapi tidak cocok ditanam di tanah salin atau berkadar garam tinggi. Kemasaman tanah (pH) optimum untuk rosella adalah 5,5-7 dan masih toleran juga pada pH 4,5-8,5. Selama pertumbuhan rosella tidak tahan terhadap genangan air.

#### **2.5.4 Penggunaan Secara Tradisional**

Daun rosella secara tradisional digunakan untuk kosmetik dan makanan, sedangkan bijinya untuk peluruh air seni dan gangguan pencernaan. Kelopak bunga rosella digunakan sebagai obat mual. Seduhan kelopak bunga rosella digunakan untuk memperlancar buang air besar. Bunga rosella juga digunakan untuk mengurangi nafsu makan, gangguan pernafasan yang disebabkan oleh flu dan rasa tidak enak di perut. Rosella digunakan untuk mengatasi bisul dan radang pada kulit, luka bakar, sariawan dan infeksi herpes zoster.

#### **2.5.5. Kandungan Rosella**

Berdasarkan Menkes RI no.235/men.kes.par/VI/79, kandungan kelopak bunga rosella segar dalam 100 gr yaitu air 9,2 gr, protein 1,145 gr, lemak 2,61 gr, serat 12,0 gr, abu 6,90 gr, kalsium 1,263 mg, fosforus 273,2 mg, zat besi 8,98 mg, karotena 0,029 mg, thiamine 0,117 mg, riboflavin 0,277 mg, niacin 3,765 mg, asam askorbat 6,7 mg.



Kelopak bunga rosella juga mengandung flavonoid (Mardiah *et al.*, 2009), saponin, tannin, *cyanogenic glycoside* (Akanya *et al.*, 1997), Antosianin (Wang *et al.*, 2000).

Menurut Shivali (2008), setiap 100 gr kelopak bunga rosella segar mengandung zat gizi sebagai berikut :

No	Unsur	Jumlah
1	Protein	1,145 g
2	Lemak	2,61 g
3	Serat	12,0 g
4	Abu	6,90 g
5	Kalsium	12,63 mg
6	Phospor	273,2 mg
7	Besi	8,98 mg
8	Caroten	0,029 mg
9	Thiamin	0,117 mg
10	Riboflavin	0,277 mg
11	Niacin	3,765 mg
12	Asam askorbat	6,7 mg

Tabel 2.1 Kandungan rosella Shivali (2008)

### 2.5.6 Efek Farmakologi Rosella

Menurut Aspan (2010) efek farmakologi rosella adalah :

#### 1. Anti hipertensi

Uji *In vivo* menggunakan ekstrak metanol kelopak bunga rosella yang dibuat dengan soxhletasi serbuk kelopak bunga rosella menunjukkan

efek vasodilatasi pada aorta tikus hipertensif spontan melalui jalur vasodilatasi yang tergantung dan tidak tergantung endotelium.

Pada uji klinik yang melibatkan 54 orang penderita hipertensi moderat, yang meminum seduhan rosella setiap hari selama 12 hari dapat menurunkan 11% tekanan darah sistolik dan diastolik.

## 2. Antiobesitas

Pemberian ekstrak air mahkota bunga rosella dengan dosis 120 mg/kg BB/hari peroral selama 60 hari secara bermakna mengurangi berat badan mencit yang digemukakan, meningkatkan asupan cairan, dan menurunkan kadar Alamin Aminotransferase (ALT).

## 3. Antiinflamasi

Efek antiinflamasi rosella ditunjukkan oleh senyawa polifenol hasil ekstraksi rosella. Pada kadar 0,01-0,5 mg/ml, senyawa ini dapat menghambat enzim ksantin oksidase sampai 93% dengan  $EC_{50} = 0,742$  mg/ml. Dosis 0,5 mg/ml dapat menghambat nitran dan produksi  $PGE_2$  dan aktivitas iNOS protein pada makrofag sampai 20% pada mencit yang di induksi lipopolisakarida (LPS). Dosis 10-40 mg/kg dapat menurunkan perubahan patologi hepar hewan uji. Pada mencit yang diberi LPS, polifenol secara bermakna menurunkan kadar alanin dan aspartat aminotransferase dalam serum. Ekstrak metanol dengan kadar polifenol tinggi dapat menurunkan enzim lipid peroksidase dan radang pada hepar dan meningkatkan aktivitas katase dan glutation.

#### 4. Antikolesterol

Uji klinik yang melibatkan 42 orang, usia 18-75 tahun, kadar kolesterol serum 175-327 mg/dl menunjukkan bahwa pemberian 500 mg ekstrak air bunga rosella kering perhari selama 4 minggu dapat menurunkan kadar kolesterol 8.3 – 14,4 %. Ekstrak rosella menghambat oksidasi LDL, menurunkan serum trigliserida dan serum kolesterol.

#### 5. Hepatoprotektif

Ekstrak mahkota bunga rosella kering (kaya antosianin) dosis 100 mg/kg BB dua kali sehari terbukti mempunyai efek hepatoprotektif pada tikus yang sebelumnya diinduksi dengan 2,4 dinitrofenilhidrazin (2,3-DNPH). Ekstrak secara bermakna menurunkan kadar enzim hepar seperti alanin dan amino transferase dan mengurangi kerusakan hepar. Ekstrak juga secara bermakna meniadakan efek DNPH pada protein hepar, superoksida dismutase dan glutathion menghambat pembentukan malondialdehid pada hepar.

#### 6. Ekstrak mahkota bunga rosella kering (kaya antosianin) dosis 100 mg/kg BB dua kali sehari terbukti mempunyai efek hepatoprotektif pada kelinci yang sebelumnya diinduksi dengan 2,4 dinitrofenilhidrazin (2,3-DNPH) secara bermakna mengurangi kadar produk peroksidasi lipid, meningkatkan kadar antioksidan seperti katalase, superoksida dismutase, glutathion peroksidase dan glutathion tereduksi pada jaringan otak tikus.

## 2.6 Hepar

### 2.6.1 Anatomi Fisiologi Hepar

#### 2.6.1.1 Anatomi Hepar

Hepar adalah kelenjar terbesar dalam tubuh, yang terletak di bagian teratas rongga abdomen di sebelah kanan dibawah diafragma. Hepar terbagi dalam dua belahan utama, kanan dan kiri. Permukaan atas berbentuk cembung dan terletak di bawah diafragma, permukaan bawah tidak rata dan memperlihatkan lekukan, yaitu fisura transversa. Permukaannya dilintasi pembuluh darah yang masuk dan keluar hepar. Fisura longitudinal memisahkan belahan kanan dan kiri di permukaan bawah, sedangkan ligamen falsiformis melakukan hal yang sama dipermukaan atas hepar (Pearce, 2008).

Ligamen fasliformis berjalan dari hepar ke diafragma dan dinding depan abdomen. Permukaan hepar diliputi oleh peritoneum viseralis, kecuali daerah pada permukaan posterior yang melekat langsung pada diafragma. Beberapa ligamentum yang merupakan peritoneum membantu menyokong hepar. Dibawah peritoneum terdapat jaringan ikat padat yang disebut dengan *capsula glisson*, yang melintasi permukaan seluruh organ. Bagian paling tebal kapsula ini terdapat pada porta hepatis, membentuk rangka untuk cabang vena porta, arteri hepatica, dan saluran empedu. *Porta hepatis* adalah fisura pada hepar tempat masuknya vena porta dan arteri hepatica dan tempat keluarnya duktus hepatica (Price *at al.*, 2002).

### 2.6.1.2 Fisiologi Hepar

Hepar mempunyai fungsi yang sangat beraneka ragam. Sirkulasi vena porta yang menyuplai 75% dari suplai asinus memegang peranan penting dalam fisiologi hepar, terutama dalam hal metabolisme karbohidrat, protein, dan asam lemak. Telah dibuktikan bahwa pada zona-zona hepatosit yang memperoleh oksigenasi yang lebih baik (zona 1) mempunyai kemampuan glukogenesis dan sintesis glutathion yang lebih baik dibandingkan dengan zona 3 (Sudooyo, 2007).

Fungsi utama hepar adalah pembentukan dan ekskresi empedu. Hepar mengekskresikan empedu sebanyak satu liter perhari kedalam usus halus. Unsur utama empedu adalah air (97%), elektrolit, garam empedu. Walaupun bilirubin (pigmen empedu) merupakan hasil akhir metabolisme dan secara fisiologis tidak mempunyai peran aktif, tapi penting sebagai indikator penyakit hepar dan saluran empedu, karena bilirubin dapat memberi warna pada jaringan dan cairan yang berhubungan dengannya (Sudooyo, 2007).

Hasil metabolisme monosakarida dari usus halus diubah menjadi glikogen dan disimpan di hepar (glikogenesis), dari depot glikogen ini disuplai glukosa secara konstan ke darah (glikogenolisis) untuk memenuhi kebutuhan tubuh. Sebagian glukosa dimetabolisme dalam jaringan untuk menghasilkan tenaga dan sisanya diubah menjadi glikogen (yang disimpan dalam otot) atau lemak (yang disimpan dalam jaringan subkutan (Sudooyo, 2007).

Fungsi hepar dalam metabolisme protein adalah menghasilkan protein plasma berupa albumin (yang diperlukan untuk mempertahankan tekanan osmotik



koloid), protrombin, fibrinogen, dan faktor pembekuan lainnya. Fungsi hepar dalam metabolisme lemak adalah menghasilkan lipoprotein, kolesterol, fosfolipid, dan asam asetoasetat (Sodoyo, 2007).

Hepar merupakan system sentral system imun. Sel kupffer yang meliputi 15% dari masa hepar serta 80% dari total populasi fagosit tubuh, merupakan sel yang sangat penting dalam penanggulangi antigen yang berasal dari luar tubuh dan mempresentasikan antigen kepada limfosit (Sodoyo, 2007) .

### 2.6.2 Struktur Mikroskopis Hepar

Setiap lobus hepar terbagi menjadi struktur-struktur yang disebut *lobulus*, yang merupakan unit mikroskopis dan fungsional organ. Setiap lobulus merupakan badan heksagonal yang terdiri atas lempeng-lempeng sel hepar berbentuk kubus. Hepar manusia memiliki maksimal 100.000 lobulus (Price, *at al.*, 2002).

Diantara lempengan sel hepar terdapat kapiler-kapilar yang disebut *sinosoid*, yang merupakan cabang vena porta dan arteri hepatis. Sinusoid dibatasi oleh sel fagositik atau sel kupffer. Sel kupffer merupakan sistem monosit-makrofag, dan fungsi utamanya adalah menelan bakteri dan benda asing lain dalam darah. Sejumlah 50 % dari semua makrofag dalam hepar adalah sel kupffer, sehingga hepar merupakan salah satu organ penting dalam pertahanan dalam melawan invasi bakteri dan agen toksik (Price, *at al.*, 2002).

Selain cabang-cabang vena porta dan arteri hepatis yang melingkari bagian perifer lobulus hepar, juga terdapat saluran empedu. Saluran empedu

interlobular membentuk kapiler empedu. Saluran empedu interlobular membentuk kapiler empedu yang sangat kecil yang disebut sebagai *kanalikuli*, yang berjalan ditengah lempengan sel hepar. Empedu yang dibentuk dalam hepatosit diekskresikan kedalam kanalikuli yang bersatu membentuk saluran empedu yang makin lama makin besar sehingga membentuk duktus koledokus (Price, *at al.*, 2002).

### 2.6.3. Sirkulasi Hepar

Hepar memiliki dua suplai darah yaitu dari saluran cerna dan limpa melalui *vena porta hepatica* dan dari aorta melalui *arteri hepatic*. Sekitar sepertiga darah yang masuk adalah darah arteria dan dua pertiganya adalah darah vena dari vena porta. Volume total darah yang melewati hepar setiap menitnya adalah 1.500 ml, dan dialirkan melalui vena hepatica kanan dan kiri yang selanjutnya bermuara pada vena kava inferior (Price *et al.*, 2002). Arteri hepatica yang keluar dari aorta memberikan seperlima darahnya pada hepar, darah ini mempunyai kejenuhan oksigen 95 sampai 100 persen (Evelyn *et al.*, 2008).

Vena porta terletak di antara dua daerah kapiler, yang satu terletak dalam hepar, dan satu lagi terletak dalam saluran cerna. Saat mencapai hepar, vena porta bercabang-cabang yang menempel melingkari lobulus hepar. Cabang ini kemudian mempercabangkan vena-vena interlobularis. Vena itu selanjutnya membentuk sinusoid dan bermuara dalam vena sentralis. Vena sentralis dari beberapa lobulus bersatu membentuk vena sublobularis yang selanjutnya menyatu dan membentuk vena hepatica (Price *et al.*, 2002). Vena porta mengantarkan

empat perlima darahnya ke hepar, darah ini mengandung kejenuhan oksigen hanya 70 persen sebab beberapa O<sub>2</sub> telah diambil oleh limpa dan usus. Darah vena porta ini membawa zat makanan yang telah diabsorpsi oleh mukosa usus ke hepar. Vena hepatica mengembalikan darah dari hepar ke vena kafa inferior. Di dalam vena hepatica tidak terdapat katup (Evelyn *et al.*, 2008).

#### 2.6.4 Sel Hepar (Hepatosit)

Hepatosit merupakan kira-kita 80% dari populasi sel hepar. Hepatosit berbentuk poligonal dan disusun berupa lempangan atau trabekel di antara sinusoid. Sisi sel yang terpapar pada sinusoid di sebut *domein sinusoidal* dari plasmalema, dan sisi yang berkontak dengan hepatosit bersebelahan adalah *domein lateral*. Sebagian dari membran lateral yang membentuk dinding dari kanakuli biliaris intersel adalah *domein kanakuli biliaris* (Fawcett, 2002).

Intinya bulat, dengan kelompok heterokromatin di tepian dan satu atau dua nukleoli nampak jelas. Ukuran inti bervariasi, 40-60% diantaranya adalah polipoid. Kebanyakan hepatosit memiliki satu inti, namun 25% diantaranya adalah binuklear. Sisterna perinuklear memiliki lamina nuklear tipis pada permukaan dalamnya. Terdapat pula unsur-unsur tubuler dari retikulum endoplasma dan banyak poli ribosom bebas tersebar di dalam sitoplasma. Retikulum endoplasma kasar adalah tempat pembuatan unsur protein dari sitoplasma dan protein plasma dari darah. Retikulum endoplasma kecil terdiri atas jalinan tubuli bercabang dan saling berhubungan. Di dalam lumennya sering ada globul padat kecil yaitu lipoprotein serum berdensitas sangat rendah (VLDL) yang

dibuat dalam hepar dan dibebaskan ke dalam darah sebagai carier dari kolesterol. Membran organel ini kaya semacam enzim yang disebut sitokrom-P450 yang terlibat dalam sistesis prostaglandin agen biologik aktif lainnya. Sitokrom-P450 juga berperan penting dalam katabolisme obat dan senyawa eksogen yang berpotensi toksik lainnya (Fawcett, 2002).

Mitokondria dari hepatosit memanjang, dengan krista lemular atau tubuler terjulur ke bagian dalamnya, yang terisi matrik yang berdensitas relatif rendah yang mengandung sedikit granula matrik padat (Fawcett, 2002).

Kompleks golgi sel hepar terdiri atas lima sampai sembilan siterna yang agak melebar ujungnya. Mereka terletak di sepanjang kedua sisi sel dekat kanalikuli biliaris. Banyak vesikel kecil pada siterna trans-golgi mengangkut unsur-unsur empedu ke kanalikulus biliaris terdekat. Terdapat sebuah badan padat bermembran dengan diameter 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  di dekat badan-badan golgi. Mereka ini menghasilkan reaksi positif pada pulasan untuk hidrolase asam dan karenanya diidentifikasi sebagai lisosom. Badan bermembran lain berdiameter 0,2-0,8  $\mu\text{m}$ , yang tersebar dalam sitoplasma, adalah peroksisom. Mereka ini mengandung katalase dan oksidase pembangkit peroksida hidrogen lain. Pada rodensia percobaan, sebuah nukleoid berkrystal terdapat eksentris dalam matriks bergranul halus dari peroksisom. Nukleoid yang dipisahkan dari hepar ternyata terdiri atas enzim uricase. Nukleoid tidak terdapat dalam peroksisom hepar manusia dan makna fungsional dari peroksisom hepar belum jelas (Fawcett, 2002).



Pada sediaan histologi rutin hepar, banyak sel-sel yang memiliki daerah dalam stoplasma yang bebas organel berbentuk tidak teratur yang tidak terpulask. Pada sediaan yang dipulas dengan reaksi Schiff-asm priodat terdapat karbohidrat, daerah ini ternyata mengandung endapan glikogen. Pada mikrograf elektron, glikogan yang terdapat dalam bentuk partikel padat-elektron sampai berdiameter 0,1  $\mu\text{m}$  disebut partikel  $\alpha$ . Ini adalah agregat dari subunit yang lebih kecil, berdiameter 20-30 nm, yang disebut partikel  $\beta$ . Glikogen adalah bentuk timbunan dari karbohidrat, yang dapat diambil untuk mempertahankan konsentrasi glukosa normal di dalam darah (Fawcett, 2002).

Hepatosit mengandung lipid yang bervariasi. Dalam hepar normal, lipid hanya sedikit, namun sangat meningkat setelah minum alkohol atau substansi hepatotoksik lain. Sitoskelet dari sel hepar terdiri atas lapisan subplasmalema dari sitokeratin dan filamen aktin. Fungsinya membantu mempertahankan tetap terbukanya kanalikuli biliaris. Berkas filamen intermediat meluas ke dalam korteks, mengumpul pada sentrosom dan kompleks pori dari selaput inti untuk membentuk kerangka sitoskelet di dalam sitoplasma (Fawcett, 2002).

