



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 sabdarifa*  
*linn*) TEHADAP AKTIFITAS EMZIM GLUTATION PEROKSIDASE  
TIKUS YANG TERPAPAR KARBON TETRAKLORIDA**

**TESIS**



**ZULFITRA**  
**1021212001**

**PROGRAM PASCASARJANA BIOMEDIK**  
**UNIVERSITAS ANDALA**  
**2014**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELA (*Hibiscus Sabdariffa Linn*)  
TERHADAP AKTIVITAS GLUTATION PEROKSIDASE TIKUS YANG  
TERPAPAR KARBON TETRAKLORIDA**

Oleh

ZULFITA

Pembimbing

Dr. Dra. Eti Yerizel, MS dan Dra. Arni Amir, 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 metabolismenya 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 CYP2A1.  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$  dapat berikatan dengan makromolekul seperti protein, lemak dan DNA yang dapat memicu kerusakan sel.

Rosella merupakan salah satu tanaman yang banyak mengandung antioksidan. Antioksidan yang terkandung dalam rosella diantaranya vitamin C, flavonoid dan karoten yang dapat melindungi hepar dari dampak buruk  $\text{CCl}_4$ . Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan penelitian bagaimana pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap aktifitas glutathione peroxidase tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ .

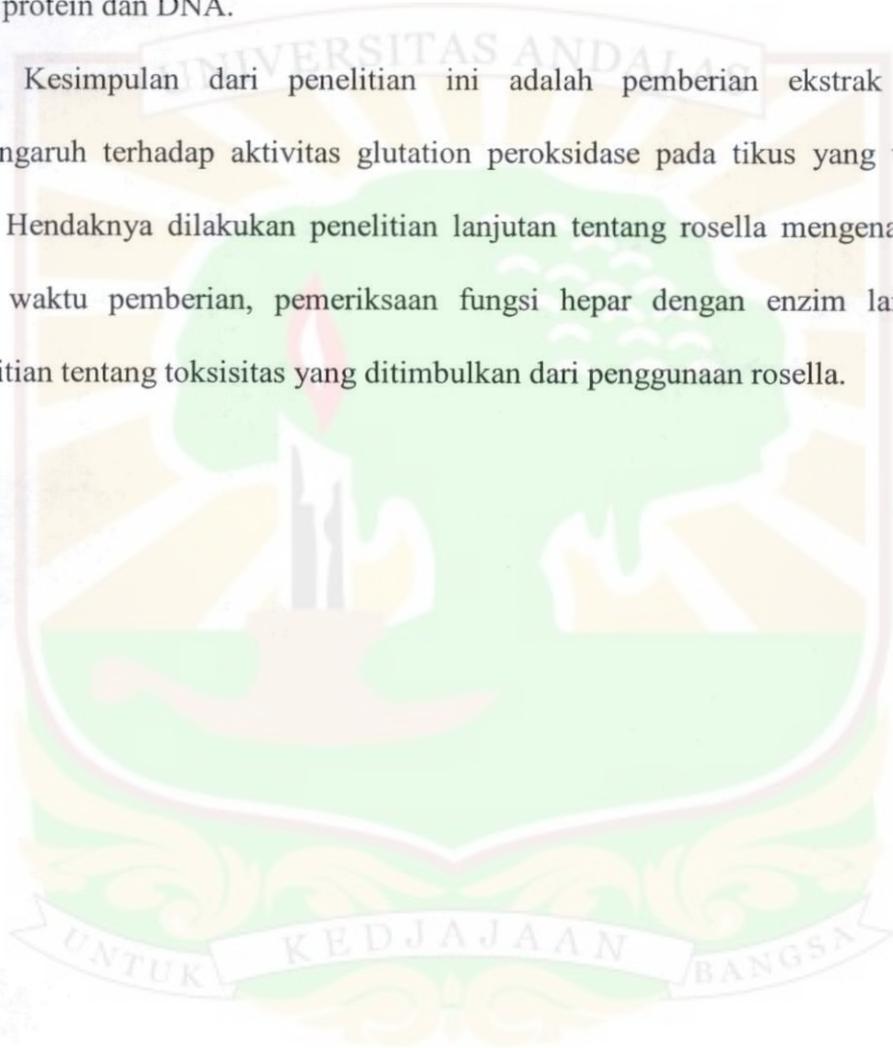
Penelitian ini menggunakan desain *post test only kontrol group design*, yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Andalas dan 1 laboratorium Biomedik Universitas Andalas Padang. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 24 ekor tikus putih Strain Wistar berusia 2-3 bulan dengan berat 200-250 gr. Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif (mendapat  $\text{CCl}_4$ ), 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).  $\text{CCl}_4$  diberikan secara oral dengan dosis tunggal sebanyak 1 mg/kg bb. 24 jam kemudian diberikan ekstrak rosella selama 14 hari. Pada hari ke-15, tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan darah. Darah kemudian di sentrifus untuk memisahkan serum dari komponen darah lainnya. Serum digunakan untuk pemeriksaan aktifitas glutatation peroksidase.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada uji Anova didapatkan  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan rerata aktivitas glutatation peroksidase antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Analisa dengan Uji *Post Hoc Bonferoni* ditemukan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan rerata aktivitas glutatation peroksidase antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan I dan antara kelompok kontrol positif dengan perlakuan II ( $p < 0,05$ ), dan antara kelompok perlakuan I dan kelompok perlakuan II juga ditemukan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ).

Radikal bebas  $\text{CCl}_4$  dapat menurunkan aktivitas glutatation peroksidase, 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 electron terhadap hasil metabolit  $\text{CCl}_4$  yaitu  $\text{CCl}_3^*$  dan  $\text{CCl}_3\text{O}_2^*$ , sehingga hasil metabolit tersebut tidak berikatan dengan makro molekul seperti lipid, protein dan DNA.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak rosella berpengaruh terhadap aktivitas glutathion peroksidase pada tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$ . Hendaknya dilakukan penelitian lanjutan tentang rosella mengenai dosis, lama waktu pemberian, pemeriksaan fungsi hepar dengan enzim lain serta penelitian tentang toksisitas yang ditimbulkan dari penggunaan rosella.



PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS ANDALAS  
Program Studi Ilmu Biomedik  
Tesis, Januari 2014  
ZULFITA

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELA (*HIBISCUS SABBDARIFFA LINN*) TERHADAP AKTIFITAS GLUTATION PEROKSIDASE TIKUS YANG TERPAPAR KARBON TETRAKLORIDA**

**ABSTRAK**

Radikal bebas merupakan penyebab timbulnya berbagai penyakit. Salah satu sumber radikal bebas adalah karbon tetraklorida ( $\text{CCl}_4$ ). 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. Dampak buruk  $\text{CCl}_4$  dapat di atasi dengan pemberian antioksidan. Rosella merupakan tanaman yang kaya antioksidan seperti vitamin c, dan karoten. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap aktifitas Glutation Peroksidase tikus yang terpapar karbon tetraklorida.

Penelitian ini adalah 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 175-250 gr. Sampel diambil secara acak dan dibagi menjadi 4 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif, kontrol positif ( $\text{CCl}_4$ ), perlakuan I ( $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 250 mg/kg bb) dan perlakuan II ( $\text{CCl}_4$  dan ekstrak rosella 500 mg/kg bb).  $\text{CCl}_4$  diberikan secara oral dosis tunggal, 24 jam kemudian diberi ekstrak rosella secara oral selama 14 hari. Data dianalisis dengan uji Anova dengan tingkat kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan rerata aktifitas glutation peroksidase kelompok kontrol negatif  $189,87 \pm 9,32$  nmol/ml, kelompok kontrol positif  $128,89 \pm 16,34$ , kelompok perlakuan I  $158,10 \pm 8,55$ , dan kelompok perlakuan II  $228,95 \pm 15,80$ . Secara statistik didapatkan perbedaan rerata aktivitas glutation peroksidase antar kelompok ( $p < 0,05$ ).

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak rosella dapat meningkatkan aktifitas glutation peroksidase tikus yang terpapar karbon tetraklorida. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis dan toksisitas ekstrak rosella.