Membran sel memiliki tampilan struktur halus sama diseluruh permukaannya, namun secara fungsional terdapat domain-domain tersendiri, yang dapat ditetapkan secara sitokimia. Dengan antibodi berlabel dapat ditetapkan lokasi-lokasi reseptor untuk sialoglikoprotein, mannose-6-fosfat, dan substansi lain yang masuk melalui endositosis bermedia reseptor, di domein sinusoidal. Domain kanalikuli biliaris mengandung amino peptidase, fosfatase, dan tiga glikoprotein yang tidak terdapat di lain tempat pada permukaan sel. Adenil siklase



dan  $\text{Na}^+$ , dan  $\text{K}^+$ -ATPase ditemukan pada domain lateral, yang berbatasan dengan sel-sel bersebelahan (Fawcett, 2002).

### 2.6.5 Jejas Seluler Hepatosit

Sel hepar dapat menjadi tidak normal baik bentuk, komponen atau fungsi sel karena keracunan atau karena penyebab lain, seperti hipoksia, infeksi, reaksi imunologik, kerusakan genetika dan ketidak seimbangan nutrisi. Kerusakan sel hepar tergantung pada kadar racun yang masuk ke dalam tubuh, aliran darah dan pola enzim dalam sel. Sel yang rusak atau yang luka dapat kembali normal atau dapat menjadi lebih parah dengan melalui beberapa proses seperti degenerasi atau nekrosis (Cotrain *et al.*, 1999).

Proses terjadinya jejas seluler adalah sebagai akibat peningkatan kalsium intraseluler serta kehilangan homeostatis kalsium, penurunan ATP, kerusakan permeabilitas membran sel dan kerusakan yang bersifat ireversibel pada mitokondria (Cotrain *et al.*, 1999).

Pada keracunan akut, terjadi kerusakan sel dan penurunan ATP. Akibatnya sistem pompa natrium tidak dapat berfungsi untuk mengeluarkan ion-ion Na dari dalam sel keluar, sehingga terjadi penumpukan ion Na di dalam sel. Akibatnya konsentrasi ion Na dan tekanan osmosis dalam sel meningkat yang mengakibatkan pemasukan air ke dalam sel, sehingga terjadi pembengkakan pada organela-organela di dalam sel. Dibawah mikroskop cahaya, terlihat titik-titik di dalam sitoplasma yang menandai pembengkakan organela-organela sel. Keadaan ini disebut sebagai degenerasi keruh.

Apabila pemasukan air ke dalam sel berlangsung terus, maka akan terbentuk vakuola-vakuola yang berisi air dalam sitoplasma. Dengan mikroskop cahaya akan terlihat sebagai rongga yang jernih di dalam sitoplasma. Dengan mikroskop elektron organela-organela sel nampak semakin mebangkakan dan membran sel mengalami kerusakan, keadaan ini disebut sebagai degenerasi hidrofik (Cotrain *et al.*, 1999).

Akibat penurunan ATP pada jejas hepatosit, maka proses pembentukan lipoprotein terganggu. Hal ini mengakibatkan trigliserida tertimbun dan tidak dapat dikeluarkan dari hepatosit yang akan menimbulkan degenerasi lemak. Dibawah mikroskop cahaya akan terlihat vakuola besar yang berisi lemak (Cotrain *et al.*, 1999).

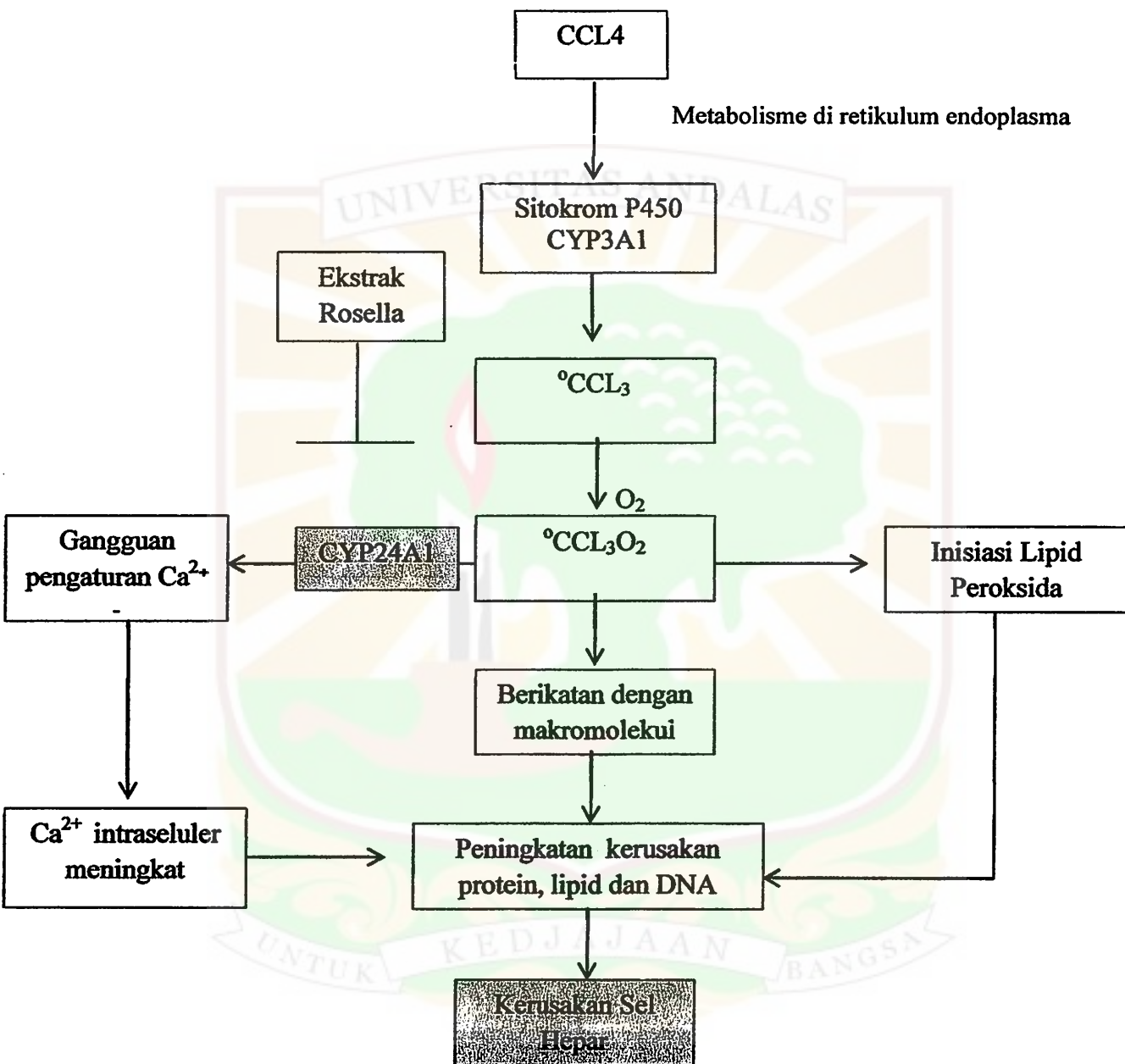
Apabila kerusakan membran semakin meningkat, maka akan terjadi nekrosis. Membran sel mengalami lisis, sehingga batas antar sel menjadi kabur. Neukelus mengalami perubahan morfologi menjadi piknotis, karioreksis dan kariolisis. Dibawah mikroskop elektron akan terlihat kerusakan membran sel makin meningkat, mitokondria dan organela yang lainnya pecah sehingga akan menimbulkan kematian sel (Cotrain *et al.*, 1999).

Kematian sel mempunyai dua bentuk yaitu nekrosis dan apoptosis. Nekrosis merupakan suatu bentuk perubahan morfologi yang mengikuti kematian sel dalam jaringan hidup, sedangkan apoptosis merupakan suatu proses kehilangan sel yang terprogram dalam berbagai jaringan yang terjadi baik pada keadaan fisiologis maupun patologis

### BAB III

#### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

##### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konsep (Halliwell and Gutteridge, 2004).

### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Efek hepatotoksik  $\text{CCl}_4$  tergantung pada aktifitas metabolik  $\text{CCl}_4$  yang berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hati melalui interaksi dengan tanspor elektron NADPH sitokrom P450.  $\text{CCl}_4$  dimetabolisme di retikulum endoplasma oleh sitokrom P450 CYP3A1 menghasilkan zat yang reaktif yaitu  $\text{CCL}_3^\circ$ .

Radikal bebas  $\text{CCL}_3^\circ$  akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  yang jauh lebih reaktif dari pada  $\text{CCL}_3^\circ$ .  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida.  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  menyebabkan inisiasi lipid peroksidase dan juga mempengaruhi aktifitas CYP24A1 yang berakibat terjadinya gangguan pengaturan  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga terjadi peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler, akibatnya terjadi peningkatan kerusakan protein lipid dan DNA. Selanjunya terjadi kerusakan sel hati.

### 3.3 Hipotesis

- 3.2.1 Ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ .
- 3.2.2 Ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap kerusakan sel hepar tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ .

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Jenis dan Desain Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris dengan menggunakan rancangan penelitian *post test only control group design* yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan perlakuan dengan kelompok kontrol pada saat sesudah perlakuan (Singarimbun, 2006).

#### **4.2. Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi, Laboratorium Biomedik, dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Andalas Padang untuk aktifitas sitokrom P450 dan kerusakan sel hepar.

#### **4.3. Populasi dan sampel**

##### **4.3.1. Populasi**

Populasi penelitian ini adalah tikus putih strain wistar yang didapatkan dari unit pengembangan hewan penelitian UPHP Surabaya.

##### **4.3.2. Sampel**

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar dengan kriteria inklusi sebagai berikut:



- a. Umur 2-3 bulan
- b. Berat badan rata-rata 200-250 gr

Kriteria eksklusi yaitu tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati.

Besar sampel minimal penelitian ditentukan berdasarkan rumus Hanafiah (1997) dalam Hartini (2011), yaitu :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$3(r-1) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$3r \geq 15 + 3$$

$$3r \geq 18$$

$$r = \frac{18}{3}$$

$$r = 6$$

Keterangan :

t : treatment / perlakuan

r : replikasi / ulangan

Jadi jumlah sampel keseluruhan  $4 \times 6 = 24$  ekor

Walaupun demikian sebagai cadangan untuk mengganti kemungkinan ada yang mati, maka dalam penelitian ini setiap kelompok dipelihara 8 ekor sehingga jumlah total tikus sebanyak 32 ekor.

#### 4.4. Variabel Penelitian

##### 4.4.1. Variabel Independen

Variabel independen dalam penelitian ini adalah ekstrak rosella.

##### 4.4.2. Variabel Dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini yaitu aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 dan kerusakan sel hepar.

#### 4.5. Definisi Operasional

##### 4.5.1 Ekstrak Rosela

**Definisi** : Kelopak bunga rosela yang dipakai dalam penelitian ini diperoleh dari Perkebunan di Bukittinggi. Pembuatan ekstrak kelopak bunga rosella menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Ekstrak kelopak bunga rosela diberikan peroral sekali dalam sehari menggunakan sonde lambung selama 6 hari.

**Alat ukur** : Timbangan

**Hasil Ukur** : Dosis 250 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb

**Skala** : Nominal

##### 4.5.2. Sitokrom P450 CYP24A1

**Definisi** : Enzim yang berperan dalam pengaturan keseimbangan kalsium, yang diperiksa melalui serum darah tikus setelah pemberian  $\text{CCl}_4$  dan setelah pemberian ekstrak rosella.

Alat Ukur : Elisa

Hasil ukur : Aktivitas sitokrom P450 CYP24A1 dalam satuan nmol

Skala : Rasio

#### 4.5.3 Kerusakan Hepar

**Definisi** : Kerusakan yang terjadi pada sel hepar akibat  $\text{CCl}_4$ , yang berupa degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis.

**Degenerasi Hidrofik** : Adanya vakuola-vakuola yang berisi air di dalam sitoplasma, organel sel membesar dan terjadinya kerusakan pada membran sel.

**Degenerasi lemak** :Terganggunya pembentukan lipoprotein sehingga trigliserida tertimbun dalam hepatosit. Dalam sitoplasma terdapat vakuola besar yang berisi lemak.

**Nekrosis** : Sel mengalami lisis, sehingga batas antar sel menjadi kabur. Nucleus mengalami perubahan morfologi menjadi piknotis, karioreksis dan kariolisis.

**Cara Ukur** : Pewarnaan hemotoksilin eosin (HE) yang dilihat dengan mikroskop bimokuler Olympus CX21.

**Hasil Ukur** : Persentase sel yang mengalami kerusakan

**Skala ukur** : Rasio

## **4.6 Alat dan Bahan Penelitian**

### **4.6.1 Laboratorium Farmasi Universitas Andalas Padang**

1. Kandang tikus
2. Tempat makan dan minum tikus
3. Pakan (pellet) dan air
4. Timbangan Srtorius Werke GMBH
5. Karbon tetraklorida
6. Ekstrak rosela
7. Tikus strain wistar sebanyak 32 ekor.

### **4.6.2 Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Andalas**

1. Formalin 10% buffer
2. Reagen untuk prosesing jaringan (alkohol bertingkat dan xylol)
3. Parafin / histoplas
4. Mikrotom
5. Preparat pewarnaan (Hematoksilin Eosin)
6. Objek glass
7. Deck glass
8. Entelan
9. Mikroskop binoluker

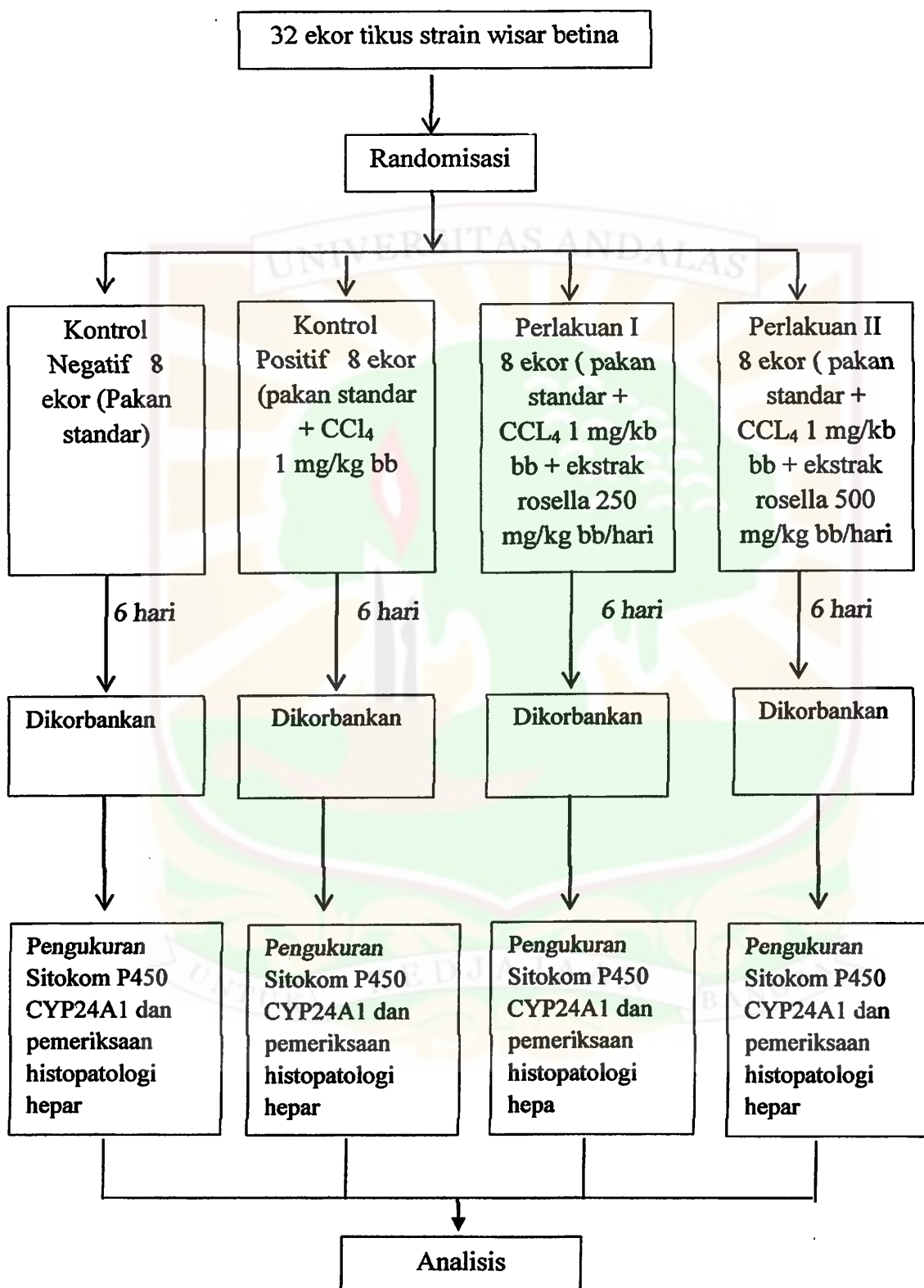
#### 4.6.3 Laboratorium Biomedik Universitas Andalas

1. Essay plate
2. Standar
3. Biotin-antiboby
4. HRV-adivin
5. Biotin-antiboby Dilluent
6. Sampel dilluent
7. Wash buffer
8. TBM substrate
9. Stop sulotion\
10. Adhesive strip





#### 4.7. Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

## 4.8 Prosedur Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi tiga proses, yaitu persiapan alat dan bahan, perlakuan hewan coba dan pemeriksaan aktivitas sitokrom P450 dan kerusakan sel hepar.

### 4.8.1 Persiapan Alat dan Bahan

Tikus yang berasal dari unit pengembangan hewan penelitian (UHPH) Surabaya dilakukan penyesuaian lingkungan atau adaptasi selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan. Tikus tersebut dipelihara dalam kandang plastik dengan anyaman kawat sebagai penutup. Kandang ditempatkan dalam ruangan yang memiliki ventilasi dan mendapat cahaya matahari langsung. Kandang, tempat makan dan minum dibersihkan setiap hari. Temperatur dipertahankan pada suhu kamar, kelembapan antara 40-60%. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan berupa pellet c-05 produksi PT. Charoen Medan dan Aquades. Jumlah produksi pakan perhari rata-rata 5 gr/100gr bb. Kebutuhan air 8-11 ml/100 grbb (Kusumawati, 2004).