**Kata Kunci :** Karbon Tetraklorida, glutation peroksidase, dan Rosella

POSTGRADUATE PROGRAM OF ANDALAS UNIVERSITY

Biomedical Science Program

A Thesis, Januari 2014

By : Zulfitra

**THE EFFECT OF ROSELLE EXTRACT AGAINST THE GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY OF MICE EXPOSED TO CARBON TETRACHLORIDE**

ABSTRACT

Free radicals are the cause of various diseases. One source of free radicals is tetrachloride carbon (CCl<sub>4</sub>). Effects of free radicals caused by CCl<sub>4</sub> can especially be seen in the liver. CCl<sub>4</sub> in metabolism in the endoplasmic reticulum of the liver by the cytochrome P450 cells. Adverse effects CCl<sub>4</sub> can be overcome by administration of antioxidants. Rosella is a plant that is rich in antioxidants such as vitamin C and carotenoids. This study aims to determine the effect of roselle extract against the glutathione peroxidase activity of mice exposed to carbon tetrachloride.

This study is an experimental research design with a post-test only control group design. Samples of this experiment is 24 Wistar strain rats were 2-3 months old, weighing 175-250 g. Samples were taken at random and divided into 4 groups consisting of a negative control group, positive control (CCl<sub>4</sub>), treatment I (CCl<sub>4</sub> and roselle extract 250 mg / kg bw) and treatment II (CCl<sub>4</sub> and roselle extracts 500 mg/kg bw ). CCl<sub>4</sub> orally administered a single dose, 24 hours later given roselle extract orally for 14 days. Data were analyzed by ANOVA test with a confidence level of 95 %.

The results showed a mean activity of glutathione peroxidase negative control group  $189.87 \pm 9.32$  nmol / ml , positive control group  $128.89 \pm 16.34$ ,  $158.10 \pm$  treatment group I 8.55, and treatment group II  $228.95 \pm 15.80$ . Statistically obtained glutathione peroxidase activity mean difference between groups ( $p < 0.05$ ). From the results of this study we can concluded that the roselle extract can increase glutathione peroxidase activity of rats exposed to carbon tetrachloride. Need to do more research on roselle extract dose and toxicity .

**Key Words:** *Carbontetraclorida, glutation peroksidase and Rosella*

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : ZULFITA

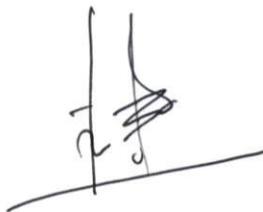
NO BP : 1021212001

Jurusan : Ilmu Biomedik Universitas Andalas

Dengan ini menyatakan bahwa tesis yang ditulis dengan judul "*Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Terhadap Aktifitas Glutation Peroksidase Tikus yang Terpapar Karbon Tetraklorida*" adalah asli hasil karya atau kerja sendiri bukan merupakan ciplakan dari hasil karya orang lain kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini tidak benar maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya

Demikian surat pernyataan ini saya buat.

Padang, Januari 2014



Zulfita

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Padang, sebagai anak pertama dari Bapak Zulkarnaini. B (Alm) dan ibu Hj Anizar. Penulis memiliki suami, Triadi, SH.MH dan tiga orang anak yang bernama Diego Putra Dinata, myrizqi Wisnu Dinata dan Keysa Maylof Dinata

Penulis menamatkan Sekolah Dasar (SD) Negeri 11 Padang tahun 1987, Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 13 Padang tahun 1990, Sekolah Perawat Kesehatan (SPK) Tahun 1993, D III dan DIV Bidan Pendidik Politeknik Kesehatan (POLTEKKES) Prodi Kebidanan tahun 2001 dan tahun 2006. Pada tahun 2010 penulis berkesempatan melanjutkan pendidikan Program Pascasarjana Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya ucapkan kehadirat ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia serta hidayah-Nya kepada saya dalam menyelesaikan Tesis ini. Adapun judul dari tesis ini adalah " **Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella (*Hibiscus Sabdarifa Linn*) Terhadap Aktifitas Enzim Glutation Peroksidase Tikus Yang Terpapar Karbon Tetraklorida** ".

Selama proses penyusunan tesis ini, penulis banyak menemui kesulitan dan hambatan, namun berkat rahmat dan hidayah-Nya serta bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, akhirnya tesis ini dapat diselesaikan. Dengan hati yang tulus dan penuh rasa syukur penulis sampaikan ucapan terima kasih kepada yang terhormat:

1. DR. Eti Yerizel, MS dan Dra. Arni Amir, MS, sebagai pembimbing yang dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing, membantu, memotivasi, memperluas wawasan keilmuan serta memberikan saran dan dukungan moril, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.
2. Ibu Prof. DR. dr. Delmi Sulastri, MS, SpGK sebagai Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Andalas Padang yang telah banyak memberikan motivasi dan dorongan serta memfasilitasi peneliti selama penyusunan tesis ini.
3. Bapak DR. dr. Masrul, SpGK Dekan Fakultas Kedokteran yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Andalas Padang.
4. Bapak Prof. Dr. Fadil Oenzil, PhD, SpGK, Ibu Prof. dr. Nur Indrawaty. Lm MSc, PhD, SpGK dan Bapak DR.dr. Hafni Bachtiar, MPH sebagai penguji yang dengan penuh perhatian dan kesabaran, telah banyak memberikan

bimbingan, arahan, saran, kritikan serta masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

5. Bapak-Ibu seluruh Tim Dosen Pascasarjana Ilmu Biomedik Universitas Andalas, yang telah menuangkan keilmuan beliau selama penulis mengarungi proses pendidikan di Pascasarjana Ilmu Biomedik Universitas Andalas.
6. Teristimewa buat Ibuku, suami, adik - adikku serta ke-3 anak – anakku tercinta, yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil serta semangat dan doa sehingga penulisan tesis ini dapat diselesaikan.
7. Semua rekan di Program Studi Ilmu Biomedik angkatan 2010, atas kerjasama dan telah memberikan dukungan selama menjalani pendidikan.
8. Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutka satu persatu yang telah memberikan dorongan dan semangat selama saya mengikuti pendidikan ini.

Semoga amal baik dari semua pihak, mendapatkan imbalan yang berlipat ganda dari ALLAH AWT. Akhirnya disadari dengan sepenuhnya bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, untuk itu diharapkan saran dan masukan dari semua pihak demi sempurnanya tesis ini. Semoga tesis ini dapat diterima dan dapat bermanfaat.

Padang, Desember 2013

Zulfita

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b>	
<b>PERNYATAAN PERSETUJUAN</b>	
<b>RINGKASAN.....</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRAK.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACK.....</b>	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR RIWAYAT HIDUP</b>	
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>viii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Manfaat Penelitian.....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Oksidan (Radikal Bebas).....	10
2.2 Karbon Tetraklorida .....	25
2.3 Antioksidan.....	29
2.4 Enzim Glutation Peroksidase .....	33
2.5 Tanaman Rosella.....	39
2.6 Hati .....	46
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>	
3.1 Kerangka Konsep .....	57
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep .....	58
3.3 Hipotesis .....	58

## **BAB IV METODE PENELITIAN**

4.1 Jenis dan Desain Penelitian .....	59
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	59
4.3 Populasi dan Sampel.....	60
4.4 Variabel Penelitian .....	61
4.5 Definisi Operasional.....	61
4.6 Prosedur penelitian.....	63
4.7 Rancangan penelitian.....	63
4.8 Prosedur Kerja.....	64
4.9 Analisa Data .....	75

<b>BAB V HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>76</b>
------------------------------------	-----------

<b>BAB VI PEMBAHASAN.....</b>	<b>79</b>
-------------------------------	-----------