Sebelum perlakuan, terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat badan tikus. Tikus yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam kandang, masing-masing kandang berisi 8 ekor tikus.

## 2. Pembuatan Ekstrak Rosella

Kelopak bunga rosella di peroleh dari perkebunan di Bukitinggi. Kelopak bunga rosella dibersihkan, dirajang, kemudian dimasukkan kedalam botol maserasi dan ditambahlkan etanol 96% sampai terendam sempurna dalam wadah yang tertutup baik dan terlindung dari cahaya sambil sekali-kali diaduk. Proses maserasi dilakukan selama lima hari dan tiga kali pengulangan. Maserat diuapkan secara *invacuo* sehingga diperoleh ekstrak kental.

### 4.8.2 Perlakuan pada Hewan Coba

Sebelum dilakukan intervensi, tikus dipilih secara acak dan dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu :

- a. Kelompok 1 sebagai kontrol (tanpa paparan CCL<sub>4</sub>)
- b. Kelompok 2 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kg bb dosis tunggal.
- c. Kelompok 3 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kg bb dosis tunggal, 24 jam kemudian di beri ekstrak rosela 250 mg/kg bb selama 6 hari.
- d. Kelompok 4 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kg bb dosis tunggal, 24 jam kemudian di beri ekstrak rosela 500 mg/kg bb selama 6 hari.

### 4.8.3 Pemeriksaan Sitokrom P450 CYP24A1 dan Kerusakan Sel Hepar

Pada hari ke 8 dilakukan pengambilan sampel darah dan hepar tikus untuk pemeriksaan aktifitas sitokrom P450 dan Histopatologi hepar. Dengan langkah sebagai berikut :

1. Sebelum pengambilan darah, dilakukan anestesi dengan menggunakan eter secara inhalasi
2. Pembedahan dilakukan pada bagian dada untuk mencapai jantung dan darah diambil melalui ventrikel jantung dengan menggunakan spuit 5 cc sebanyak minimal 2 cc.
3. Darah kemudian ditampung dalam tabung evendorf tanpa antikoagulan.
4. Darah disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan serum dari komponen darah lainnya.
5. Serum yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan aktifitas sitokrom P450 CYP24A1.
6. Sampel hepar diambil dengan melakukan pembedahan di daerah perut.

#### **1) Pemeriksaan sitokrom P450**

Pemeriksaan dilakukan di laboratorium Biomedik Universitas Andalas Padang. Pemeriksaan sitokrom P450 dilakukan dengan menggunakan metode elisa dengan prosedur standar sebagai berikut :

1. Persiapkan semua reagen, sampel dan prosedur standar.
2. Tambahkan 100  $\mu$ l standar atau sampel kedalam tabung, inkubasi selama 2 jam pada suhu 37° c.
3. Pindahkan larutan ke dalam tabung yang lain, jangan di cuci.
4. Tambahkan 100  $\mu$ l Biotin-antibody (1x) pada tabung yang lain. inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°c.
5. Aspirasi dan cuci sebanyak 3 kali.

6. Tambahkan 100 µl HRP-avidin (1x) pada tabung yang lain, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C.
7. Aspirasi dan cuci sebanyak kali.
8. Tambahkan 90 µl TBM Substrat pada tabung lain, inkubasi 15-30 menit pada suhu 37°C. Lindungi dari cahaya.
9. Tambahkan 50 µl stop solution pada tabung lain. Baca pada 450 nm selama 5 menit.

## **2 ) Pemeriksaan Kerusakan Sel Hepar**

Pemeriksaan kerusakan sel hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Andalas Padang. Alat yang digunakan adalah mikroskop binokuler Olympus CX 21 U-B130-2. Pemeriksaan dilakukan oleh tenaga teknis yang ada di laboratorium dengan prosedur kerja standar sebagai berikut :

1. Jaringan hepar dimasukkan ke dalam botol berisi NBF 10% dengan volume 1; 5 kemudian diberi label.
2. Jaringan dipotong dan dimasukkan ke dalam kaset jaringan dan diberi label.
3. Kaset jaringan dimasukkan ke dalam wadah berisi formalin 10% buffer fosfat (bila fiksasi belum sempurna) atau alkohol 70%
4. Dilakukan prosesi jaringan dengan tahap-tahap sebagai berikut :
  - a. Penyempurnaan fiksasi : formalin 10% selama 0-3 jam
  - b. Dehidrasi :
    - Alkohol 70% selama ½ jam



- Alkohol 95% selama ½ jam
- Alkohol 100% selama ½ jam
- Alkohol 100% selama 1 jam
- Alkohol 100% selama 1 jam
- Alkohol 100% selama 1 jam
- Alkohol 100% xylol selama ½ jam

c. Clearing

- Xylol selama 1 jam
- Xylo selama 2 jam

d. Impregnansi

- Parafin selama 2,5 jam
- Parafin selama 4 jam

2. Jaringan ditanam (*embedding*) dalam cetakan, kemudian disiram dengan parafin cair dan disimpan pada suhu 20-25°C.
3. Blok parafin yang sudah dibuat, didinginkan dalam lemari es.
4. Dilakukan pemotongan dengan mikrotom dengan ketebalan 5µ.
5. Potongan tipis blok parafin dimasukkan dalam floating bath, kemudian ditempelkan pada objek glass.
6. Slide diwarnai dengan hemotoksilin eosin (HE).
7. Slide diberi antelan, ditutup dengan deckglass dan dilihat dibawah mikroskop (Endarjo, 2008).

Penghitungan kerusakan sel hepar dipimpin oleh seorang ahli Patologi Anatomi. Cara penghitungan adalah sebagai berikut :

1. Slide dilihat di bawah mikroskop elektron dengan pembesaran 400 kali.
2. Penghitungan dilakukan dalam tiga lapangan pandang yang terdiri dari 300 sel hepar.
3. Penghitungan dilakukan terhadap sel yang mengalami degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis dengan ciri-ciri yaitu :

- a. Degenerasi Hidrofik

Terdapat vakuola-vakuola yang berisi air di dalam sitoplasma, dengan mikroskop cahaya terlihat rongga yang jernih dalam sitoplasma. Dengan mikroskop elektron tampak organela-organela sel membengkak dan membran sel mengalami kerusakan.

- b. Degenerasi Lemak

Trigliserida tidak dapat keluar dan tertimbun dalam hepatosit. Dibawah mikroskop tampak vakuola besar yang berisi lemak.

- c. Nekrosis

Membran sel mengalami lisis, batas antar sel menjadi kabur. Nucleus mengalami perubahan morfologi menjadi piknotis, karioreksis, dan kariolisis.

4. Hitung persentase sel yang mengalami kerusakan.

#### **4.9 Teknik Analisis Data**

Dari hasil penelitian dilakukan tabulasi data dan dianalisa dengan menggunakan uji ANOVA dengan derajat kepercayaan 95 %. Jika didapatkan hasil yang bermakna dilanjutkan dengan uji statistik *Multiple Comparisons (Post Hoc Test)* jenis Bonferroni (Singgih, 2005).

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan terhadap 24 tikus strain wistar, umur 2-3 bulan dengan berat 200-250 gr. Tikus dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan I dan perlakuan II. Perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas, Pemeriksaan aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Andalas, sedangkan pemeriksaan kerusakan sel hepar dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Andalas. Adapun hasil penelitian dapat dilihat pada tabel berikut :

#### 5.1 Aktivitas Sitokrom P450 CYP24A1

Table 5.1 Rerata Kadar Sitokrom P450 CYP 24A1 Tikus Pada Masing-masing Kelompok Penelitian

No	Kelompok	Aktivitas Sitokrom P450 CYP24A1 (nmol/ml)	
		Mean	P
1	KN	6,61 ± 5,47	0,0005
2	KP	28,83 ± 8,42	
3	P1	5,49 ± 4,87	
4	P2	1,50 ± 0,84	

Keterangan :

- KN : Kelompok kontrol negatif yang diberi diet standar
- KP : Kelompok kontrol positif diberi diet standar dan CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg bb
- P1 : Kelompok perlakuan 1, diberi CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg bb dan diberi ekstrak rosella 250 mg/kg bb
- P2 : Kelompok perlakuan 2, diberi CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg bb dan diberi ekstrak rosella 500 mg/kg bb

Berdasarkan Tabel 5.1 didapatkan rerata kadar sitokrom P450 CYP24A1 pada kelompok kontrol negatif adalah  $6,61 \pm 5,47$ , pada kelompok kontrol positif terjadi peningkatan 4,36 kali, yaitu  $28,83 \pm 8,42$ , pada kelompok perlakuan I terjadi penurunan yaitu  $5,49 \pm 4,87$ , sedangkan pada kelompok perlakuan II terjadi penurunan yang lebih signifikan yaitu  $1,50 \pm 0,84$ . Pada uji ANOVA, didapatkan  $p = 0,0005$  ( $p < 0,05$ ), yang berarti pada alpha 5% dapat disimpulkan ada perbedaan yang sangat signifikan rerata aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Dengan demikian dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Bonfferoni*, untuk melihat lebih jelas perbedaan yang signifikan dari rerata kadar kadar sitokrom P450 CYP24A1 pada tiap kelompok.

Tabel 5.2 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji *Post Hoc Bonferoni* Terhadap Rerata Kadar Sitokrom P450 CYP24A1 Tikus pada Masing-masing kelompok penelitian.

No	Kelompok	KN	KP	P1	P2
1	KN	-	0,000*	1,000	0,771
2	KP	0,000*	-	0,000*	0,000*
3	P1	1,000	0,000*	-	1,000
4	P2	0,771	0,000*	1,000	-

(\* terdapat perbedaan bermakna)

Pada tabel 5.2 menunjukkan hasil uji *Post Hoc Bonfferoni* bahwa rerata aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, antar kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan I dan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan II menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ( $p < 0,05$ ). Sedangkan antara

kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Kerusakan Sel Hepar

Tabel 5.3 Rerata Sel Hepar Tikus Yang Mengalami Degenerasi Hidrofik, Degenerasi Lemak dan Nekrosis Pada Masing-masing Kelompok Penelitian

No	Kelompok	Kerusakan Sel Hepar (%)			p
		Deg. Hidrofik	Deg. Lemak	Nekrosis	
		Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	
1	KN	0,00 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 0,00	0,0005
2	KP	35,83 $\pm$ 2,75	11,77 $\pm$ 4,06	3,34 $\pm$ 0,52	
3	P1	13,00 $\pm$ 2,50	7,78 $\pm$ 2,85	1,89 $\pm$ 0,72	
4	P2	2,44 $\pm$ 1,07	4,28 $\pm$ 1,00	1,06 $\pm$ 0,50	

Berdasarkan tabel 5.3 diatas, dapat dilihat pada kelompok kontrol negatif rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik adalah  $0,00 \pm 0,00$  degenerasi lemak  $0,17 \pm 0,18$  dan nekrosis  $0,00 \pm 0,00$ . Pada kelompok kontrol positif dapat dilihat peningkatan rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik yaitu  $35,83 \pm 2,75$ , degenerasi lemak  $11,77 \pm 4,06$  dan nekrosis  $3,34 \pm 0,52$ . Pada kelompok perlakuan I terjadi penurunan rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik yaitu  $13,00 \pm 2,50$ , degenerasi lemak  $7,78 \pm 2,85$  dan nekrosis  $1,89 \pm 0,72$ . Sedangkan pada kelompok perlakuan II terlihat penurunan yang lebih besar rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik yaitu  $2,44 \pm 1,07$ , degenerasi lemak  $4,28 \pm 1,00$ , dan nekrosis  $1,06 \pm 0,50$ . Pada uji ANOVA didapatkan  $p = 0,0005$ , yang berarti pada alpha 5% dapat disimpulkan ada perbedaan yang sangat signifikan rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Dengan demikian dapat dilanjutkan dengan



uji *Post Hoc Bonferroni*, untuk melihat lebih jelas perbedaan yang signifikan dari rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis.

Tabel 5.4 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji *Post Hoc Bonferroni* Terhadap Kerata Sel Hepar Tikus Yang Mengalami Degenerasi Hidrofik Pada Masing-masing Kelompok Perlakuan.

No	Kelompok	KN	KP	P1	P2
1	KN	-	0,000*	0,000*	0,245
2	KP	0,000*	-	0,000*	0,000*
3	P1	0,000*	0,000*	-	0,000*
4	P2	0,245	0,000*	0,000*	-

(\* terdapat perbedaan bermakna)

Pada tabel 5.4 menunjukkan hasil uji *Post Hoc Bonferroni* bahwa rerata sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, antar kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan I dan II serta antara kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Tabel 5.5 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji *Post Hoc Bonferroni* Terhadap Kerata Sel Hepar Tikus Yang Mengalami Degenerasi Lemak Pada Masing-masing Kelompok Perlakuan

No	Kelompok	KN	KP	P1	P2
1	KN	-	0,000*	0,000*	0,64
2	KP	0,000*	-	0,076	0,000*
3	P1	0,000*	0,076	-	0,159
4	P2	0,065	0,000*	0,159	-

(\* terdapat perbedaan bermakna)

Pada tabel 5.5 menunjukkan hasil uji *Post Hoc Bonferroni* bahwa rerata sel hepar yang mengalami degenerasi lemak antara kelompok kontrol negatif dengan

kelompok kontrol positif, antar kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan II menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ), sedangkan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

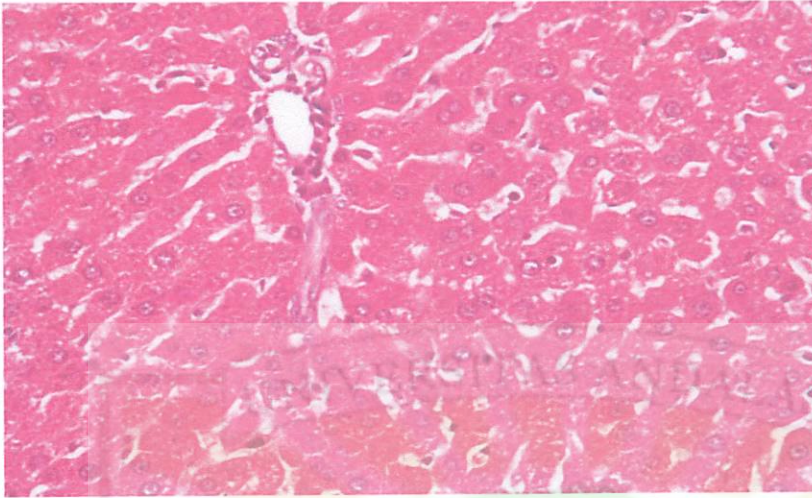
Tabel 5. 6 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji *Post Hoc Bonferoni* Terhadap Rerata Sel Hepar Tikus Yang Mengalami Nekrosis Pada Masing-masing Kelompok Perlakuan.

No	Kelompok	KN	KP	P1	P2
1	KN	-	0,000	0,000	0,011
2	KP	0,000	-	0,000	0,000
3	P1	0,000	0,000	-	0,059
4	P2	0,011	0,000	0,059	-

(\* terdapat perbedaan bermakna)

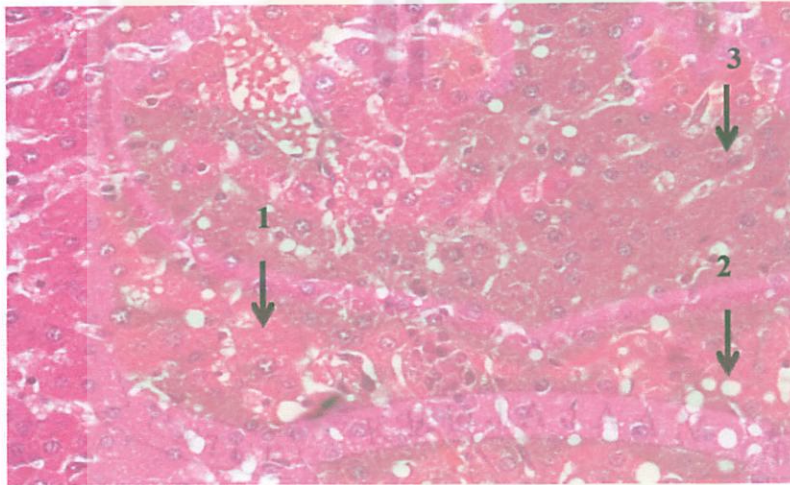
Berdasarkan tabel 5.6 dapat dilihat hasil uji *Post Hoc Bofferoni* terhadap rerata sel hepar yang mengalami nekrosis antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, antar kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan dan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II, menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ). sedangkan antara kelompok perlakuan I dengan perlakuan II menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan pemeriksaan mikroskopik didapatkan gambaran kerusakan sel hepar pada masing-masing kelompok sebagai berikut :



Gambar 5.1 Gambar sel hepar tikus kelompok kontrol negatif. Pembesaran 400x

Pada gambar 5.1 terlihat batas-batas sel hepar jelas dan teratur, tersusun secara radier dengan gambaran sitoplasma tanpa vakoulasi, kromatin inti sel hepar tampak jelas, sinusoid dan vena sentralis tampak jelas tanpa kelainan..

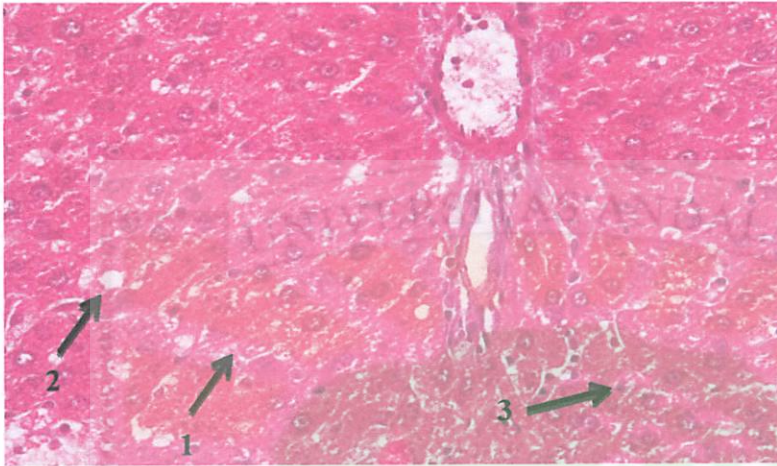


Gambar 5.2 Gambar sel hepar tikus kelompok kontrol positif (mendapat CCL<sub>4</sub>). Degenerasi hidrofik (1) , degenerasi lemak (2), dan nekrosis (3). Pembesaran 400 x.

Pada gambar 5.2 terlihat sebagian sel hepar yang menyusun lobus rusak. Sel yang rusak mempunyai sitoplasma yang bervakuola dan sebagian tampak

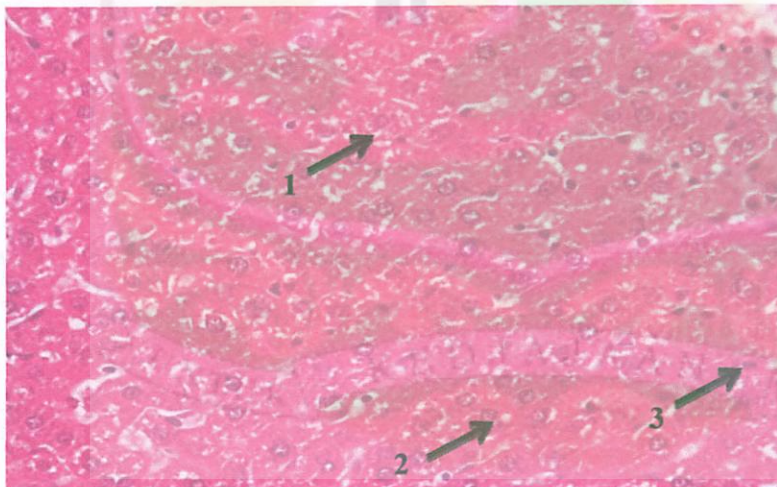


pecah. Inti terlihat piknotis. Sebagian sel hepar mengalami degenerasi hidrofik dan perlemakan hepar



Gambar 5.3 . Gambar sel hepar tikus kelompok perlakuan I. Degenerasi hidrofik (1) degenerasi lemak (2) dan nekrosis (3). Pembesaran 400 x.

Pada gambar 5.3 terlihat kerusakan sel hepar lebih sedikit, sel yang mengalami degenerasi hidrofik, perlemakan dan nekrosis lebih sedikit.



Gambar 5.4. Gambar sel hepar tikus kelompok perlakuan II (Degenerasi hidrofik (1), degenerasi lemak (2) dan nekrosis (3) Pembesaran 400 x.

Pada gambar 5.4 terlihat batas sel lebih jelas dan lebih teratur. Sinusoid dan vena sentralis lebih jelas, sel yang mengalami degenerasi hidrofik, perlemakan dan nekrosis jauh lebih sedikit.





## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### **6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella terhadap Aktifitas Sitokrom P450 CYP24A1 Pada Tikus Yang Terpapar CCl<sub>4</sub>**

Hasil penelitian yang terlihat pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa rerata kadar sitokrom P450 CYP24A1 lebih tinggi 4,36 kali lipat pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub> (kontrol positif) dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar CCl<sub>4</sub> (kontrol negatif). Pada kelompok yang diberi ekstrak rosella 250 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb (P1 dan P2) menunjukkan kadar sitokrom P450 CYP24A1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ekstrak rosella (kontrol positif). Hasil uji Anova didapatkan  $p = 0,0005$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang sangat signifikan rerata kadar sitokrom P450 CYP24A1 antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan I dan perlakuan II.

Tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub> (kontrol positif) aktivitas sitokrom P450 mengalami peningkatan dibandingkan dengan kontrol negatif, hal ini disebabkan karena CCl<sub>4</sub> merupakan sumber radikal bebas. CCl<sub>4</sub> dimetabolisme di retikulum endoplasma sel hepar oleh sitokrom P450 CYP3A1 sehingga menghasilkan zat yang reaktif yaitu CCl<sub>3</sub><sup>\*</sup>. CCl<sub>3</sub><sup>\*</sup> bereaksi dengan oksigen membentuk CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>\*</sup> yang bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul. Akibatnya terjadi inisiasi lipid peroksidase, peningkatan CYP24A1 sehingga terjadi kerusakan pengaturan kalsium intraseluler, akibatnya terjadi kerusakan protein, DNA, dan aktivasi

phospholipase dan meningkatnya *cytotoxid aldehyd* yang mengakibatkan kerusakan sel hepar (Haliwell *and* Guiteridge, 2004).

Pada penelitian ini ditemukan bahwa kadar sitokrom P450 CYP24A1 meningkat pada kelompok yang terpapar CCl<sub>4</sub> dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar CCl<sub>4</sub>. Hal ini menunjukkan bahwa CCl<sub>4</sub> mempunyai sifat yang sama dengan xenobiotik lain seperti fenobarbital dan alkohol (Okita *and* Masters, 1992), Aflatoxin B<sub>1</sub> (Lestariana, 1997), yaitu meningkatkan kadar Sitokrom P450. System enzim sitokrom P450 terlibat dalam perubahan kimiawi senyawa tidak aktif menjadi molekul reaktif tinggi yang dapat mengakibatkan kerusakan sel, kematian sel atau mengalami mutasi (Murray, 1990 ; Okita *and* Masters, 1992).

Tabel 5.2 menunjukkan bahwa pada kelompok yang diberi ekstrak rosella 250 mg/kg dan 500 mg/kg bb (perlakuan I dan II) ditemukan bahwa kadar sitokrom P450 CYP24A1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak rosella (kontrol positif). Namun antara kelompok yang mendapatkan ekstrak 250 mg/kg bb (perlakuan I) dengan 500 mg/kg bb (perlakuan II) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian rosella dengan dengan dosis 250 mg/kg bb telah mampu memberikan perlindungan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas akibat CCl<sub>4</sub> dalam hubungannya dengan aktifitas Sitokrom P450 CYP24A1.

Pemberian ekstrak rosella pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub> akan berpengaruh terhadap penurunan aktivitas sitokrom P450, hal ini disebabkan karena rosella

merupakan sumber antioksidan, jadi dapat meredam efek radikal bebas akibat paparan  $\text{CCl}_4$ .

Sebagai antioksidan rosella memiliki kandungan utama yaitu vitamin C, disamping itu rosella juga mengandung flavonoid terutama antosianin dan karoten, yang merupakan antioksidan non enzimatik. Antioksidan non enzimatik, bekerja dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya, radikal tidak akan bereaksi dengan komponen seluler.

Vitamin C atau asam askorbat mendonorkan dua elektron yang berasal dari ikatan rangkap antara karbon kedua dan ketiganya. Senyawa reaktif yang diberi elektron oleh vitamin C kemudian berubah menjadi senyawa yang stabil. Vitamin C kemudian berubah menjadi bentuk radikal semidehidroaskorbat atau radikal askorbil yang tidak reaktif. Senyawa ini dapat larut di dalam air sehingga mudah mengeluarkannya dari dalam tubuh. Berdasarkan mekanisme donor elektron yang dilakukan oleh vitamin C inilah maka vitamin C berfungsi sebagai antioksidan yang tergolong *scavenger* (Landvik *et al.*, 2002 dan Padayatty *et al.*, 2002 di dalam Cadenas dan Packer, 2002). Sebagai donor elektron, vitamin C dapat berikatan dengan metabolit triklorometil. Dengan demikian, radikal triklorometil tidak akan merusak sel dan menyebabkan peroksidasi lipid tidak berjalan, reaksi rantai tidak terjadi sehingga peningkatan peningkatan CYP24A1 juga tidak terjadi.

Kerusakan oksidatif juga dapat dihambat oleh senyawa penangkap radikal dan penyumbang elektron lain seperti senyawa fenolik. Senyawa fenolik mampu

menghambat radikal bebas dengan mekanisme sumbangan hydrogen dan stabilisasi resonansi (Fssende *and* Fessensen, 1986). Senyawa fenolik yang terdapat pada rosella adalah flavonoid terutama antosianin. Senyawa flavonoid merupakan kelompok antioksidan alami yang mempunyai fungsi untuk melindungi dari kerusakan sel.

Pada rosella juga terkandung karoten. Menurut Hidajat (2005), karoten adalah antioksidan yang larut dalam lemak selain itu karoten mempunyai aktivitas vitamin A paling tinggi yang dapat melindungi membran sel terhadap stress oksidatif selain itu karoten juga berfungsi mencegah terjadinya reaksi berantai dari radikal bebas.

Pemberian ekstrak rosella pada penelitian ini mampu menurunkan aktifitas sitokrom P450 sebagai katalisator reaksi oksidasi dalam melepaskan radikal bebas. Reaksi oksidasi yang terjadi akan dihambat oleh antioksidan yang terkandung dalam rosella sehingga hemoliotik  $CCl_4$  tidak akan terpecah dan radikal beaspun tidak dihasilkan. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Masubuchi dan Horie (2007) bahwa enzim sitokrom P450 yang tidak teraktivasi dapat menurunkan derajat kerusakan jaringan akibat penurunan jumlah radikal bebas yang dihasilkan pada suatu jaringan.

Penelitian tentang sitokrom P450 juga pernah dilakukan namun dengan antioksidan yang berbeda. Salah satunya adalah penelitian yang dilakukan Lestariana (1997) yang menemukan bahwa pemberian ransum cukup vitamin A, dapat menurunkan kadar sitokrom P450 total pada tikus yang terpapar Afla toksim  $B_1$  secara bermakna. Penelitaian yang senada pernah dilakukan oleh Ariati (2012) mengungkapkan bahwa pemberian ekstrak rosella dapat menurunkan kadar



SGPT darah tikus yang diberi  $\text{CCl}_4$  secara bermakna. SGPT adalah enzim yang dihasilkan di hepatosit. Pemeriksaan SGPT merupakan pemeriksaan sederhana dan rutin yang dilakukan untuk pemeriksaan fungsi hepar. Enzim SGPT terikat dalam sitoplasma sel hepar. Apabila sel mengalami nekrosis maka akan terjadi kenaikan kadar enzim ini.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak rosella sebagai antioksidan, mampu melindungi sel hepar dari kerusakan akibat serangan radikal bebas khususnya  $\text{CCl}_4$ . Mekanisme kerja antioksidan rosella mampu menekan aktivitas sitokrom P540 CYP24A1 sehingga keseimbangan kalsium intraseluler tetap terjaga. Dengan kata lain penekanan aktifitas Sitokrom P450 CYP24A1 menyebabkan mekanisme pengaturan kalsium berjalan dengan baik, sehingga tidak terjadi penumpukan kalsium intraseluler yang pada akhirnya kerusakan sel hepar juga tidak terjadi.

## **6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Terhadap Kerusakan Sel Hepar Tikus Yang Terpapar $\text{CCl}_4$**

Hasil penelitian yang terlihat pada tabel 5.3 menunjukkan bahwa rerata degenerasi hidrofik, degenerasi lemak dan nekrosis sel hepar lebih tinggi pada tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$  (kontrol positif) dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar  $\text{CCl}_4$  (kontrol negatif). Pada kelompok yang diberi ekstrak rosella 250 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb (P1 dan P2) menunjukkan degenerasi hidrofik, degenerasi lemak, dan nekrosis sel hepar lebih rendah dibanding kelompok yang tidak diberi ekstrak rosella (kontrol positif). Hasil uji Anova didapatkan  $p = 0,0005$  ( $P < 0,05$ ) yang berarti dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang sangat



signifikan rerata degenerasi hidrofik, degenerasi lemak, dan nekrosis sel hepar antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 dan perlakuan II.

Radikal bebas dapat menimbulkan berbagai kelainan pada hepar. Salah satu radikal bebas yang bersifat sangat toksik adalah  $\text{CCl}_4$ .  $\text{CCl}_4$  dosis tunggal pada hewan coba dapat memberikan efek terjadinya perlemakan hepar dan nekrosis. Efek  $\text{CCl}_4$  tergantung pada aktifitas metabolik  $\text{CCl}_4$  yang berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hepar melalui interaksi dengan transport elektron NADPH Sitokrom P450.  $\text{CCl}_4$  akan dimetabolisme menghasilkan  $\text{CCL}_3^*$  dan  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  yang bersifat lebih toksik dan sangat reaktif.  $\text{CCL}_3^*$  dapat berikatan kovalen dengan protein, lemak, dan DNA yang pada akhirnya dapat memicu kerusakan hepatosit.  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak yang menimbulkan disfungsi membran organel sel serta membentuk senyawa reaktif aldehid yang juga menyebabkan kerusakan hepatosit.  $\text{CCl}_4$  juga dapat mengaktifasi sel kupffer. Sel kupffer yang teraktifasi dapat melepaskan berbagai mediator proinflamasi yang dapat memperberat kerusakan hepatosis. Sel kupffer juga melepaskan ROS yang juga memperberat kerusakan hepatosit (EHC 2008,1999;Weber *et al.*,2003).

$\text{CCl}_4$  dapat menimbulkan kerusakan pada hepar, berupa degenerasi maupun nekrosis (Weber *et al.*, 2003). Derajat kerusakan sel hepar tergantung dari perubahan degenerasi yang terjadi pada organ tersebut. Tipe awal pada degenerasi sel hepar berupa degenerasi hidrofik, kemudian berlanjut menjadi degenerasi lemak, sebelum akhirnya sel tersebut mengalami kematian atau nekrosis.

Hasil penelitian Soni *et al.*, (2008) melaporkan bahwa tikus percobaan yang diberikan  $\text{CCl}_4$  dengan dosis 0,05 ml/kg bobot badan mampu merusak sel-sel hepar hingga mengalami degenerasi dan nekrosis.

Pada tabel 5.4 menunjukkan bahwa dari uji *Post Hoc Bonferoni* terdapat perbedaan yang bermakna dari rerata sel yang mengalami degenerasi hidrofik antara kelompok yang mendapatkan rosella 250 mg/kg bb dan 500 mg/kg bb dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak rosella. Antara kelompok yang mendapatkan rosella 250 mg/kg bb dengan 500 mg/kg bb juga menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Berdasarkan hasil di atas dapat diketahui bahwa ekstrak rosella mampu menurunkan jumlah sel hepar yang mengalami degenerasi hidrofik akibat pemberian  $\text{CCl}_4$ , hasil penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa efek rosella dalam menurunkan jumlah sel yang mengalami degenerasi hidrofik sudah dapat dilihat pada dosis 250 mg/kg bb.

Hasil uji *Post Hoc Bonferoni* terhadap rerata sel hepar yang mengalami degenerasi lemak pada tabel 5.6 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok yang mendapatkan rosella 250 mg/kg bb dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak rosella dan kelompok yang mendapatkan ekstrak rosella 250 mg/kg bb dengan kelompok yang mendapatkan ekstrak rosella 500 mg/kg bb. Namun pada kelompok yang mendapatkan 500 mg/kg bb dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak rosella, menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Hal ini berarti bahwa

rosella mampu menghambat terjadinya degenerasi lemak pada dosis 500 mg/kg bb.

$\text{CCl}_4$  dapat menyebabkan terjadinya steatosis pada hepar. Steatosis merupakan gambaran patologi yang ditandai dengan akumulasi lemak di dalam sel hepar yang disebabkan adanya gangguan pada metabolisme lipid di hepar. Ada beberapa faktor penyebab terjadinya steatosis, yang secara garis besar dibedakan atas faktor primer yakni obesitas, hyperlipidemia, dan resistensi albumin, serta faktor sekunder yang meliputi diet yang tidak seimbang, malabsorpsi, dan obat-obatan antara lain aspirin, tetrasiklin, dan alkohol, serta kehamilan (Chitturi *and* Farrell, 2001 ; Day *et al.*, 2004).

Tabel 5.6 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara rerata sel sel hepar yang mengalami nekrosis antara kelompok yang mendapat ekstrak rosella 250 mg/kg bb dan kelompok yang mendapatkan ekstrak rosella 500 mg/kg bb dengan kelompok yang tidak mendapatkan ekstrak rosella. Namun antara kelompok yang mendapat ekstrak rosella 250 mg/kg bb dengan kelompok yang mendapatkan ekstrak rosella 500 mg/kg bb tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna. Dengan demikian dapat dilihat bahwa pada dosis 250 mg/kg bb, ekstrak rosella telah mampu menurunkan jumlah sel hepar yang mengalami nekrosis akibat terpapar  $\text{CCl}_4$ .

Pada keracunan akut, terjadi kerusakan sel dan penurunan ATP, akibatnya sistem pompa natrium tidak dapat berfungsi untuk mengeluarkan ion-ion Na dari dalam sel keluar. Akibatnya konsentrasi ion Na dan tekanan osmosis dalam sel

meningkat yang mengakibatkan pemasukan air ke dalam sel. Bila pemasukan air secara terus menerus akan terbentuk vakuola-vakuola yang berisi air dalam sitoplasma yang disebut degenerasi hidrofik (Cotrain *et al.*.,1999).

Akibat penurunan ATP pada jejas hepatosit, maka proses pembentukan lipoprotein terganggu. Hal ini mengakibatkan trigliserida tertimbun dan tidak dapat dikeluarkan dari hepatosit yang akan menimbulkan degenerasi lemak. Dibawah mikroskop cahaya akan terlihat vakuola besar yang berisi lemak (Cotrain *et al.*.,1999).

Apabila kerusakan membran semakin meningkat, maka akan terjadi nekrosis. Membran sel mengalami lisis, sehingga batas antar sel menjadi kabur. Neukelus mengalami perubahan morfologi menjadi piknotis, karioreksis dan koriolisis. Dibawah mikroskop elektron akan terlihat kerusakan membran sel makin meningkat, mitokondria dan organela yang lainnya pecah sehingga akan menimbulkan kematian sel (Cotrain *et al.*, 1999).