## **BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN**

7.1 Kesimpulan.....	85
7.2 Saran .....	85

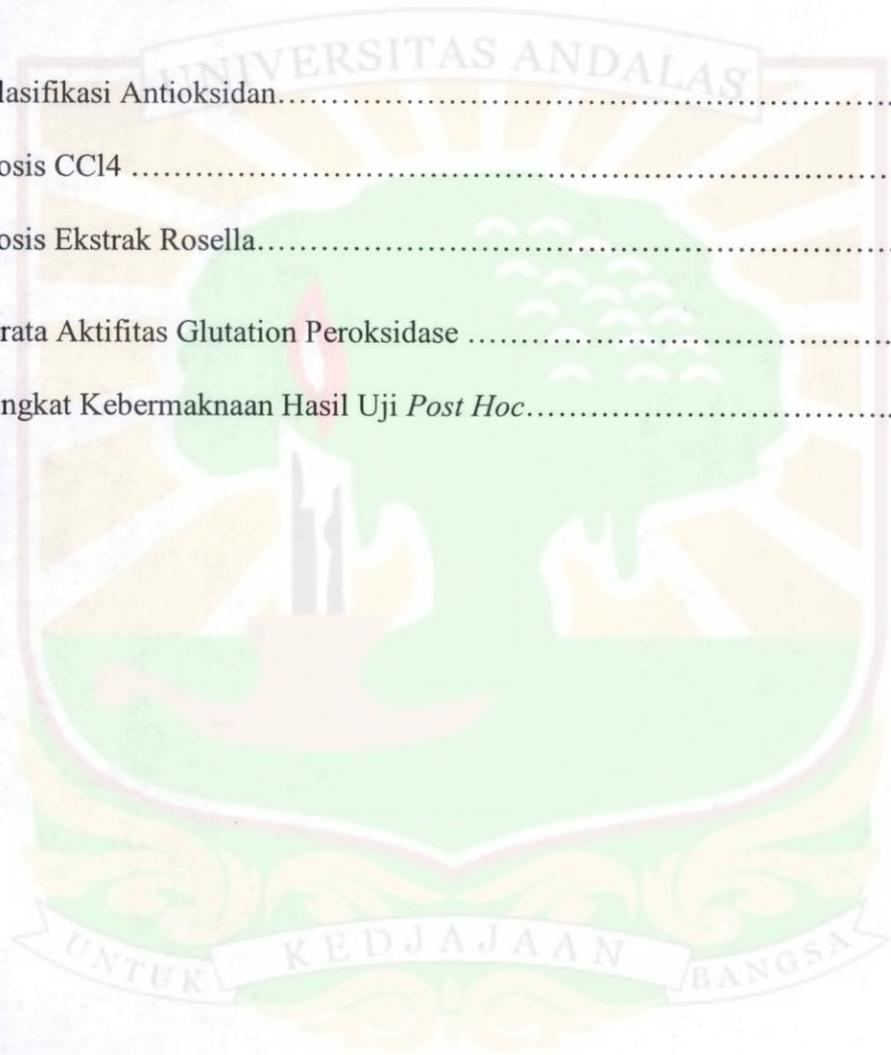
## **DAFTAR PUSTAKA**

## **LAMPIRAN**



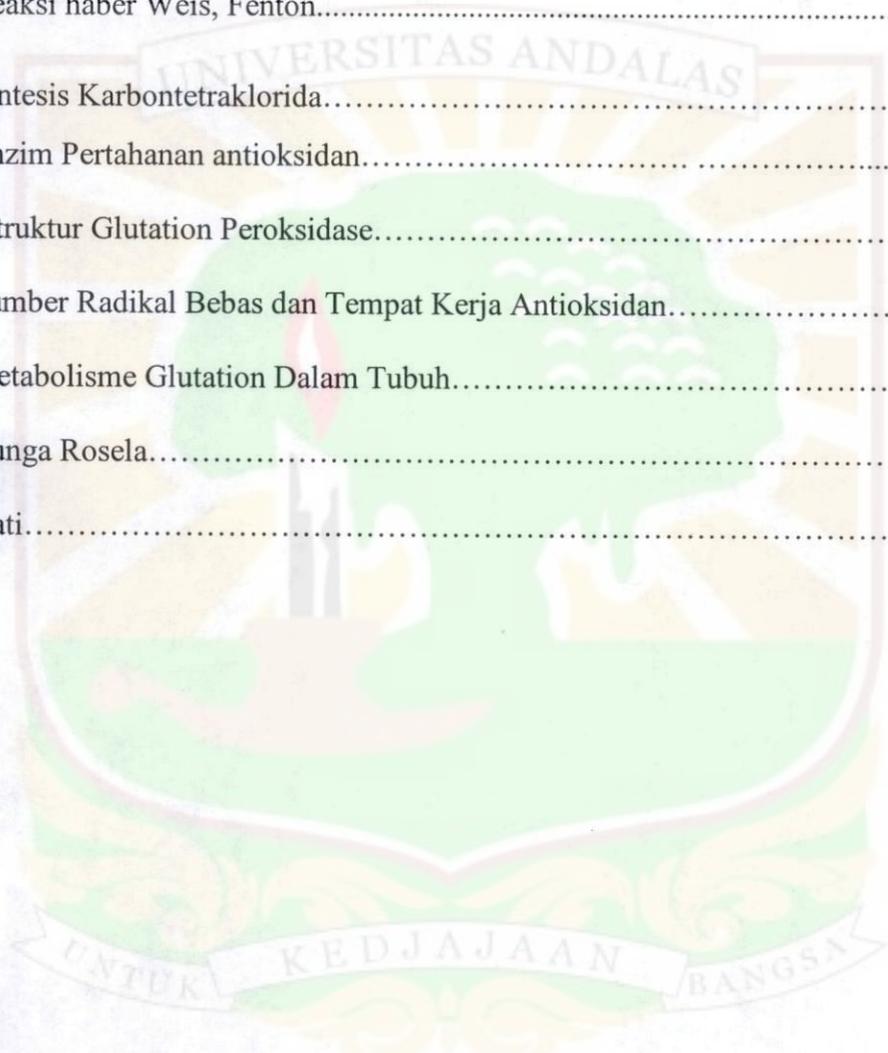
## DAFTAR TABEL

Tabel	hal
2.1 Radikal bebas biologis .....	14
2.2. Klasifikasi Antioksidan.....	32
4.1 Dosis CCl <sub>4</sub> .....	69
4.2 Dosis Ekstrak Rosella.....	72
5.1 Rerata Aktifitas Glutation Peroksidase .....	77
5.2 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji <i>Post Hoc</i> .....	78



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hal
2.1 Struktur kimia radikal bebas .....	13
2.2 Reaksi haber Weis, Fenton.....	21
2.3 Sintesis Karbontetraklorida.....	26
2.4 Enzim Pertahanan antioksidan.....	30
2.5 Struktur Glutation Peroksidase.....	33
2.6 Sumber Radikal Bebas dan Tempat Kerja Antioksidan.....	35
2.7 Metabolisme Glutation Dalam Tubuh.....	38
2.8 Bunga Rosela.....	41
2.9 Hati.....	47



## 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 : Foto Penelitian



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan salah satu penyebab timbulnya berbagai penyakit degeneratif, seperti kardiovaskuler, tekanan darah tinggi, stroke, sirosis hati, katarak, diabetes mellitus dan kanker. 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).

Salah satu sumber radikal bebas yang dihasilkan dari luar yang dapat menimbulkan stres oksidatif adalah senyawa toksik seperti karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) yang merupakan salah satu contoh pembentuk radikal yang sensitif untuk hati. Karbon tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) diproduksi dalam jumlah banyak misalnya dalam pembuatan cairan refrigerator/pendingin, propellants untuk kaleng aerosol, pestisida, cairan pembersih noda, dan digunakan untuk pemadam kebakaran (ATSDR, 2005).

Rata-rata saat ini seluruh populasi terinduksi karbon tetraklorida dengan dosis 0,10 - 0,27 mg/kg BB (WHO, 2002). Dampak racun karbon tetraklorida pada sel hati disebabkan oleh adanya reaksi antara radikal bebas hasil aktivasi

$\text{CCl}_4$  dengan asam lemak tak jenuh yang terdapat pada membran sel (Winaya dan Suarsana, 2005).

Menurut Slater (1984) dalam Yanwirasti (1997), 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. Dalam reticulum endoplasma hati  $\text{CCl}_4$  dimetabolisme oleh sitokrom P450 menghasilkan zat yang reaktif yaitu radikal *triklorometil* ( $\text{CCL}_3^\circ$ ) (Jeon, 2003, dalam Panjaitan 2007).

Radikal bebas  $\text{CCL}_3^\circ$  akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk radikal *triklorometilperoxi* ( $\text{CCL}_3\text{O}_2$ ) yang jauh lebih reaktif dari pada  $\text{CCL}_3^\circ$ . *Triklorometilperoxi* ( $\text{CCL}_3\text{O}_2$ ) bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida. Akibatnya fungsi biologis biomolekuler akan terganggu. *Triklorometilperoxi* juga menyebabkan inisiasi lipid peroksidase oleh  $\text{H}^*$  absraksi, yang berakibat penurunan Glutation peroksidase dan kerusakan mekanisme  $\text{Ca}^{2+}$  *sequestration*, sehingga terjadi peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler yang menyebabkan sintesis  $\text{NO}^*$ . Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler meningkatkan kerusakan protein, DNA, dan aktivasi phospholipase, peningkatan lipid peroksidase, selanjutnya terjadi peningkatan cytotoxic aldehyd.  $\text{CCl}_4$  juga dapat mengaktivasi sel kupffer (Halliwell and Gutteridge, 2004).

Kerusakan sel hepar sendiri juga memicu aktivasi sel kupffer. Sel kupffer yang teraktivasi dapat melepaskan berbagai mediator pro inflamasi yang dapat memperberat kerusakan hepatosit dan mediator anti inflamasi. Selain itu, sel

kupffer juga dapat melepaskan ROS yang juga memperberat kerusakan hepatosit (Halliwell *and* Gutteridge, 2004).

Berdasarkan penelitian Dahiru (2009), bahwa pemberian dosis CCL<sub>4</sub> dengan dosis tunggal 1.0 mg/kg berat badan dapat menyebabkan peningkatan aktifitas enzim SGPT, SGOT dan total protein pada hati tikus percobaan. Tingkat racun CCL<sub>4</sub> yang diberikan kepada hewan coba menghasilkan akumulasi lemak di hati akibat penyumbatan dalam sintesis lipoprotein yang membawa trigliserida dari organ ini. Struktur retikulum endoplasma sel hati menjadi terdistorsi, sintesis protein hati melambat dan aktivitas enzim yang terletak di retikulum endoplasma, seperti glukosa-6-fosfatase cepat menurun. Seperti halnya kemampuan retikulum endoplasma menyerap ion Ca<sup>2+</sup> dengan Ca<sup>2+</sup> ATPase.

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.

Dalam menghadapi serangan terhadap radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme perlindungan melalui sistem antioksidan tubuh. Secara umum, antioksidan dibedakan menjadi dua kelompok yaitu: antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis. Antioksidan enzimatis (endogen) seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase (GSH-px), serta

glutation reduktase (GSH) (Chevion *et al*, 2003). Antioksidan non enzimatis seperti antioksidan dari luar (eksogen) yang berasal dari bahan makanan, misalnya vitamin C, vitamin E, betakaroten dan senyawa flavonoid yang diperoleh dari tumbuhan (Tilak and Devasagayam, 2006). Kekurangan salah satu komponen tersebut dapat menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh, sehingga perlindungan tubuh terhadap radikal bebas berkurang. (Chevion *et al*, 2003).

Status antioksidan dalam tubuh dapat diamati dalam berbagai parameter. Misalnya aktifitas SOD, katalase, dan glutation peroksidase, vitamin C, vitamin E, dan lain –lain (Winarsi dkk, 2003). Potensi satu jenis antioksidan perlu didukung oleh jenis antioksidan yang lain. Masing – masing jenis antioksidan memiliki sifat dan cara kerja yang mungkin tidak sama, namun keduanya memiliki target yang tidak berbeda, yaitu menekan atau menghambat reaktifitas radikal bebas (damiani *et al*, 2008).

Glutation peroksidase adalah enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif dan mengandung selenium (Se) pada sisi aktifnya. Glutation peroksidase sebagai enzim bekerja sebagai peredam (*quenching*) radikal bebas (Sen *et al*, 2010). Kerja enzim ini mengubah molekul hidrogen peroksida dan lipid peroksida menjadi air. Glutation peroksidase adalah enzim intraseluler yang terdispersi dalam sitoplasma, namun aktivitasnya ditemukan dalam mitokondria.

Enzim glutation peroksidase yang ditemukan dalam sitoplasma tersebut merupakan tetramer, mengandung selenosistein pada sisi aktifnya. Enzim ini

bersifat nukleofilik, yang sangat mudah terionisasi. Dalam sitoplasma, enzim glutathion peroksidase bekerja pada membrane fosfolipid yang teroksidasi sehingga dikenal juga sebagai *hyperoxide glutathione peroxidase*. Enzim glutathion peroksidase juga dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol, lipoprotein dan fosfolipid yang teroksidasi dalam membran sel.

Glutathion peroksidase yang rendah berkorelasi dengan gangguan yang berhubungan dengan radikal bebas (Judge *et al*, 2005). Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif, aktivitas glutathion peroksidase rendah karena terjadi sekunder isoflavon (Rohrdanz *et al* 2002., Chen *et al*, 2002). Aktivitas enzim ini juga dapat diinduksi oleh antioksidan eksogen isoflavon (Rohrdanz *et al* 2002.,Chen *et al*,2002).

Aktifitas Glutathion peroksidase dalam tubuh bervariasi tergantung jaringannya. Aktifitas glutathion di dalam darah berada dalam rentang 0,5-8 mili molar/l dengan konsentrasi tertinggi di hati. Sedangkan hati tikus normalnya mengandung 7-8  $\mu$  mol GSH/g jaringan. Glutathion dalam plasma hanya 0,5% dari yang terkandung dalam darah, sedangkan dalam eritrosit mengandung 99,5%. Pada eukariot, 90% Glutathion terdapat di sitosol, 10% terdapat di mitokondria dan beberapa persen berada di retikulum endoplasma (RE).

Pada keadaan stress oksidatif konsentrasi glutathion peroksidase akan menurun yang dapat disebabkan oleh terpakainya glutathion dalam menangkal radikal bebas tersebut. Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Youngson, 2005)

Salah satu antioksidan eksogen alami adalah rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Saat ini rosella menjadi begitu populer. Hal ini disebabkan hampir seluruh bagian tanaman ini dapat digunakan untuk kebutuhan pengobatan, terutama untuk pengobatan alternatif. Selain itu, rosella memiliki kandungan senyawa kimia yang dapat memberikan banyak manfaat (Mardiah dkk, 2009).

Rosella mengandung pigmen antosianin yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Semakin pekat warna merah pada kelopak bunga rosella, rasanya akan semakin asam dan kandungan antosianin (sebagai antioksidan) semakin tinggi (Reindi, 2009). Kadar antioksidan dalam kelopak bunga rosella kering jauh lebih tinggi dibanding dengan tanaman kumis kucing. Antosianin merupakan senyawa yang dapat menjaga fungsi hati akibat radikal bebas. Sebagai antioksidan rosella juga mengandung metanol, asam askorbat,  $\beta$ -karoten, dan asam protokatekuat. Kandungan metanol dan polifenol pada juga 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 askorbat 6,7 mg. Disamping itu rosella juga mengandung vitamin B1, B2, niacin dan vitamin D serta mengandung 18 asam amino. Kadar antioksidan yang tinggi pada kelopak dapat menghambat radikal bebas (Rahmawati, 2012).

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<sub>4</sub> secara bermakna. Penelitian yang dilakukan oleh Dahiru (2009) tentang efek ekstrak rosella terhadap kerusakan hati akibat karbon tetraklorida menunjukkan bahwa pemberian ekstrak 250 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<sub>4</sub> melalui metabolisme enzim Glutathion Peroksidase belum diketahui.

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktifitas enzim Glutathion Peroksidase tikus yang terpapar karbon tetraklorida (CCL<sub>4</sub>)

## **1.2 Perumusan Masalah**

Apakah ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa Linn*) terhadap aktifitas enzim Glutathion Peroksidase tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktifitas enzim Glutathion Peroksidase tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*) terhadap aktifitas enzim Glutathion Peroksidase tikus yang terpapar CCL<sub>4</sub>.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Bagi Akademik**

Diketahuinya manfaat ekstrak kelopak bunga rosella sebagai antioksidan eksogen serta informasi mengenai efektifitasnya dalam meningkatkan aktifitas enzim glutathion peroksidase sehingga dapat memperkaya pengetahuan dibidang biomedis dan bidang ilmu lainnya.