Beberapa senyawa yang terkandung dalam tanaman obat telah dibuktikan melalui penelitian ilmiah dapat menjaga fungsi hepar, baik sebagai hepatoprotektor ataupun sebagai obat bila kerusakan tersebut terjadi. Contoh senyawa tersebut adalah karoten, vitamin A, vitamin C dan vitamin E (Sies *et al.*, 1995), senyawa Flavonoid (Middleton *et al.*,2000). Beberapa senyawa tersebut terdapat di dalam ekstrak rosella.

Vitamin C dalam ekstrak rosella, menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler. Vitamin C mampu menghilangkan



senyawa oksigen reaktif di dalam sel. Diluar sel vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif, mencegah terjadinya LDL teroksidasi, mentransfer elektron ke dalam tokoferol teroksidasi dan mengasorbsi logam dalam saluran pencernaan (Levine *et al.*, 1995).

Flavonoid dapat menghambat lipooksigenase. Flavonoid juga dapat bertindak sebagai penampung yang baik bagi radikal hidroksil dan superoksida sehingga asam lemak tak jenuh terlindungi, dan dengan demikian melindungi lipid membran hepar terhadap reaksi yang merusak (Robinson, 1995).

Menurut Kumar (2005), flavonoid dapat mencegah jejas akibat radikal bebas dalam beberapa cara. Salah satunya dengan membersihkan radikal secara langsung. Flavonoid akan teroksidasi oleh radikal sehingga menjadikan radikal lebih stabil dan kurang reaktif. Dengan kata lain flavonoid menstabilkan ROS dan bereaksi dengan senyawa radikal yang reaktif. Flavonoid tertentu dapat secara langsung membersihkan superoksida, sedangkan flavonoid lain dapat membersihkan oksigen radikal yang sangat reaktif yang disebut peroksinitrit.

Beta karoten adalah senyawa larut lipid dan merupakan antioksidan yang bekerja pada membran lipid sel. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa senyawa karotenoid dapat mencegah kanker, arterosklerosis, proses penuaan dan penyakit lain (Donald Ald Voet *and* Yudith Voet, 2004). Beta karotein berperan sebagai donor elektron. Senyawa beta karoten sering digunakan untuk mencegah keadaan stress oksidatif. Aktivitas antioksidan karotenoid terdapat pada kemampuannya untuk memberi elektron dari struktur



ikatan rangkapnya. Elektron yang dilepaskan akan berikatan dengan elektron yang belum berpasangan dari radikal bebas (Halliwell *and* Gueteridge, 2004).

Beberapa penelitian sebelumnya telah membuktikan antioksidan sebagai hepatoprotektif, yaitu pada penelitian tentang teripang pasir (*holothuria scabra*) yang didalamnya juga mengandung vitamin C, Flavonoid dan karoten. Pada penelitian tersebut dapat diketahui bahwa teripang pasir mampu mencegah kerusakan hepatosit yang di induksi oleh karbon tetraklorida.

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis pada kelompok kontrol negatif, terlihat batas-batas sel hati jelas dan teratur, tersusun secara radier dengan gambaran sitoplasma tanpa vakoulasi, kromatin inti sel hati tampak jelas, sinusoid dan vena sentralis tampak jelas tanpa kelainan. Pada kelompok kontrol positif yang mendapat CCl<sub>4</sub>, terlihat sebagian sel hati yang menyusun lobus rusak. Sel yang rusak mempunyai sitoplasma yang bervakuola dan sebagian tampak pecah. Sebagian sel hati mengalami degenerasi hidrofik dan perlemakan hati. Pada sel hati terlihat beberapa sel mengalami nekrosis.

Karbon tetraklorida membentuk radikal bebas yang menimbulkan stress oksidatif sehingga terjadi peroksidasi lipid yang diikuti kerusakan membran hepatosit. Kerusakan atau peningkatan permeabilitas membran sel mengakibatkan edema sel, destruksi mitokondria, retikulum endoplasmik, inaktivasi enzim, dan denaturasi protein (Kumar *and* Fausto, 2005). Studi histopatologi menunjukkan bahwa CCl<sub>4</sub> meningkatkan degenerasi perlemakan, pembengkakan hepatosit, tertekannya sinusoid, serta vakuolasi sitoplasma, nekrosis dan infiltrasi sel-sel

radang. Perubahan histologi spesifik akibat  $\text{CCl}_4$  berupa nekrosis sentrolobuler, perlemakan, apoptosis sel dan vakuolasi (Arhoghro *et al.*, 2009).

Pada kelompok perlakuan I yang mendapatkan  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 250 mg/kg bb terlihat kerusakan sel hepar lebih sedikit, sel yang mengalami degenerasi hidrofik, perlemakan dan nekrosis lebih sedikit. Sedangkan pada kelompok perlakuan II yang mendapat  $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 500 mg/kg bb tampak batas sel lebih jelas dan lebih teratur. Sinusoid dan vena sentralis lebih jelas, sel yang mengalami degenerasi hidrofik, perlemakan dan nekrosis jauh lebih sedikit.

Dampak radikal bebas yang ditimbulkan oleh  $\text{CCl}_4$  dapat dikurangi dengan pemberian antioksidan. Kandungan Vitamin C, Flavonoid, Polifenol, dan Beta Karoten pada rosella merupakan antioksidan yang dapat melindungi sel hepar dan mengurangi dampak buruk radikal bebas terhadap kerusakan sel hepar.

Vitamin C merupakan senyawa hidrofik yang merupakan antioksidan paling penting dalam cairan ekstraseluler. Vitamin C dapat mencegah terbentuknya superoksida, hydrogen peroksida, hipoklorit, radikal hidrosil, radikal peroksil dan radikal oksigen. Vitamin C lebih efektif dalam menghambat peroksidasi lemak oleh radikal peroksil bila dibandingkan dengan komponen lain. Vitamin C dapat mencegah peroksidasi membran dengan meningkatkan aktifitas tokoferol dan mencegah kerusakan sel akibat radikal oksigen (Sies *et al.*, 1995).

Flavonoid memiliki daya antioksidan yang mampu melindungi molekul protein dari radikal bebas  $\text{CCl}_4$ . Flavonoid mencegah terjadinya ikatan metabolit

$\text{CCl}_4$ -Protein dengan membentuk radikal flavonoid dan akan bereaksi dengan metabolit  $\text{CCL}_4$  membentuk kompleks non toksik yang kemudian disekresikan keluar tubuh (Torel, *et al.*, 1986).

Betakaroten yang terkandung dalam rosella juga dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas karena peran antioksidannya. Radikal bebas merupakan senyawa yang dapat merusak sel, bahkan dapat memicu timbulnya kelainan minimal pada tingkat sel yang selanjutnya berubah menjadi pre-kanker. Betakaroten memberikan perlindungan pada tingkat seluler dimana DNA (*deoxyribonukleic acid*) yang merupakan suatu inti genetik pembawa sifat keturunan diproteksi terhadap berbagai gangguan sehingga dapat terlindung dari 'bahan asing' yang mengacaukan kode genetiknya. Betakaroten juga memiliki kemampuan untuk memproteksi sel normal dari sel mutan (yang telah mengalami perubahan) pemicu pertumbuhan kanker.

Proses perbaikan sel hepar juga tidak terlepas dari mekanisme penyembuhan dalam tubuh setiap individu. Perbaikan sel hepar dapat berlangsung dengan sendirinya karena zat toksin  $\text{CCL}_4$  telah dinetralisir oleh berbagai zat antioksidan yang terkandung dalam ekstrak rosella. Organ hepar yang sebagian selnya mengalami degenerasi dapat mengalami perbaikan, sedangkan sel yang mengalami nekrosis lambat laun akan digantikan dengan sel-sel hepar yang baru akibat proses regenerasi sel hepar.

Mekanisme regenerasi sel hepar yang mengalami patologi akibat  $\text{CCl}_4$  juga dikontribusi oleh adanya proses endogenous sum-sum tulang dalam

merangsang pembentukan hepatosit dan memperbaiki jaringan hepar yang mengalami kerusakan (Yannaki *et al.*,2005). Pemberian ekstrak rosella diduga berhubungan dengan proses aktivasi proses endogenous sumsum tulang.



## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Kesimpulan**

1. Pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 mg/kg bb dapat menurunkan aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 secara signifikan pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>.
2. Pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 mg/kg bb dapat menurunkan degenerasi hidrofik secara signifikan pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>,
3. Pemberian ekstrak rosella dengan dosis 500 mg/kg bb dapat menurunkan degenerasi lemak secara signifikan pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>,
4. Pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 mg/kg bb dapat menurunkan jumlah sel yang mengalami nekrosis secara signifikan pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>,

#### **7.2 Saran**

1. Disarankan penelitian lanjutan mengenai rosella dengan memperheparkan dosis, lama waktu pemberian, dan pemeriksaan fungsi hepar dengan enzim lain, berkaitan dengan potensinya sebagai hepatoprotektif.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang toksisitas ekstrak rosella dan kerusakan organ yang ditimbulkannya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Akaya, H.O; Oyeleke, S.B, Jigam, A.A and Lawal, F.F, 1997, *Analysis of sorrel drink (Soborodo)*. Nig. J. Biochem.Mol.Biol.
- Ali, S. 1997. *Peran Radikal bebas pada patogenesis kerusakan hepar*. Kumpulan makalah, seminar dana lokakarya radikal bebas patogenesis penyakit, fakultas kedokteran universitas Brawijaya. Malang.
- Amin, A., Hamza, A.A. 2005. *Hepatoprotective effect of hisbisscus, Ramarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats*. Life Sci.
- Arhoghro EM, Ekpo KE, Anosike EO, Ibeh GO, 2009. *Effect of equeous extrac1995 t of bitter leaf. (Vermonia amisdalina Del) on carbob tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) induced liver damage in albini wistar rats*. Eur J.
- Ariati, Reci. 2012. *Pengaruh Fraksi Air Kelopak Bunga Rosela (Hibiscus Sabdariffa Linn) terhadap kadar kolesterol darah tikus putih jantan hiperkolesterolemia dan hiperkolesterolemia-disfungsih hati*. Universitas Andalas Padang.
- Arellano, H.A., Romero, F. S., Soto C.m.A., Tortoriello, J. 2004. *Effectiveness and torelability od a Standardized extract from hibiscus sabdariffa in patient with mild to moderate hypertension, a controlled and randomized clinical trial*. Phytomedicine.
- Aspan, Rustam et.all. 2010. *Rosela (Hibiscus sabdariffa Linn), Serial data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat*. Jakarta. Direktorat obat asli Indonesia. Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI.
- Craddock, W.E, Mallett, A.K, and Rowland, I.R. 1989. *Activation of dietary mutagens by mice*. Chem. Biol. Interaction
- Chitturi S, Farrell GC. 2001.*Etiopathogegesis of nonalcoholicsteatohepatis* (abstact). Seminar Liver Diseasea 21 (1).mpany, A.Division of Harcourt Brace & Company, pp.
- Cochrane. G. C., 1991, *Celluler Injury By Oxidants*. Th. Ed. W.B. Saunders CAM. J. Med.,
- Cotran, R.S, V. Kumar, S.L, Robins, F.J. Schoen,1992. *Phatology Basic of Desease*, 5
- Dahiru, D Obi, O.J., Umaru,H. 3003. *Efeect Hibiscus Sabdariffa Calyx extract on Carbon Tetrachloroda induced liver damage*. Biokemistri.
- Day L, Shikuma C, Gercschensom M. 2004. *Mithochondrial injury in the pathogenesisof antiretroviral-induced hepatic steatosis and lactic acidema*.

- Depkes RI-DitJen POM. 2006. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Ri. Jakarta.
- Devi, M. 2009. *Dahsyatnya Kasiat Rosella*. Yogyakarta. Cemerlang Publishing.
- Donald Ald Voet and Yudith Voet. 2004. *Bio-Chemistry 3<sup>rd</sup>*, Willey John Wiley & Sons. Inc Pennsylvania.
- EHC 208, 1999. *Carbon tetrachloride .Envoromental health criteria*. International program on chemical safety.
- Fessenden Ralp J and Fessenen Joan S, 1986. *Kimia Organik*. Jakarta. Erlangga
- Feter, J, Csomos G and A. Vereckel, 1992. *Role of fret radical reaction in liver disease. Free radical and the liver*, G. Csomos and J. Faher (eds). Springer Verlag. Berlin.
- Gene DL, et al. 1999. *Acute Carbon Tetrachloride Feeding Induces Damage Of Large*, J. Med.G.
- Guyton, AC, Hall JE ,1997. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9*. Jakarta: EGC
- Halliwell, B and Gutteridge, JMC. 2004. *Free Radical in Biology and Medicine*, oxford.
- Hamid, Iwan Syahrial. 2009. *Ekspresi CYP1A1 dan GST hepatosit terinduksi 7,12-dimetilbenz (a) antrasena dan pengaruh pemberian ekstrak etanolik Gynura Procumbens*.Majalah Farmasi Indonesia.
- Hartini. 2011. *Pengaruh Dekok Daum jambu Biji Merah (Psidium Guajava L), terhadap jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa tikus putih jantan (Rattus Novergicus)*. Laporan penelitian. Universitas Andalas.Padang
- Herty, M dan Kristiana, L. 2005. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta. Cetakan I agromedia Pustaka.
- Kanazawa, Y. Mitsukazu Kitada, Toshiyuki Mori, Yoshikazi , Susumu Imaoka, yoshihiko Funae, and Tetsuya Kamataki, 1991. *Ascorbic acid deficiency decreases specific forms of cytochrome P450 in liver icrosomes of guenia pigs*. The American for pharmacology ang experimental therapeutic. Molekular pharmacology.
- Kumar V dan Fausto N. 2005. *Cellular adaptations, cell injury, and cell death*. Dalam : Kumar V Abbas AK, Fausto N. *Patologic basic of disease*. Philadelphia. Elsevier.
- Kusumawati, D. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Yogyakarta. Gajah MadaUniversity Press

- Lazze, M.C., Pizzala, R., Savio, M., Stivala, L.A., Prosperi, E., Bianchi, L. 2003.. *Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells* Mutation Research 535: 103-115.
- Lestarianan, Wiryatun. 1997. *Pengaruh kandungan Vitamin A dalam Ransum terhadap Efek Toksik Aflatoksin B<sub>1</sub> Pada Tikus ( Rattus Novergicus)*. Jogjakarta. Universitas Gajah Mada
- Lin, W.L., Hsieh, Y.J., Chou, F.P., Wang, C.J., Cheng, M.T., Tseng, T.H. 2003. *Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage*. Arch. Toxicol 77: 42-47.
- Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., Tseng, T.H. 2002. *In vivo Protective Effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity*. Food chem. Toxicol.
- Mardiah, Hasibuan, S., Rahayu, A., Ashadi, W.W. 2009. *Budidaya dan PeNgelolaan Rosella*. Ed. Ke-1 . Jakarta. Agromedia
- Maryani, H., Kristina, L. 2008 *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta. Pt Argomedia Pustaka.
- Masubuchi Y, Horie T. 2007. *Toxicological Significance of Mrchanism-Based inactivation of Cytochrome P450 Enzymes by Drug*. Critical Review in toxicology.
- Middleton E, Kaswandi C, Theoharides T.C. 2000. *The effect of plants flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease, and cancer*. The americans society for pharmacology and experimental therapeutics, pharmacol rev 52
- Murray, R.K. , Granner. D.K., Rodwell V.W. 2009, *Biokimia Herper*. Edisi 27. Jakarta. EGC
- Okita, RT and Masters, B.S.S., 1992. *Bitransformation : The Cytocromes P450 in Devlin, T.M. Textbook of Biochemistry with clinical Correlations*. Third Ed. Weley – Liss. A. John and sons, Inc Publication.
- Panjaitan, RGP, et all. 2007. *Pengaruh Pemberian Karbon Tetralorida Terhadap Fungsi hati dan Ginjal Tikus*. Makara Keshetan. Vol 2.
- Pham-Huy, L.A.P., He, H., Pham-Huy C. 2008. *Free Radicals, Antioxidants in Desease and Health*, Int J Biomed Sci.
- Price, Sylvia anderson and Wilson Lorraine McCarty. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta. EGC.
- Robin SL, Kumar V. 1995. *Buku Ajar Patologi*. Jakarta . EGC



- Sies H. Stahl W. 1995. *Vitamin E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoid as antioxidant*<sup>1-3</sup>. American Jurnal Clinical Nutrition 62 (suppl).
- Singarimbun, M dan Efendi, S. 2006. *Metode penelitian Survei*. Jakarta. LP3ES
- Singgih, S. 2005. *Menggunakan SPSS Untuk Statistik Parametrik*. PT Elex Media Komputindo. Jakarta
- Sri Kumalaningsih. 2006. *Anti Oksidan Alami*. Surabaya. Trubus agrisarana.
- Sudoyo, AW et all. 2007. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jakarta*, Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI
- Suryohusodo, P. 2000a. *Kapita Selekta Ilmu Molekuler*. Perputakaaan Nasional RI. Jakarta. CV Agung Seto. ISF College of Farmasi.
- Suryohusodo, P. 2000b. *Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas*. Dalam :Ilmu Kedokteran Molkuler Kapita Selekta. Jakarta. CV Agung Seto.
- Shivali, N. Mahadevan and Kamboj, Pradeep. 2008. *Hibiscus Sabdariffa Linn. – An Overview*. Departement of farmacognosy
- Valko M, et all. 2006. *free radical metal and antioxidant in oxidative stress induced cancer*, J. Chem-Bio, Rusia, Eddisi 160.
- Wang, C.J ; chew, W.Y and Rahuraruma, J.A, 1990. *Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-bult hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats*. Food Cham. Toxicol 38;411-6
- Widyarni, Mela Kurnia, 2010. *Pengaruh pemberian seduhan kelopak bunga rosella (hibiscus sabdariffa linn) terhadap gambaran histilogis hepar tikus wistar*. Universitas Diponegoro.
- Weber , L.W, Boll M, Stampfl., 2003. *Hepatotoxicity and mecanism of action of haloalkanes: carbon tetracloride as a toxicological model*. Crit Rev Toxico.
- Yanwirasti, 1997. *Perlindungan Sel Hepat Tikus Percobaab Oleh Vitamin A Terhadap Serangan Radikal Bebas yang ditimbulkan oleh keracunan Karbon Tetraklorida*.
- Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou, Barsis I, Koloyannidis, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassa A. 2005. *G-CSF promed hematopoetic stem cell or G-CSF per se Accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs*. Experimental Hematologi.

MASTER TABEL

No	Kode Sampel	CYP 24a1	Degenerasi Hidrofik	Degenerasi Lemak	Nekrosis	Deskripsi Mikroskopik
1	K-1	12.099	0,00	0,33	0,00	- batas antar sel tampak jelas dan teratur
2	K-2	5.747	0,00	0,33	0,00	- sel tersusun secara radier.
3	K-3	1.098	0,00	0,33	0,00	- sitoplasma tampak tidak ada vakuolasi
4	K-4	14.362	0,00	0,00	0,00	- kromatin intisel hati tampak jelas
5	K-5	4.652	0,00	0,00	0,00	- sinusoid dan vena sentralis tampak jelas dan tidak ada kelainan
6	K-6	1.671	0,00	0,00	0,00	
7	K+1	28.015	37,67	9,33	2,67	- sebagian sel hati yang menyusun lobus tampak rusak.
8	K+2	25.459	32,67	14,00	3,67	- sel yang rusak tampak bervakuola
9	K+3	32.760	35,00	6,33	3,67	- sebagian sel tampak mengalami bengkak dan keruh
10	K+4	43.346	36,33	12,67	3,00	- tampak butiran lemak di dalam sitoplasma
11	K+5	24.437	40,00	18,00	4,00	- sebagian inti sel tampak mengkerut dan berwarna gelap
12	K+6	18.962	33,33	10,33	3,00	
13	P1 1	1.246	15,00	13,00	2,33	- sebagian sel hati yang menyusun lobus tampak rusak.
14	P1 2	9.689	17,33	6,00	2,33	- sel yang rusak tampak bervakuola
15	P1 3	1.505	11,67	8,33	1,00	- sebagian sel tampak mengalami bengkak dan keruh
16	P1 4	4.789	14,00	6,33	2,00	- tampak butiran lemak di dalam sitoplasma
17	P1 5	13.121	10,33	8,00	2,67	- sebagian inti sel tampak mengkerut dan berwarna gelap
18	P1 6	2.608	12,67	5,00	1,00	
19	P2 1	2.681	3,33	5,33	1,67	- sebagian sel hati yang menyusun lobus tampak rusak.
20	P2 2	1.790	2,33	4,67	1,00	- sel yang rusak tampak bervakuola
21	P2 3	0.125	4,00	5,33	1,33	- sebagian sel tampak mengalami bengkak dan keruh
22	P2 4	1.162	2,00	4,00	1,33	- tampak butiran lemak di dalam sitoplasma
23	P2 5	1.737	1,00	3,33	0,33	- sebagian inti sel tampak mengkerut dan berwarna gelap
24	P2 6	1.386	2,00	3,00	0,67	



Lampiran 2

ONEWAY

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
CYP	1.00	6	6.6048	5.46949	2.23291	.8650	12.3447	1.10	14.36
	2.00	6	28.8298	8.42452	3.43930	19.9888	37.6708	18.96	43.35
	3.00	6	5.4930	4.86935	1.98790	.3829	10.6031	1.25	13.12
	4.00	6	1.4802	.84268	.34402	.5958	2.3645	.13	2.68
	Total	24	10.6020	12.10783	2.47150	5.4893	15.7146	.13	43.35
HIDRO	1.00	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	2.00	6	35.8333	2.75496	1.12471	32.9422	38.7245	32.67	40.00
	3.00	6	13.5000	2.50022	1.02071	10.8762	16.1238	10.33	17.33
	4.00	6	2.4433	1.06757	.43583	1.3230	3.5637	1.00	4.00
	Total	24	12.9442	14.57686	2.97549	6.7889	19.0994	.00	40.00
LEMAK	1.00	6	.1650	.18075	.07379	-.0247	.3547	.00	.33
	2.00	6	11.7767	4.05503	1.65546	7.5212	16.0322	6.33	18.00
	3.00	6	7.7767	2.84951	1.16331	4.7863	10.7670	5.00	13.00
	4.00	6	4.2767	.99763	.40728	3.2297	5.3236	3.00	5.33
	Total	24	5.9988	4.97479	1.01547	3.8981	8.0994	.00	18.00
NEKRO	1.00	6	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
	2.00	6	3.3350	.51640	.21082	2.7931	3.8769	2.67	4.00
	3.00	6	1.8883	.71998	.29393	1.1328	2.6439	1.00	2.67
	4.00	6	1.0550	.49119	.20053	.5395	1.5705	.33	1.67
	Total	24	1.5696	1.33207	.27191	1.0071	2.1321	.00	4.00

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CYP	Between Groups	2745.248	3	915.082	29.211	.000
	Within Groups	626.543	20	31.327		
	Total	3371.789	23			
HIDRO	Between Groups	4812.251	3	1604.084	428.309	.000
	Within Groups	74.903	20	3.745		
	Total	4887.154	23			
LEMAK	Between Groups	441.261	3	147.087	22.991	.000
	Within Groups	127.955	20	6.398		
	Total	569.216	23			
NEKRO	Between Groups	35.680	3	11.893	46.354	.000
	Within Groups	5.132	20	.257		
	Total	40.812	23			

# Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) KLPK	(J) KLPK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
CYP	1.00	2.00	-22.22500(*)	3.23147	.000	-31.6839	-12.7661
		3.00	1.11183	3.23147	1.000	-8.3471	10.5707
		4.00	5.12467	3.23147	.771	-4.3342	14.5836
	2.00	1.00	22.22500(*)	3.23147	.000	12.7661	31.6839
		3.00	23.33683(*)	3.23147	.000	13.8779	32.7957
		4.00	27.34967(*)	3.23147	.000	17.8908	36.8086
	3.00	1.00	-1.11183	3.23147	1.000	-10.5707	8.3471
		2.00	-23.33683(*)	3.23147	.000	-32.7957	-13.8779
		4.00	4.01283	3.23147	1.000	-5.4461	13.4717
	4.00	1.00	-5.12467	3.23147	.771	-14.5836	4.3342
		2.00	-27.34967(*)	3.23147	.000	-36.8086	-17.8908
		3.00	-4.01283	3.23147	1.000	-13.4717	5.4461
HIDRO	1.00	2.00	-35.83333(*)	1.11731	.000	-39.1038	-32.5628
		3.00	-13.50000(*)	1.11731	.000	-16.7705	-10.2295
		4.00	-2.44333	1.11731	.245	-5.7138	.8272
	2.00	1.00	35.83333(*)	1.11731	.000	32.5628	39.1038
		3.00	22.33333(*)	1.11731	.000	19.0628	25.6038
		4.00	33.39000(*)	1.11731	.000	30.1195	36.6605
	3.00	1.00	13.50000(*)	1.11731	.000	10.2295	16.7705
		2.00	-22.33333(*)	1.11731	.000	-25.6038	-19.0628
		4.00	11.05667(*)	1.11731	.000	7.7862	14.3272
	4.00	1.00	2.44333	1.11731	.245	-.8272	5.7138
		2.00	-33.39000(*)	1.11731	.000	-36.6605	-30.1195
		3.00	-11.05667(*)	1.11731	.000	-14.3272	-7.7862
LEMAK	1.00	2.00	-11.61167(*)	1.46033	.000	-15.8862	-7.3371
		3.00	-7.61167(*)	1.46033	.000	-11.8862	-3.3371
		4.00	-4.11167	1.46033	.064	-8.3862	.1629
	2.00	1.00	11.61167(*)	1.46033	.000	7.3371	15.8862
		3.00	4.00000	1.46033	.076	-.2746	8.2746
		4.00	7.50000(*)	1.46033	.000	3.2254	11.7746
	3.00	1.00	7.61167(*)	1.46033	.000	3.3371	11.8862
		2.00	-4.00000	1.46033	.076	-8.2746	.2746
		4.00	3.50000	1.46033	.159	-.7746	7.7746
	4.00	1.00	4.11167	1.46033	.064	-.1629	8.3862
		2.00	-7.50000(*)	1.46033	.000	-11.7746	-3.2254
		3.00	-3.50000	1.46033	.159	-7.7746	.7746
NEKRO	1.00	2.00	-3.33500(*)	.29245	.000	-4.1910	-2.4790
		3.00	-1.88833(*)	.29245	.000	-2.7444	-1.0323
		4.00	-1.05500(*)	.29245	.011	-1.9110	-.1990
	2.00	1.00	3.33500(*)	.29245	.000	2.4790	4.1910
		3.00	1.44667(*)	.29245	.000	.5906	2.3027
		4.00	2.28000(*)	.29245	.000	1.4240	3.1360
	3.00	1.00	1.88833(*)	.29245	.000	1.0323	2.7444
		2.00	-1.44667(*)	.29245	.000	-2.3027	-.5906

	4.00	.83333	.29245	.059	-.0227	1.6894
4.00	1.00	1.05500(*)	.29245	.011	.1990	1.9110
	2.00	-2.28000(*)	.29245	.000	-3.1360	-1.4240
	3.00	-.83333	.29245	.059	-1.6894	.0227

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## KLPK

### Case Processing Summary

	KLPK	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
CYP	1.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	2.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	3.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	4.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
HIDRO	1.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	2.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	3.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	4.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
LEMAK	1.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	2.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	3.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	4.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
NEKRO	1.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	2.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	3.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%
	4.00	6	100.0%	0	.0%	6	100.0%



**Descriptives(a,b)**

KLPK		Statistic	Std. Error			
CYP	1.00	Mean	6.6048	2.23291		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		.8650	
			Upper Bound		12.3447	
	5% Trimmed Mean	6.4798				
	Median	5.1995				
	Variance	29.915				
	Std. Deviation	5.46949				
	Minimum	1.10				
	Maximum	14.36				
	Range	13.26				
	Interquartile Range	11.14				
	Skewness	.619	.845			
	Kurtosis	-1.510	1.741			
	2.00	2.00	Mean		28.8298	3.43930
			95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	
Upper Bound				37.6708		
5% Trimmed Mean		28.5716				
Median		26.7370				
Variance		70.973				
Std. Deviation		8.42452				
Minimum		18.96				
Maximum		43.35				
Range		24.38				
Interquartile Range		12.34				
Skewness		1.021	.845			
Kurtosis		1.341	1.741			
3.00		3.00	Mean	5.4930	1.98790	
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
	Upper Bound			10.6031		
	5% Trimmed Mean	5.3052				
	Median	3.6985				
	Variance	23.711				
	Std. Deviation	4.86935				
	Minimum	1.25				
	Maximum	13.12				
	Range	11.88				
	Interquartile Range	9.11				
	Skewness	.918	.845			
	Kurtosis	-.842	1.741			
	4.00	4.00	Mean	1.4802		.34402
			95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		
Upper Bound				2.3645		



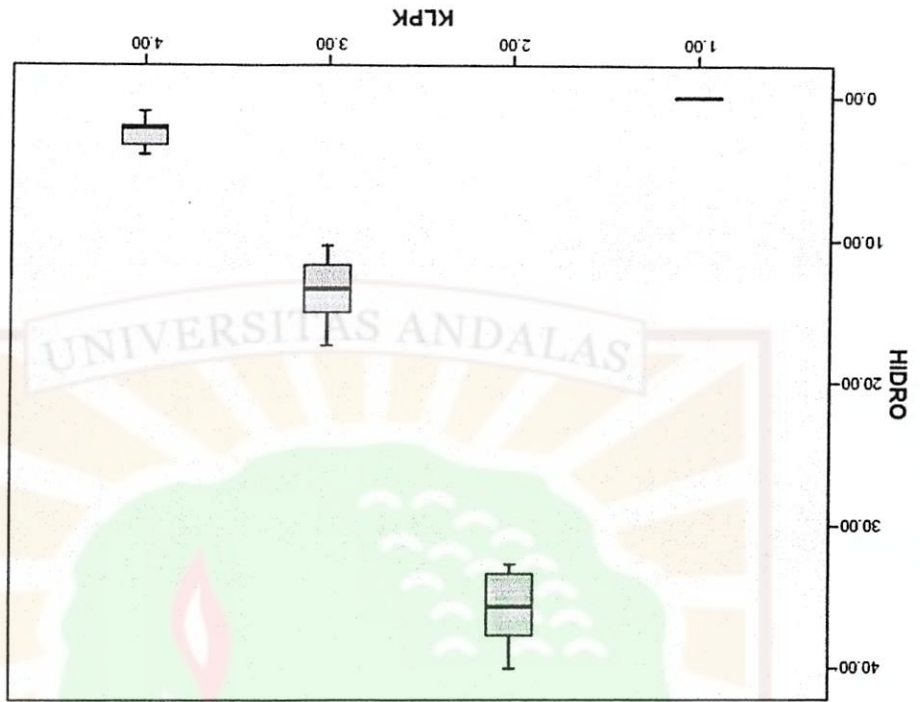
		5% Trimmed Mean		1.4887	
		Median		1.5615	
		Variance		.710	
		Std. Deviation		.84268	
		Minimum		.13	
		Maximum		2.68	
		Range		2.56	
		Interquartile Range		1.11	
		Skewness		-.373	.845
		Kurtosis		1.352	1.741
HIDRO	2.00	Mean		35.8333	1.12471
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32.9422	
			Upper Bound	38.7245	
		5% Trimmed Mean		35.7776	
		Median		35.6650	
		Variance		7.590	
		Std. Deviation		2.75496	
		Minimum		32.67	
		Maximum		40.00	
		Range		7.33	
		Interquartile Range		5.09	
		Skewness		.441	.845
		Kurtosis		-.748	1.741
	3.00	Mean		13.5000	1.02071
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	10.8762	
			Upper Bound	16.1238	
		5% Trimmed Mean		13.4633	
		Median		13.3350	
		Variance		6.251	
		Std. Deviation		2.50022	
		Minimum		10.33	
		Maximum		17.33	
		Range		7.00	
		Interquartile Range		4.25	
		Skewness		.406	.845
		Kurtosis		-.285	1.741
	4.00	Mean		2.4433	.43583
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.3230	
			Upper Bound	3.5637	
		5% Trimmed Mean		2.4370	
		Median		2.1650	
		Variance		1.140	
		Std. Deviation		1.06757	
		Minimum		1.00	
		Maximum		4.00	
		Range		3.00	
		Interquartile Range		1.75	
		Skewness		.317	.845
		Kurtosis		-.372	1.741
LEMAK	1.00	Mean		.1650	.07379



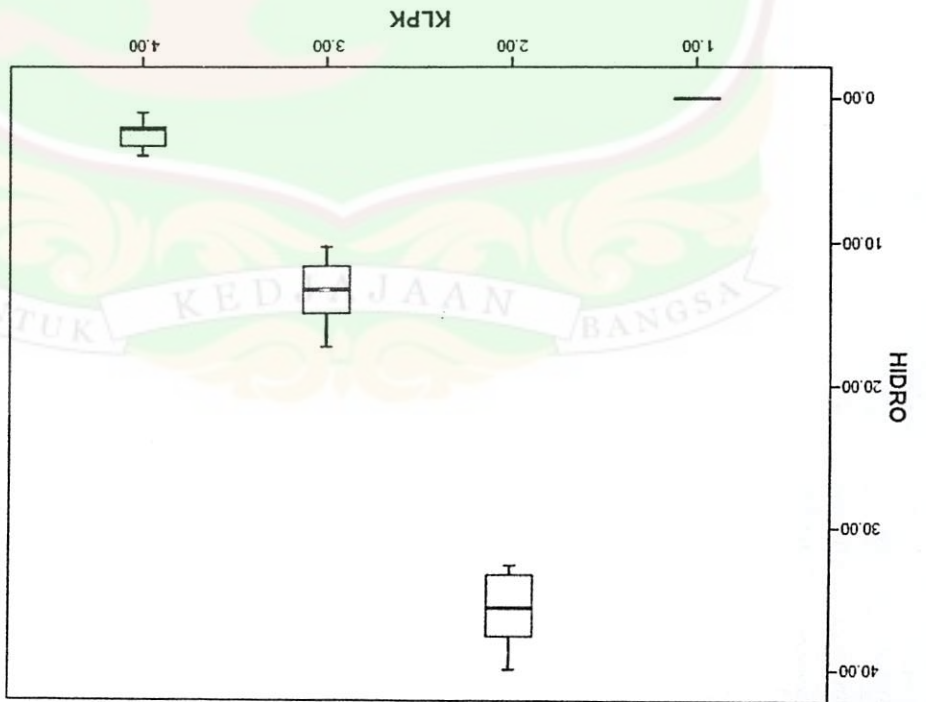
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-0.0247	
		Upper Bound	.3547	
	5% Trimmed Mean		.1650	
	Median		.1650	
	Variance		.033	
	Std. Deviation		.18075	
	Minimum		.00	
	Maximum		.33	
	Range		.33	
	Interquartile Range		.33	
	Skewness		.000	.845
	Kurtosis		-3.333	1.741
2.00	Mean		11.7767	1.65546
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.5212	
		Upper Bound	16.0322	
	5% Trimmed Mean		11.7335	
	Median		11.5000	
	Variance		16.443	
	Std. Deviation		4.05503	
	Minimum		6.33	
	Maximum		18.00	
	Range		11.67	
	Interquartile Range		6.42	
	Skewness		.331	.845
	Kurtosis		.081	1.741
3.00	Mean		7.7767	1.16331
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.7863	
		Upper Bound	10.7670	
	5% Trimmed Mean		7.6407	
	Median		7.1650	
	Variance		8.120	
	Std. Deviation		2.84951	
	Minimum		5.00	
	Maximum		13.00	
	Range		8.00	
	Interquartile Range		3.75	
	Skewness		1.461	.845
	Kurtosis		2.438	1.741
4.00	Mean		4.2767	.40728
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.2297	
		Upper Bound	5.3236	
	5% Trimmed Mean		4.2891	
	Median		4.3350	
	Variance		.995	
	Std. Deviation		.99763	