### **1.4.2. Bagi masyarakat**

Mengembangkan pemanfaatan bunga rosella sebagai pelengkap antioksidan eksogen serta merupakan sumbangan yang dapat dimanfaatkan dalam rangka meningkatkan pelayanan kesehatan secara luas dan merata, memelihara dan melembagakan warisan budaya bangsa.

### **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. Oksidan (Radikal Bebas)

##### 2.1.1 Definisi

Radikal bebas adalah suatu molekul dimana elektron yang terletak pada lapisan paling luar tidak mempunyai pasangan (Greenwald, 1991; Halliwall, 1995). Adanya molekul elektron yang tidak berpasangan ini membuat mereka sangat reaktif. Reaktif artinya mereka mempunyai spesifisitas yang rendah sehingga mereka mampu bereaksi dengan molekul – molekul yang berada disekitarnya. Molekul – molekul tersebut termasuk protein, lipid, karbohidrat dan DNA. Reaktif juga berarti mereka tidak bertahan lama dalam bentuk “asli” karena untuk mempertahankan kestabilan molekul, mereka harus mengambil satu elektron dari molekul yang lain. Artinya, radikal bebas menyerang molekul stabil yang berada didekatnya dan mengambil elektron dari molekul tersebut.

Molekul yang diambil elektronnya kemudian juga menjadi radikal bebas dan mengambil elektron dari molekul lain, begitulah seterusnya sampai terjadi kerusakan sel. Karena molekul - molekul yang sangat reaktif ini berasal dari oksigen maka secara umum molekul - molekul tersebut disebut *reactive oxygen species (ROS)* (Anonim, 2002)

### 2.1.2 Fisiologi

Radikal bebas dapat ditimbulkan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan mekanisme sebagai berikut:

1. Pemecahan ikatan kovalen, seperti sinar ultra violet atau radiasi.
2. Molekul normal yang kehilangan satu elektron
3. Penambahan satu elektron pada molekul normal.

Radikal bebas dapat bermuatan positif, negatif ataupun netral. Elektron yang tidak berpasangan dapat menambah molekul yang bersifat netral sehingga molekul tersebut menjadi bermuatan negatif. Molekul yang bermuatan negatif juga dapat terbentuk dari molekul bermuatan positif yang kehilangan elektron. Molekul yang asalnya tidak netral dengan penambahan atau pengurangan elektron dapat menjadi netral. Sebagian besar radikal bebas terbentuk di dalam sel melalui transfer elektron di mitokondria dan retikulum endoplasmik. Transfer elektron tersebut dapat diperantarai secara enzimatik atau non enzimatik (Anonim, 2002)

### 2.1.3 Struktur Kimia

Atom terdiri dari nukleus, proton, dan elektron. Jumlah proton (bermuatan positif) dalam nukleus menentukan jumlah dari elektron (bermuatan negatif) yang mengelilingi atom tersebut. Elektron berperan dalam reaksi kimia dan merupakan bahan yang menggabungkan atom - atom untuk membentuk suatu molekul.

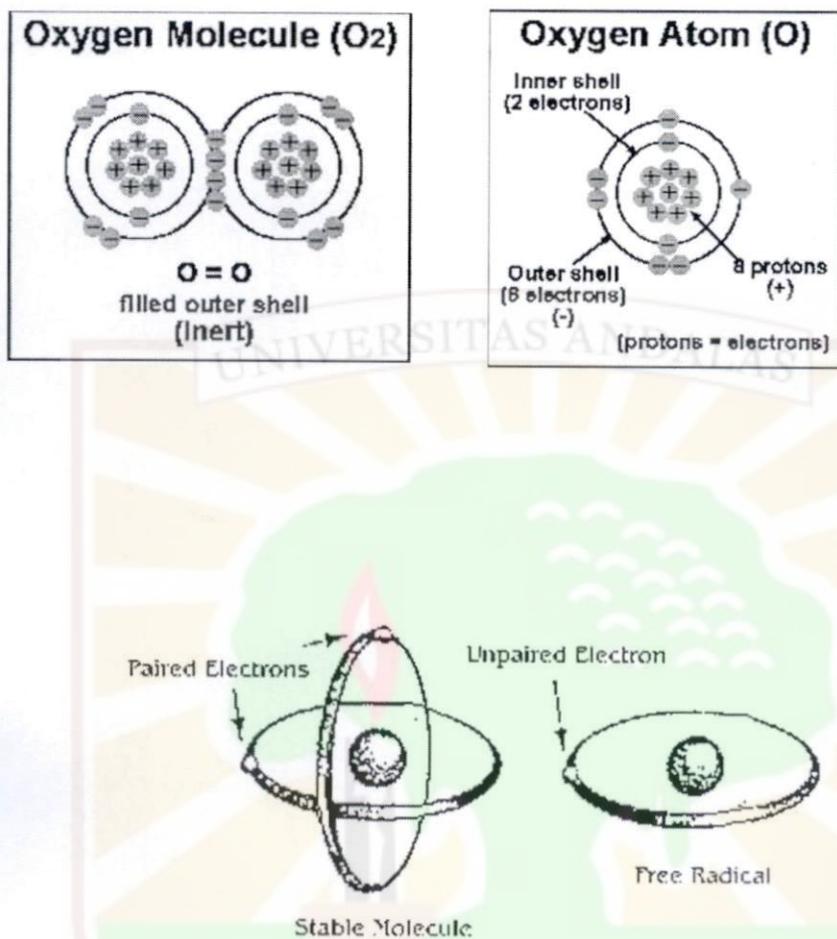
Elektron mengelilingi, atau mengorbit suatu atom dalam satu atau lebih lapisan. Jika satu lapisan penuh, elektron akan mengisi lapisan kedua. Lapisan kedua akan penuh jika telah memiliki 8 elektron, dan seterusnya. Gambaran

struktur terpenting sebuah atom dalam menentukan sifat kimianya adalah jumlah elektron pada lapisan luarnya. Suatu bahan yang elektron lapisan luarnya penuh tidak akan terjadi reaksi kimia. Karena atom - atom berusaha untuk mencapai keadaan stabilitas maksimum, sebuah atom akan selalu mencoba untuk melengkapi lapisan luarnya dengan :

1. Menambah atau mengurangi elektron untuk mengisi maupun mengosongkan lapisan luarnya.
2. Membagi elektron-elektronnya dengan cara bergabung bersama atom yang lain dalam rangka melengkapi lapisan luarnya (Droge, 2002)

Atom sering kali melengkapi lapisan luarnya dengan cara membagi elektron - elektron bersama atom yang lain. Dengan membagi elektron, atom-atom tersebut bergabung bersama dan mencapai kondisi stabilitas maksimum untuk membentuk molekul. Oleh karena radikal bebas sangat reaktif, maka mempunyai spesifitas kimia yang rendah sehingga dapat bereaksi dengan berbagai molekul lain, seperti protein, lemak, karbohidrat, dan DNA.

Dalam rangka mendapatkan stabilitas kimia, radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan bahan sekitarnya. Radikal bebas akan menyerang molekul stabil yang terdekat dan mengambil elektron, zat yang terambil elektronnya akan menjadi radikal bebas juga sehingga akan memulai suatu reaksi berantai, yang akhirnya terjadi kerusakan sel tersebut (Proctor dan Reynolds, 1984). Perbedaan struktur molekul radikal bebas dan struktur molekul yang stabil, dapat dilihat pada gambar 2.1 di bawah ini:



**Gambar 2.1.** Struktur Radikal Bebas Molekul stabil dan radikal bebas. Didapat dari Fouad T. Free Radical, Types, Source and Damaging Reactions. Didapat dari: [www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/antioxidant](http://www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/antioxidant).

#### 2.1.4 Tipe Radikal Bebas

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk didalamnya adalah triplet ( $3O_2$ ), tunggal (singlet/ $^1O_2$ ), anion superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidrosil ( $-OH$ ), nitrit oksida ( $NO\cdot$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), asam

hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal alkoxyl (LO $\cdot$ ), dan radikal peroksil (LO $_2$ ).

Radikal bebas yang mengandung karbon ( $CCL_3\cdot$ ) yang berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal yang mengandung hidrogen hasil dari penyerangan atom H (H $\cdot$ ). Bentuk lain adalah radikal yang mengandung sulfur yang diproduksi pada oksidasi glutation menghasilkan radikal thiyl (R-S $\cdot$ ). Radikal yang mengandung nitrogen juga ditemukan, misalnya radikal fenyl diazine.

**Tabel 2.1: Radikal bebas biologis**

Kelompok oksigen reaktif	
$O_2^{\cdot-}$	Radikal Superoksida ( <i>Superoxide radical</i> )
$\cdot OH$	Radikal hidroksil ( <i>Hydroxyl radical</i> )
$ROO\cdot$	Radikal peroksil ( <i>Peroxyl radical</i> )
$H_2O_2$	Hydrogen peroksida ( <i>Hydrogen peroxide</i> )
$^1O_2$	Oksigen tunggal ( <i>Singlet oxygen</i> )
$NO\cdot$	Nitrit oksida ( <i>Nitric oxide</i> )
$ONOO^-$	Nitrit peroksida ( <i>Peroxynitrite</i> )
HOCl	Asam hipoklor ( <i>Hypochlorous acid</i> )

Sumber: Marks, 2000

### 2.1.5 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas yang ada ditubuh manusia berasal dari 2 sumber, yaitu sumber endogen dan sumber eksogen.

## 1. Sumber endogen

### a. Autoksidasi

Merupakan produk dari proses metabolisme aerobik. Molekul yang mengalami autoksidasi berasal dari katekolamin, hemoglobin, mioglobin, sitokrom C yang tereduksi, dan thiol. Autoksidasi dari molekul di atas menghasilkan reduksi dari oksigen diradikal dan pembentukan kelompok reaktif oksigen. Superoksida merupakan bentukan awal radikal. Ion ferrous (Fe II) juga dapat kehilangan elektronnya melalui oksigen untuk membuat superoksida dan Fe III melalui proses autoksidasi.

### b. Oksidasi enzimatik

Beberapa jenis sistem enzim mampu menghasilkan radikal bebas dalam jumlah yang cukup bermakna, meliputi *xanthine oxidase (activated in ischemia-reperfusion)*, *prostaglandin synthase*, *lipoxygenase*, *aldehyde oxidase*, dan *amino acid oxidase*. Enzim *myeloperoxidase* hasil aktivasi netrofil, memanfaatkan hidrogen peroksida untuk oksidasi ion klorida menjadi suatu oksidan yang kuat asam hipoklor.

### c. Respiratory burst

Merupakan terminologi yang digunakan untuk menggambarkan proses dimana sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah yang besar selama fagositosis. Lebih kurang 70-90 % penggunaan oksigen tersebut dapat diperhitungkan dalam produksi superoksida. Fagositik sel tersebut memiliki sistem membran bound flavoprotein cytochrome-b-245

NADPH oxidase. Enzim membran sel seperti NADPH-oxidase keluar dalam bentuk inaktif.

Paparan terhadap bakteri yang diselimuti imunoglobulin, kompleks imun, komplemen 5a, atau leukotrien dapat mengaktifkan enzim NADPH-oxidase. Aktifasi tersebut mengawali respiratory burst pada membran sel untuk memproduksi superoksida. Kemudian  $H_2O_2$  dibentuk dari superoksida dengan cara dismutasi bersama generasi berikutnya dari OH dan HOCl oleh bakteri.

## 2. Sumber eksogen

### a. Obat - obatan

Beberapa macam obat dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam bentuk peningkatan tekanan oksigen. Bahan-bahan tersebut bereaksi bersama hiperoksia dapat mempercepat tingkat kerusakan. Termasuk didalamnya antibiotika kelompok quinoid atau berikatan logam untuk aktifitasnya (nitrofurantoin), obat kanker seperti bleomycin, anthracyclines (adriamycin), dan methotrexate, yang memiliki aktifitas pro-oksidan. Selain itu, radikal juga berasal dari fenilbutason, beberapa asam fenamat dan komponen aminosalisilat dari sulfasalasin dapat menginaktivasi protease, dan penggunaan asam askorbat dalam jumlah banyak mempercepat peroksidasi lemak.

### b. Radiasi

Radioterapi memungkinkan terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radiasi elektromagnetik (sinar X, sinar

gamma) dan radiasi partikel (partikel elektron, photon, neutron, alfa, dan beta) menghasilkan radikal primer dengan cara memindahkan energinya pada komponen seluler seperti air. Radikal primer tersebut dapat mengalami reaksi sekunder bersama oksigen yang terurai atau bersama cairan seluler.

c. Asap rokok

Oksidan dalam rokok mempunyai jumlah yang cukup untuk memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (in vivo) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap tekanan oksidan.

Diperkirakan bahwa tiap hisapan rokok mempunyai bahan oksidan dalam jumlah yang sangat besar, meliputi aldehida, epoksida, peroksida, dan radikal bebas lain yang mungkin cukup berumur panjang dan bertahan hingga menyebabkan kerusakan alveoli. Bahan lain seperti nitrit oksida, radikal peroksil, dan radikal yang mengandung karbon ada dalam fase gas. Juga mengandung radikal lain yang relatif stabil dalam fase tar.

Contoh radikal dalam fase tar meliputi *semiquinone moieties* dihasilkan dari bermacam-macam *quinone* dan *hydroquinone*. Perdarahan kecil berulang merupakan penyebab yang sangat mungkin dari desposisi besi dalam jaringan paru perokok. Besi dalam bentuk tersebut menyebabkan pembentukan radikal hidroksil yang mematikan dari hidrogen peroksida. Juga ditemukan bahwa

perokok mengalami peningkatan netrofil dalam saluran napas bawah yang mempunyai kontribusi pada peningkatan lebih lanjut konsentrasi radikal bebas.

### 2.1.6 Reaksi Perusakan Oleh Radikal Bebas

Definisi tekanan oksidatif (*oxidative stress*) adalah suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, asam nukleat seluler, sehingga terjadi kerusakan lokal dan disfungsi organ tertentu. Lemak merupakan biomolekul yang rentan terhadap serangan radikal bebas.

#### 1. Peroksidasi Lipid

Peroksidasi lipid adalah reaksi oksidasi radikal bebas dengan lipid membran sel jaringan tubuh. Membran sel terdiri dari 2 lapisan yang kaya akan sumber asam lemak tak jenuh (Poly Unsaturated Fatty Acid/PUFA). Pada lapisan luar membran sel bersifat hidrofilik sedangkan lapisan dalam bersifat hidrofobik. Dibagian dalam membran sel terdapat protein yang merupakan bagian paling penting dari sel. Protein tersebut berfungsi mengontrol pergerakan ion atau berfungsi sebagai reseptor sel.

Radikal bebas dapat mengambil elektron dari lipid yang berada di membran sel. Reaksi ini disebut peroksidasi lipid. Sasaran ROS adalah karbon – karbon dengan ikatan ganda dari molekul PUFA. Adanya ikatan ganda ini menyebabkan ikatan antara karbon dan hidrogen menjadi lemah dan mudah terdisosiasi menjadi radikal bebas. Radikal bebas akan mengambil satu elektron

dari hidrogen yang berikatan ganda dengan karbon. Molekul yang terbentuk kemudian bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil. Radikal peroksil kemudian mengambil satu elektron dari molekul lipid yang lain, begitulah seterusnya. (Inayati,2004)

Senyawa yang dihasilkan oleh peroksidasi lipid disebut dengan Malondialdehid (MDA). Monitoring kadar MDA pada substansi biologis tubuh sering digunakan sebagai indikator penting adanya kerusakan seluler dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Tinggi rendahnya kadar MDA sangat bergantung pada status antioksidan dalam tubuh seseorang. Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktifitas enzim antioksidan dan tingginya kadar MDA dalam plasma. (Winarsi,2007)