		Minimum		3.00	
		Maximum		5.33	
		Range		2.33	
		Interquartile Range		2.08	
		Skewness		-.167	.845
		Kurtosis		-2.044	1.741
NEKRO	2.00	Mean		3.3350	.21082
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.7931	
			Upper Bound	3.8769	
		5% Trimmed Mean		3.3350	
		Median		3.3350	
		Variance		.267	
		Std. Deviation		.51640	
		Minimum		2.67	
		Maximum		4.00	
		Range		1.33	
		Interquartile Range		.84	
		Skewness		.000	.845
		Kurtosis		-1.904	1.741
	3.00	Mean		1.8883	.29393
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.1328	
			Upper Bound	2.6439	
		5% Trimmed Mean		1.8943	
		Median		2.1650	
		Variance		.518	
		Std. Deviation		.71998	
		Minimum		1.00	
		Maximum		2.67	
		Range		1.67	
		Interquartile Range		1.42	
		Skewness		-.603	.845
		Kurtosis		-1.834	1.741
	4.00	Mean		1.0550	.20053
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.5395	
			Upper Bound	1.5705	
		5% Trimmed Mean		1.0611	
		Median		1.1650	
		Variance		.241	
		Std. Deviation		.49119	
		Minimum		.33	
		Maximum		1.67	
		Range		1.34	
		Interquartile Range		.83	
		Skewness		-.415	.845
		Kurtosis		-.806	1.741

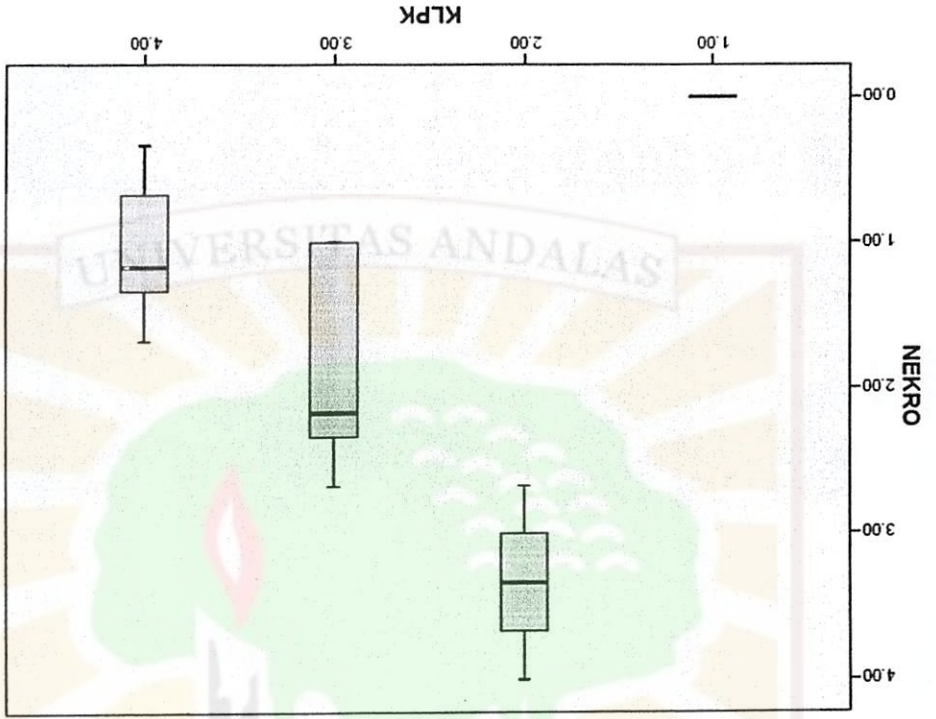
a HIDRO is constant when KLPK = 1.00. It has been omitted.  
b NEKRO is constant when KLPK = 1.00. It has been omitted.



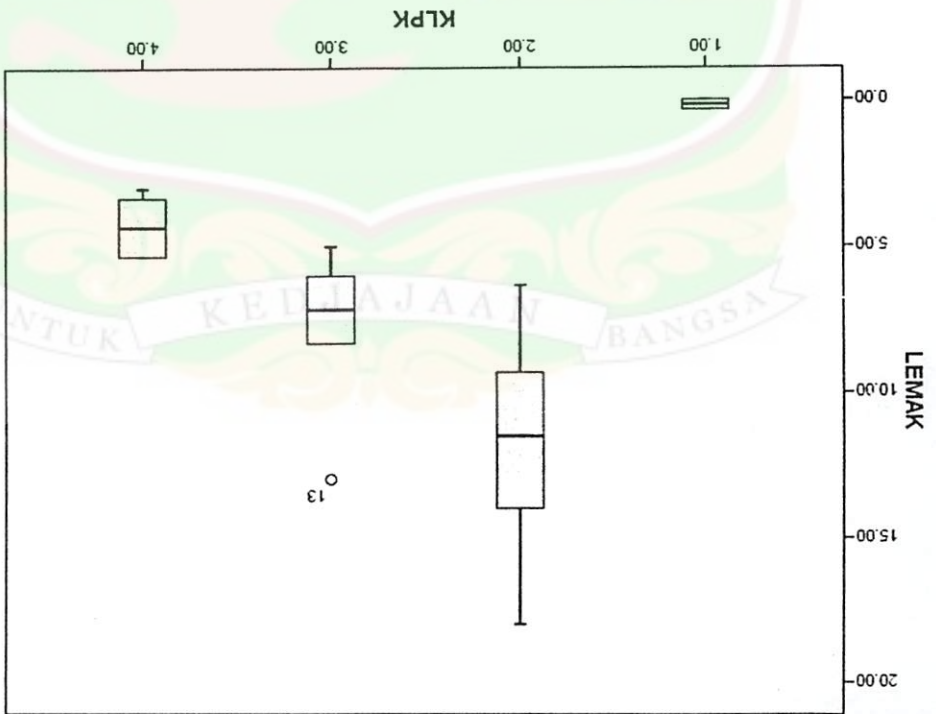
**DEGENERASI HIDROFIK**







**NEKROSIS**



**DEGENERASI LEMAK**



KOMITE ETIKA PENELITIAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS ANDALAS  
Jl.Perintis Kemerdekaan Padang 25127  
Telepon: 0751 31746 Fax : 0751 32838 No. Reg : 036/KNEP/2008  
e-mail: [fk2unand@pdg.vision.net.id](mailto:fk2unand@pdg.vision.net.id)

No: 171/KEP/FK/2013

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK**  
***ETHICAL CLEARANCE***

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azazi dan kesejahteraan subjek penelitian kedokteran/kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol penelitian dengan judul:

*The Committee of the Research Ethics of the Faculty of Medicine, Andalas University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical/health research, has carefully reviewed the research protocol entitled:*

**Pengaruh pemberian ekstrak rosela terhadap aktifitas sitokrom P450 CYP24A1 dan histopatologi hepar tikus yang terpapar karbon tetraklorida**

Nama Peneliti Utama : Elfira Roza  
*Name of the Investigator*

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Andalas  
*Name of Institution*

dan telah menyetujui protokol penelitian tersebut diatas.  
*and recommended the above research protocol.*

Padang, 14 Januari 2013

Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas  
*Plt. Dean of Faculty of Medicine Andalas University*

Ketua  
*Chairperson*



Prof. dr. Fadil Oenzil, PhD, SpGK  
NIP. 194806121976021001

Prof. Dr. dr. Eryati Darwin, PA(K)  
NIP. 1953 1109 1982 112 001





KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL  
**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS ANDALAS**

KAMPUS LIMAU MANIS, PADANG-25163, Telp. (0751) 71682, Fax. 777057

Website : <http://ffarmasi.unand.ac.id>

Email : [dekan@ffarmasi.unand.ac.id](mailto:dekan@ffarmasi.unand.ac.id)

**SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN**

No. 06 /H.16. Farmakol/PP/2013

Kepala Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : Elfira Roza  
 No. BP : 09 21212 026  
 Program Studi : S-2 Biomedik

Telah selesai melakukan penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang dengan judul : *Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosela (Hibiscus Sabdariffa Linn) terhadap Aktifitas Sitokrom P450 dan Histopatologi Hati Tikus Strain Wistar yang Terpapar Karbon tetraklorida yang dimulai tanggal 15 Desember 2012 sampai 20 Pebruari 2013.*

Segala kewajiban yang ditimbulkan dalam pelaksanaan penelitian tersebut telah diselesaikan dengan baik.

Demikianlah surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan dengan semestinya.

Padang, 2 Maret 2013

A/n. Ka Lab Farmakologi

- Tersedianya :
1. Pembimbing I dan II
  2. Yang bersangkutan
  3. Arsip,-



Syafrudin SPT

NIP, 1964102019890201001



SURAT KETERANGAN BEBAS LABORATORIUM

No: 056/H16.2/Lab.Biomedik/2013

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti, PA  
Jabatan : Ketua Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran  
Universitas Andalas Padang

Menerangkan bahwa :

Nama : Elfira Roza  
Instansi : S2 Biomedik

Telah melakukan penelitian dengan judul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosela Terhadap Sitokron P450 CYP24A1 dan Histopatologi Hepar Tikus yang terpapar Karbontetraklorida”** dengan menggunakan metoda Elisa sesuai dengan sampel yang telah kami terima dan telah menyelesaikan semua administrasi terkait di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Demikian surat keterangan ini saya buat dan dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Padang, 1 April 2013

Ketua Laboratorium Biomedik  
Fakultas Kedokteran Unand



(Prof.Dr.dr.Hj. Yanwirasti, P.A.)

NIP. 194309301973032001





UNIVERSITAS ANDALAS  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
**BAGIAN PATOLOGI ANATOMI**

Jl. Perintis Kemerdekaan Padang 25127  
Telp. 0751 21176 Fax 0751 22081  
E-mail : pat\_anatomi@fk.unand.ac.id

Nomor : 13/UN.16.2/PA/2013  
Lampiran : -  
Perihal : Penelitian

Padang, 04 April 2013

Kepada Yth.  
**Ketua Program Studi Pasca Sarjana S2 Biomedik**  
**Fak. Kedokteran Univ. Andalas**  
**Padang**

Bersama ini kami beritahukan bahwa mahasiswa Program Pasca Sarjana S2  
Biomedik:

Nama : Elfira Roza

No. BP : 09 2121

Judul Penelitian : Pengaruh pemberian Ekstrak Rosela (Hibiscus  
Sabdariffa Linn) Terhadap Aktifitas Sitokron Paso  
dan Histopatologi Hati Tikus Strain Wistar yang  
Terpapar Karbon Tetraklorida.

Telah menyelesaikan penelitiannya di bagian Patologi Anatomi (pembuatan preparat,  
interpretasi dan pembuatan foto slide) pada tanggal 03 April 2013.

Demikianlah disampaikan, atas perhatiannya, kami ucapkan terima kasih.



dr. Aswiyanti Asri, M.Si. Med, SpPA  
Nip. 196911071997022001

mpiran 7

Protocol

Date/Time

01/03/2013 13:22:34

Operator

Plate ID

Order Setup

Endpoint Single 450. Onm Mix off Temp 22.9

Order Model #

xx Mark

Order Serial #

10108

Order Version #

1.02.05

Comments

Using Standard Data Set from Current Experiment

Linear Fit  $Y = \text{slope} * X + \text{intercept}$

60/80%:  $X = 14, 216 / 32,395 / 50,574$   $Y = 0,837 / 1,086 / 1,335$

Intercept:  $0,642 (+/-0,7007)$ , slope:  $0,014 (+/-0,000)$

$0,000$ , RMS= $0,011$ ,  $r^2=0,999$

Standards Report

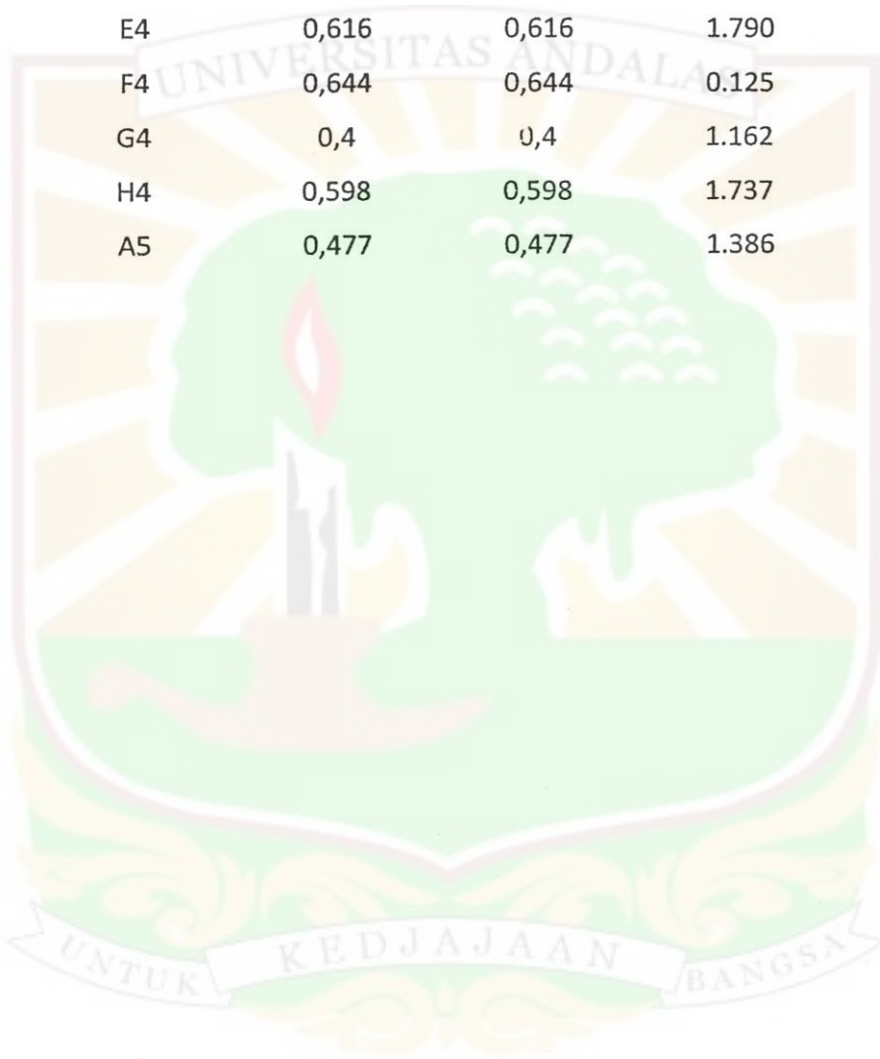
Well #	Conc	Well	Replicates	Mean	SD	%CV
	1.95	A2	0,671	0,671	(*)	(*)
	3.9	H1	0,7704	0,7704	(*)	(*)
	15.6	F1	0,843	0,843	(*)	(*)
	62.5	C1	1,501	1,501	(*)	(*)

Analysis Report :

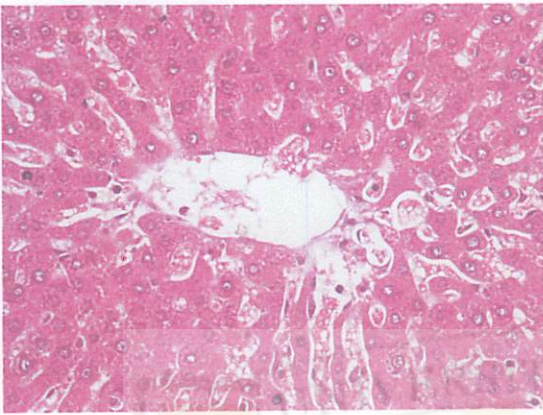
Sample ID	Well	Replicates	Mean	Conc	SD (Conc)
K-1	H2	0,808	0,808	12.099	(*)
K-2	A3	0,721	0,721	5.747	(*)
K-3	B3	0,378	0,378	1.098	(*)
K-4	C3	0,839	0,839	14.362	(*)
K-5	D3	0,706	0,706	4.652	(*)
K-6	E3	0,575	0,575	1.671	(*)
K+1	B2	1,026	1,026	28.015	(*)
K+2	C2	0,991	0,991	25.459	(*)
K+3	D2	1,091	1,091	32.760	(*)
K+4	E2	1,236	1,236	43.346	(*)
K+5	F2	0,977	0,977	24.437	(*)



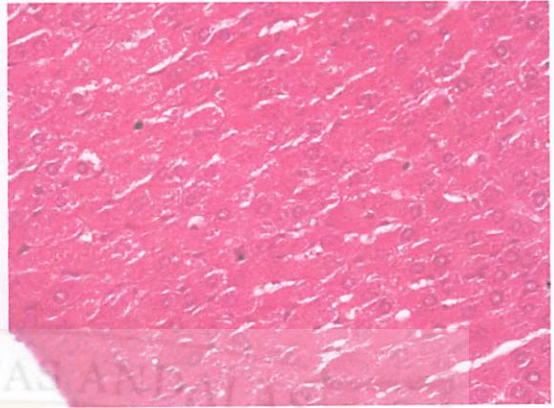
K+6	G2	0,902	0,902	18.962	(*)
P1 1	F3	0,429	0,429	1.246	(*)
P1 2	G3	0,775	0,775	9.689	(*)
P1 3	H3	0,518	0,518	1.505	(*)
P1 4	A4	0,708	0,708	4.789	(*)
P1 5	B4	0,822	0,822	13.121	(*)
P1 6	C4	0,678	0,678	2.608	(*)
P2 1	D4	0,679	0,679	2.681	(*)
P2 2	E4	0,616	0,616	1.790	(*)
P2 3	F4	0,644	0,644	0.125	(*)
P2 4	G4	0,4	0,4	1.162	(*)
P2 5	H4	0,598	0,598	1.737	(*)
P2 6	A5	0,477	0,477	1.386	(*)