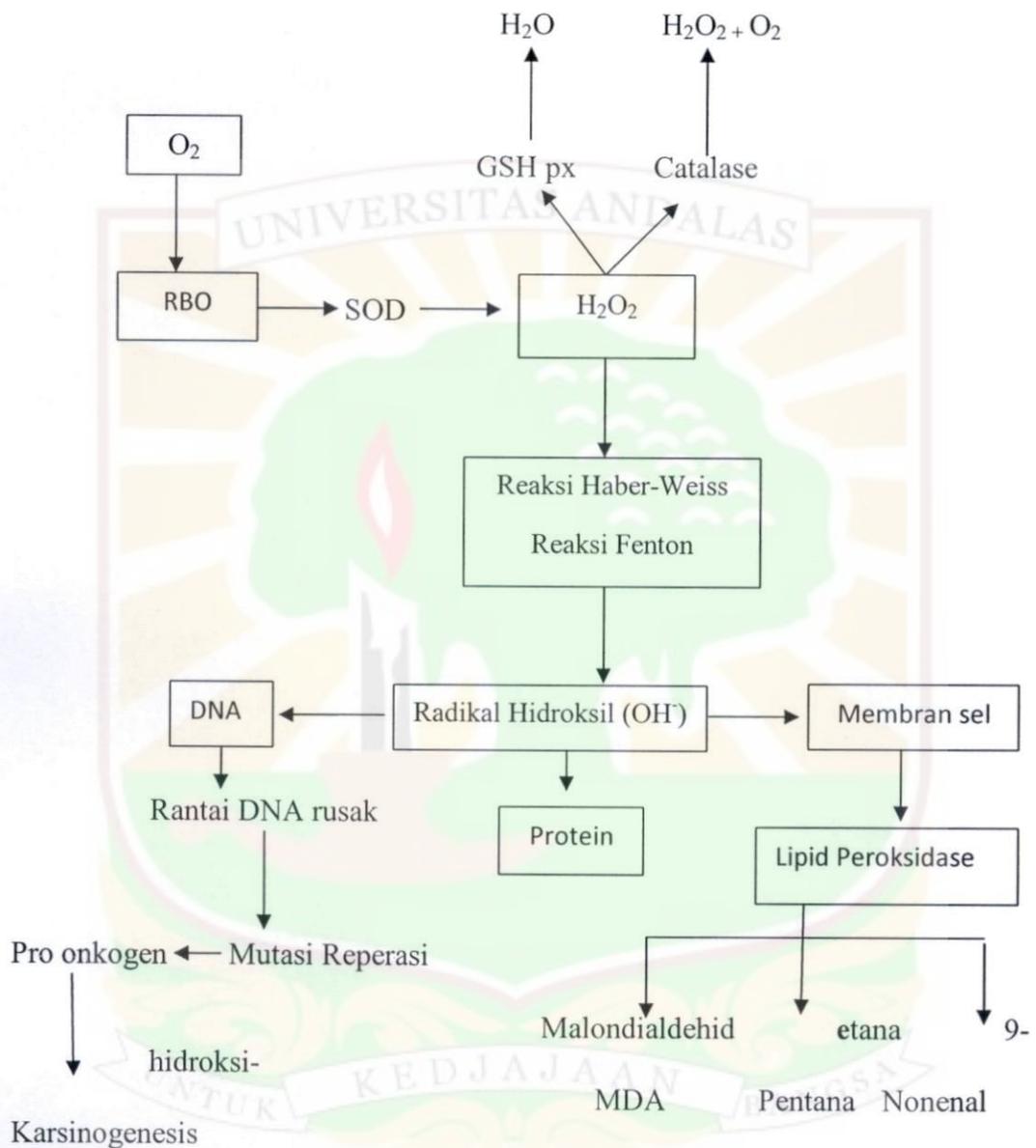
Tingginya produk MDA tubuh merupakan bukti rendahnya status antioksidan tubuh, sehingga tidak dapat mencegah reaktivitas senyawa radikal bebas dan membuktikan kerentanan komponen membran sel terhadap reaksi oksidasi. (Winarsi,2007)

Pada dasarnya oksidasi asam lemak merupakan reaksi rantai lipid yang dirangsang radikal bebas, proses terbentuknya sebagai berikut:

- a. Reaksi Bebas Oksigen (RBO) diproduksi sebagai hasil metabolisme  $O_2$  yang dapat membentuk RBO adalah polimorfonuklear, monosit dan makrofah.
- b. Radikal bebas oksigen bereaksi dengan SOD dan ion – ion  $Cu^{+2}$  membentuk  $H_2O_2$  yang merupakan oksidan kuat yang dapat bereaksi dengan berbagai senyawa, banyak diproduksi di mitokondria dan mikrosom.

- c. Sebagai system pertahanan tubuh maka  $H_2O_2$  oleh diubah oleh katalase menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  sedangkan  $H_2O_2$  oleh enzim glutation peroksidase dapat diubah menjadi  $H_2O$ .
- d. Radikal bebas dan  $H_2O_2$  pada keadaan stress oksidatif akan berlebihan sehingga enzim proteksi tubuh seperti katalase dan glutation peroksidase tidak dapat lagi menetralkan semua RBO yang terbentuk.
- e. Jika  $H_2O_2$  bereaksi dengan  $Fe^{+2}$  dan  $Cu^{+2}$  maka terbentuklah radikal hidroksil melalui reaksi Fenton dan Hasber-weiss. Radikal hidroksil adalah radikal bebas yang sangat reaktif dan dapat merusak tiga jenis senyawa penting yang mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak tak jenuh sebagai penyusun membrane sel, DNA dan protein.
- f. Selanjutnya reaksi antara radikal bebas hidroksil dengan senyawa penyusun membran sel tadi akan membentuk reaksi rantai peroksidasi lipid yang selanjutnya rantai asam lemak terputus oleh senyawa-senyawa aldehyd, yang memiliki daya rusak tinggi terhadap sel – sel tubuh lainnya.
- g. MDA merupakan salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid yang terbentuk akibat degradasi radikal bebas hidroksil terhadap asam lemak tak jenuh. (Arsyad, 2000). Peroksidasi lipid adalah reaksi oksidasi radikal bebas dengan lipid membran sel jaringan tubuh atau asam lemak tidak jenuh (*Polyunsaturated fatty acid*). MDA dapat ditemukan pada banyak substansi biologis, misalnya pada serum, plasma, jaringan dan urine. (Inayanti, 2004).

Tahap pembentukan radikal bebas menurut reaksi Haber Weis Fenton dapat dilihat pada gambar 2.2, di bawah ini:



**Gambar 2.2 Reaksi Haber Weis, Fenton Pada Tahap Pembentukan MDA (Marks, 2000)**

Antioksidan dapat menetralkan dengan cara bereaksi dengan radikal peroksil. Vitamin C (asam askorbat) dapat mereduksi radikal peroksil menjadi

lipid yang teroksidasi. Lipid teroksidasi ini kemudian dikonversi oleh glutathione peroksidase menjadi lipid alkohol yang tidak berbahaya.

## 2. Kerusakan Protein

Adanya peroksidasi lipid dapat mengubah struktur dan fungsi protein. Perubahan struktur dan fungsi ini menyebabkan hilangnya regulasi intraseluler  $\text{Ca}^{2+}$  dengan  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. Hilangnya regulasi ini dapat menyebabkan kematian sel (Thomas&Reed, 1989)

## 3. Kerusakan DNA

Kromatin dapat melindungi DNA dari proses oksidasi oleh radikal bebas. Tetapi jumlah radikal bebas yang melebihi pertahanan ini dapat menyebabkan mutasi gen. adanya paparan yang lama dari stress oksidatif dapat menimbulkan karsinogenesis.

Kemampuan radikal bebas untuk menyebabkan mutasi disebabkan oleh interaksi langsung radikal hidroksil (OH) dengan semua komponen molekul DNA. Selanjutnya radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan genetik. Kerusakan genetik yang disebabkan oleh radikal bebas dapat berupa modifikasi rantai, pertukaran protein DNA atau penyusunan kembali kromosom.

### 2.1.7 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 mampu mengakibatkan perusakan intraseluler, dan memperkuat kemampuan radikal bebas dalam menginduksi kerusakan sel (Halliwell *and* Gutteridge, 2004).

### 2.1.8 Peran Radikal Bebas Pada Metabolisme Fisologi Di Mikrozon Hepar

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

Tahapan oksidasi tersebut adalah :

1. 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, glutathion peroksidase, atau katalase).

Beberapa ahli memperkirakan hasil radikal bebas metabolik tidak langsung merusak sel, tetapi melalui mekanisme tidak langsung yaitu aktivitas fosfolipase A<sub>2</sub>, akumulasi liso fosfatide, aktivasi enzim reparasi "poli ADP ribose polimerase", yang selanjutnya diikuti kerusakan oksidatif dari DNA. Jadi dapat disimpulkan bahwa terbentuknya radikal bebas berlebihan pada proses fisiologi tergantung adanya induser bahan kimia lingkungan (Coreia, 1995).