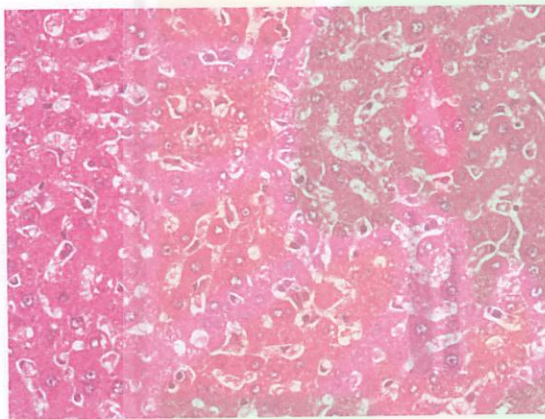
Lampiran 8



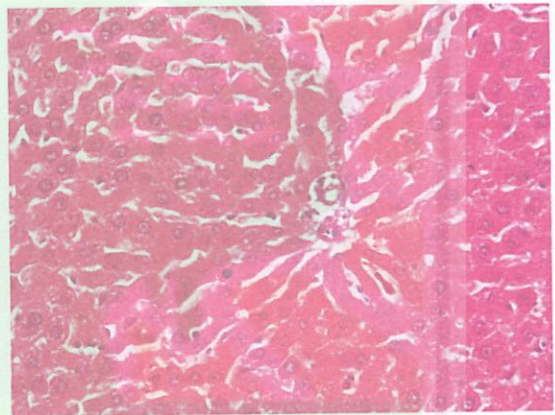
Kontrol Negatif 1



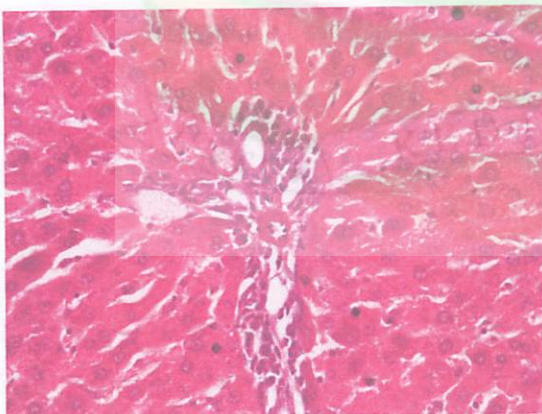
Kontrol Negatif 4



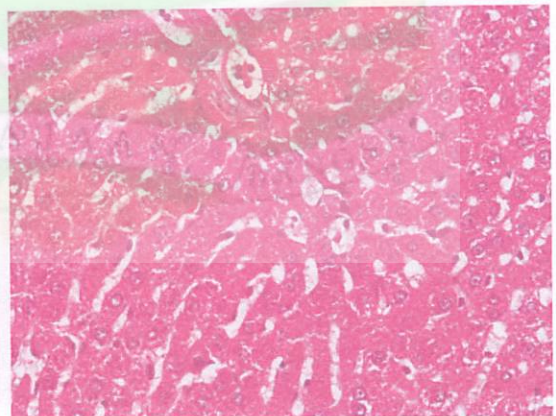
Kontrol Negatif 2



Kontrol Negatif 5

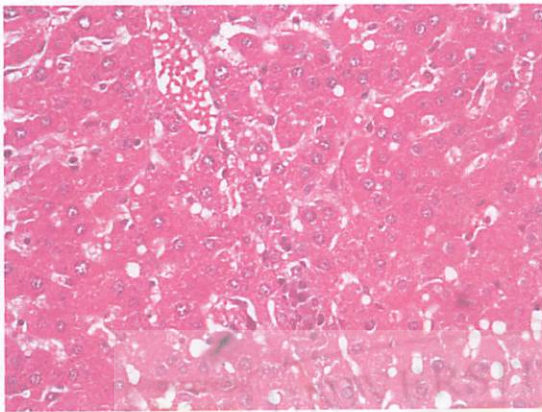


Kontrol Negatif 3

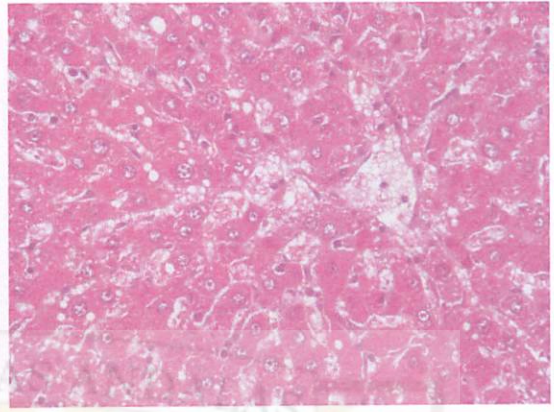


Kontrol Negatif 6

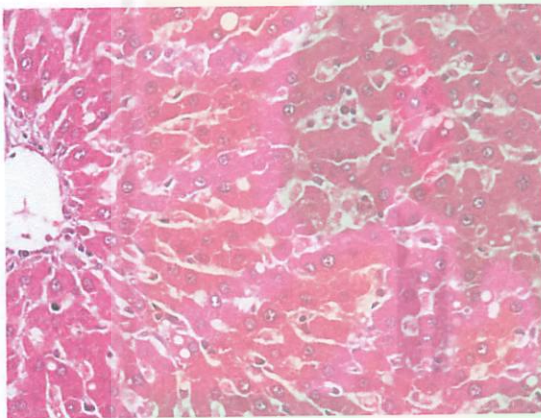




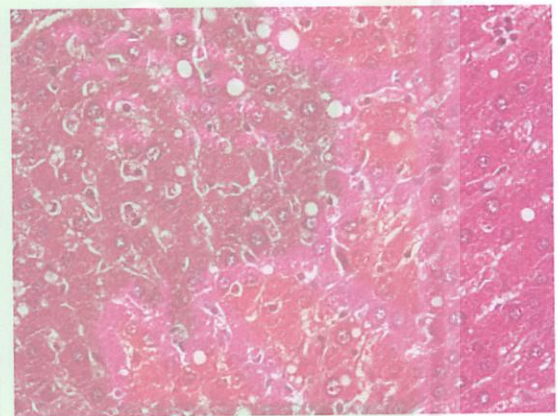
Kontrol Positif 1



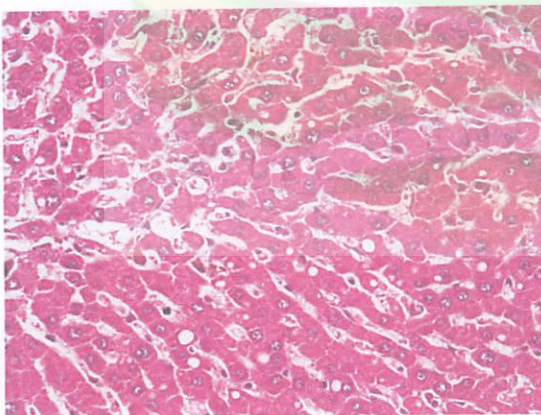
Kontrol Positif 4



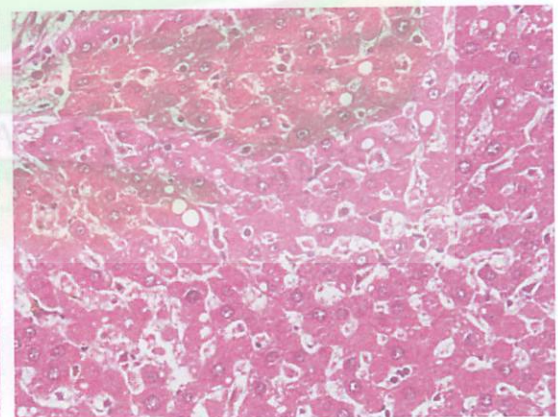
Kontrol Positif 2



Kontrol Positif 5

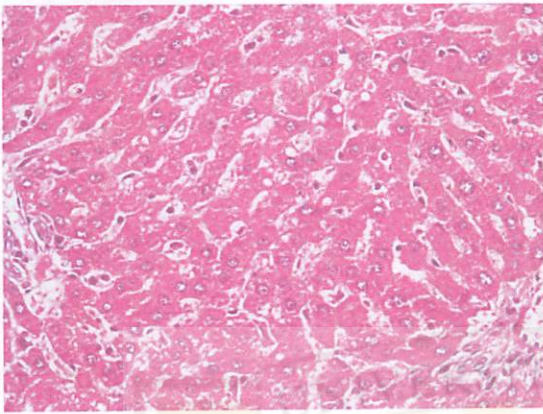


Kontrol Positif 3

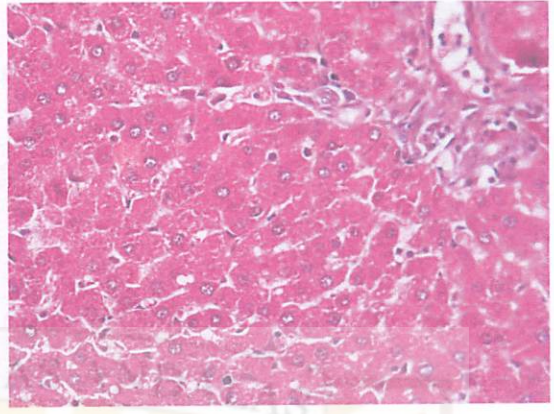


Kontrol Positif 6

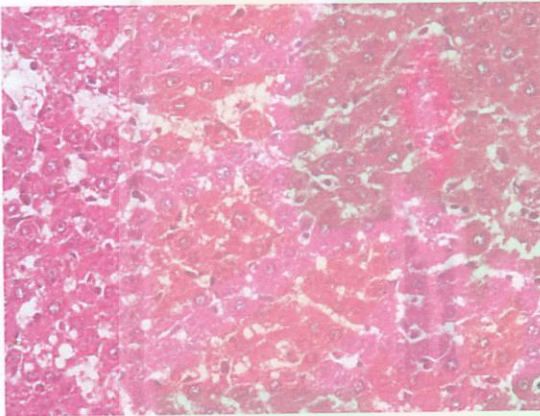




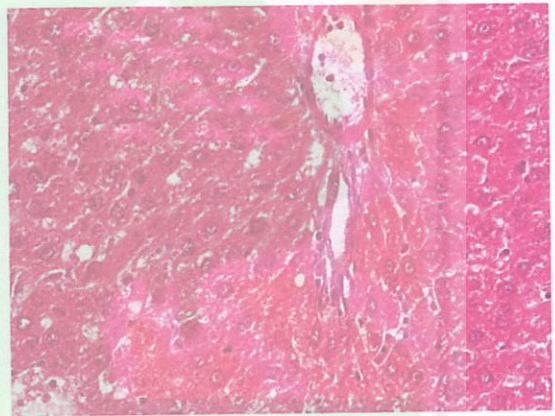
Perlakuan 1.1



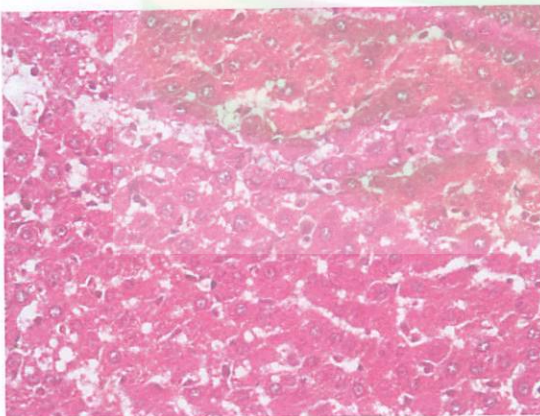
Perlakuan 1.4



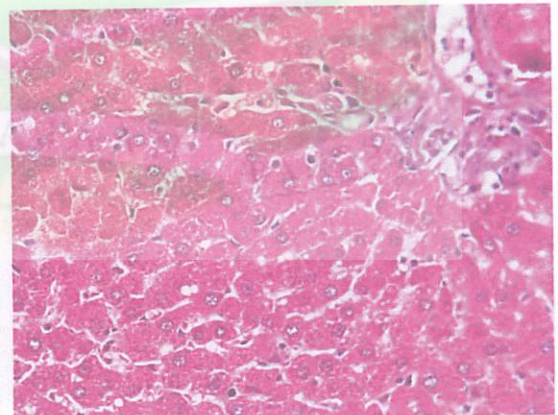
Perlakuan 1.2



Perlakuan 1.5

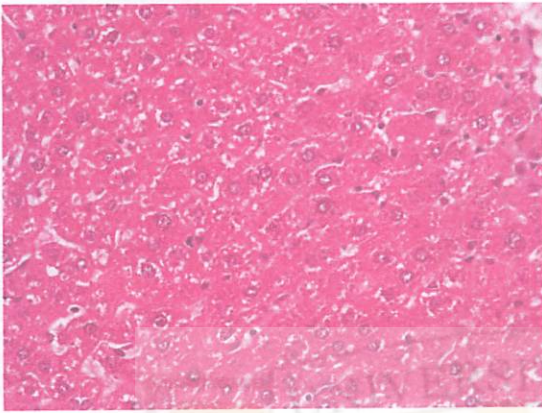


Perlakuan 1.3

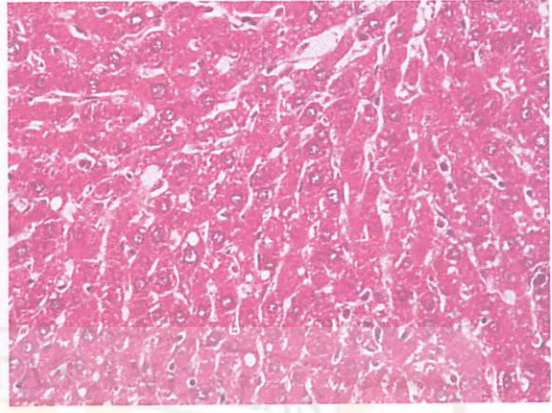


Perlakuan 1.6

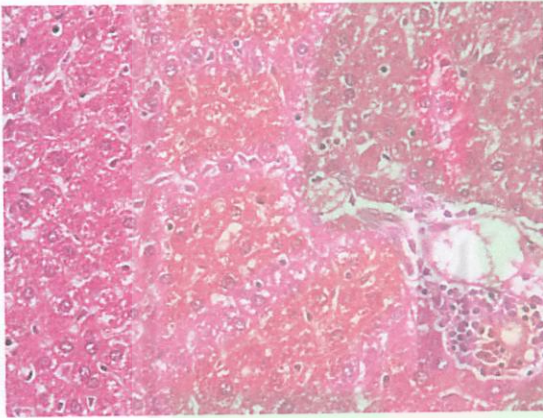




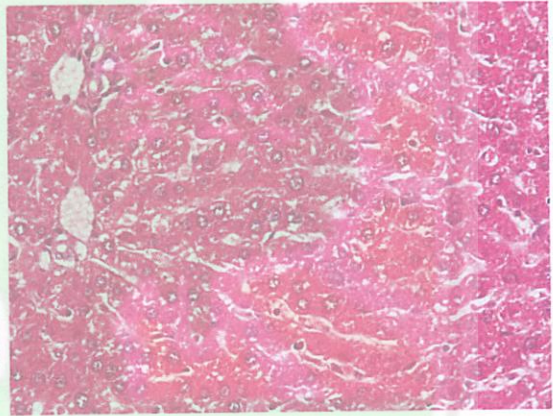
Perlakuan 2.1



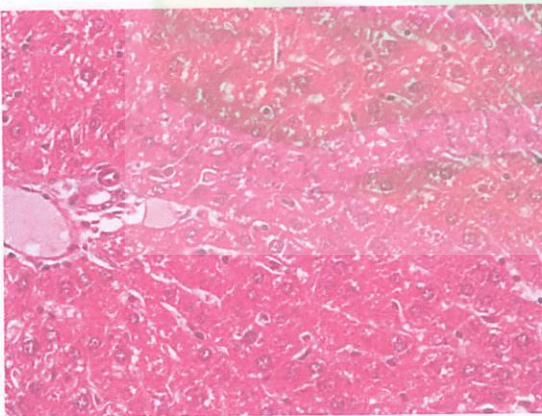
Perlakuan 2.4



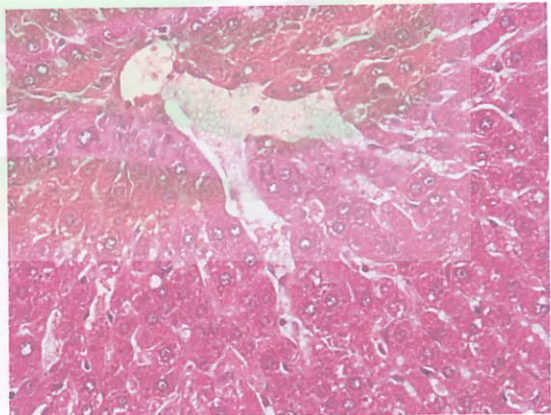
Perlakuan 2.2



Perlakuan 2.5



Perlakuan 2.3



Perlakuan 2.6



Lampiran 9



Tikus yang baru datang dari Surabaya



Tikus yang telah dikelompokkan



Tikus yang ditimbang dengan timbangan Ohaus



Tikus yang diberi karbon tetraklorida secara oral



$\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella



Tikus yang diberi ekstrak rosella secara oral



Tikus setelah dibedah untuk pengambilana jaringan hepar



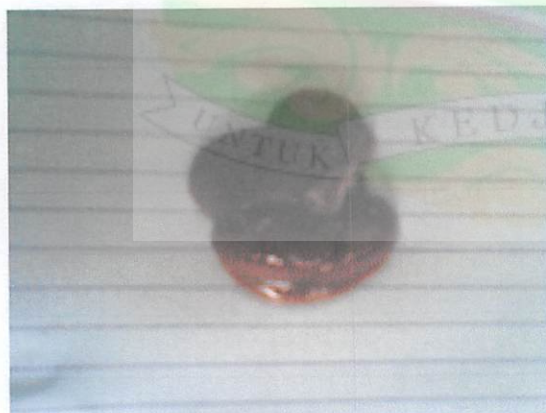
Darah tikus yang akan disentrifus untuk mengambil serum



Pembedahan tikus untuk mengambil jaringan hepar



Hepar tikus yang telah direndam dengan formalin



Hepar tikus



Serum darah tikus