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

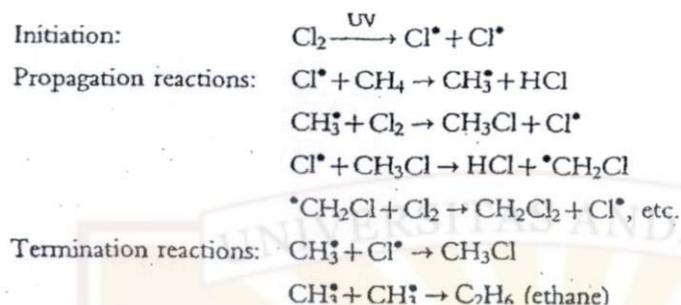
Karbon tetraklorida (CCL<sub>4</sub>) merupakan cairan tidak berwarna, yang digunakan dalam industri sebagai "*degreases*" dan pelarut organik. Karbon tetraklorida banyak digunakan sebagai bahan pendingin (*refrigerator*) lemari es dan bahan profelan untuk kaleng aerosol. Karbon tetraklorida juga digunakan 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 hydrocarbon* 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 aktifitas separuhnya. Pada rentang tahun 1980-1990 diperkirakan aktifitas 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 cukup untuk menyebabkan *hemolytic fission*

pada ikatan kovalen molekul berhalogen. Reaksi kemudian berlanjut sebagai reaksi rantai radikal, yaitu seperti gambar 2.3 berikut ini:



**Gambar 2.3 Sintesis CCl<sub>4</sub> (Halliwell and Gutteridge, 2004)**

CH<sub>4</sub> berturut – turut diubah menjadi thloromethane (CH<sub>3</sub>Cl, metilklorida) diklorometana (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Trichloroniethane CHCl<sub>3</sub> (kloroform), dan tetrachloromethane (karbon tetraklorida)

CHCl<sub>3</sub> 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 CCl<sub>4</sub>

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 BB (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, hati, ginjal dan peredaran darah (Halliwell *and* Gutteridge, 2004).

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

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

Di retikulum endoplasma hati CCL<sub>4</sub> dimetabolisme oleh sitokrom P450 CYP3A1. CCL<sub>4</sub> 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> yang jauh lebih reaktif dari pada CCL<sub>3</sub><sup>o</sup>. CCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 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> berikatan kovalen dengan makromolekul. CCL<sub>3</sub>O<sub>2</sub> juga

menyebabkan inisiasi lipid peroksidase oleh  $H^*$  absraksi, dan peningkatan CYP24A1 dan kerusakan mekanisme  $Ca^{2+}$  sequestration, sehingga terjadi peningkatan  $Ca^{2+}$  intraseluler. Peningkatan  $Ca^{2+}$  intraseluler meningkatkan kerusakan protein, DNA, dan aktivasi phospholipase. selanjutnya terjadi peningkatan cytotoxic aldehyd dan kerusakan sel (Halliwell and Gutteridge, 2004).

CCL<sub>4</sub> mengaktifasi sel kuffer. Kerusakan (nekrosis) hepatosit juga memicu aktifasi sel kuffer. Sel kuffer yang teraktifasi, dapat melepaskan berbagai mediator pro inflamasi yang dapat memperberat kerusakan hepatosit. Selain itu sel kuffer juga dapat melepaskan ROS yang juga memperberat kerusakan hepatosit (EHC, 1999; Webber et al, 2003)

Tingkat racun CCL<sub>4</sub> yang diberikan kepada hewan menghasilkan akumulasi lemak di hati akibat penyumbatan dalam sintesis lipoprotein yang membawa trigliserida dari organ ini. Struktur retikulum endoplasma sel hati menjadi terdistorsi, sintesis protein hati melambat, dan aktivitas enzim yang terletak di retikulum endoplasma, seperti halnya kemampuan untuk retikulum endoplasma menyerap ion  $Ca^{2+}$  dengan  $Ca^{2+}$  ATPase. Oleh karena itu terjadi peningkatan pada konsentrasi  $Ca^{2+}$  intraseluler. Membran nuclear dihancurkan dan akhirnya terjadi nekrosis sel hati di daerah pusat dari lobus (Halliwell and Gutteridge, 2004).

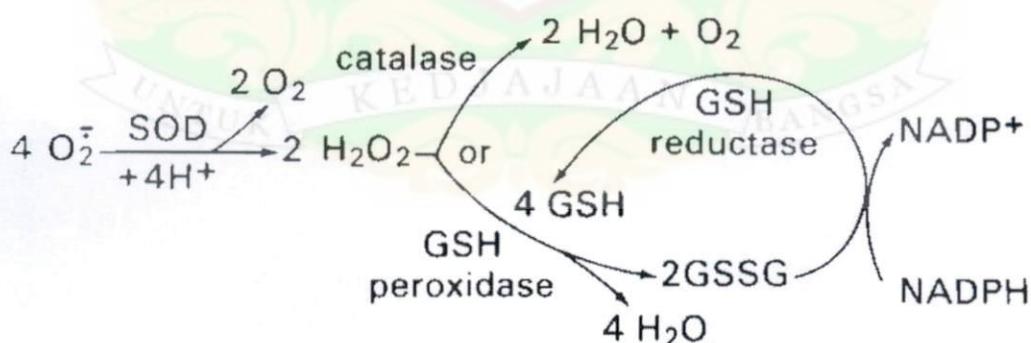
Pemberian berbagai antioksidan, (termasuk vitamin B, prometazin, propil galat dan GSH) atau inhibitor P450, menyebabkan penurunan toksisitas CCL<sub>4</sub>

secara paralel dengan penurunan peroksidasi lipid pada hewan. Hewan yang kekurangan vitamin E lebih rentan terhadap CCL<sub>4</sub>.

### 2.3 Antioksidan

Dalam pengertian kimia antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor), sedangkan dalam pengertian biologis antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, seperti enzim dan protein pengikat logam. Antioksidan merupakan suatu perlindungan tubuh terhadap aktifitas radikal bebas yang dihasilkan secara endogen maupun eksogen yang dimiliki oleh setiap sel normal. (Kurniasih 2002).

Senyawanya kecil namun mampu menginaktivasi/menangkap/memutus rantai radikal bebas dan memperbaiki kerusakan oleh radikal bebas. (Winarsi,2007) Sifat reaktif yang tersebar dari sistem pembentukan radikal dalam sel menyebabkan evolusi mekanisme pertahanan terhadap efek perusakan suatu bahan teroksidasi kuat. Gambar 2.4 dibawah ini menunjukkan aktifitas enzim intraseluler tersebut.



Gambar 2.4 Enzim – enzim pertahanan antioksidan (Sugiyanta, 2007)

SOD (superoksida dismutase dan katalase) mengkatalisasi dismutasi dari superoksida dan hidrogen peroksida. Glutation peroksidase mereduksi peroksida hidrogen dan organik menjadi air dan alkohol. GSH *S-transferase* melakukan pemindahan residu glutation menjadi metabolic elektrofilik reaktif dari *xenobiotik*.

Antioksidan dapat berupa enzim seperti, Katalase, Super Oksida Dismutase (SOD) dan Glutation Peroksidase. Antioksidan Enzimatis merupakan system pertahanan primer terhadap kondisi stress oksidatif. Enzim – enzim tersebut merupakan metaloenzim yang aktivitasnya sangat tergantung pada adanya ion logam. Enzim Glutation peroksidase bergantung pada selenium.

Pada kondisi normal terbentuknya hidrogen peroksida tidak begitu berbahaya, namun adanya logam transisi akan membentuk radikal hidroksil yang sangat berbahaya melalui reaksi Haber Weiss dan Fenton. Hal ini dapat menghancurkan struktur sel. Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal baru. (Winarsi, 2007).

Pada kondisi tidak stress terdapat keseimbangan antara proses pembentukan dan pemusnahan senyawa oksigen reaktif. Sementara pada kondisi stress pembentukan senyawa oksigen reaktif lebih tinggi dibandingkan dengan pemusnahannya. Akibatnya sistem pertahanan tubuh terpacu untuk bekerja lebih keras untuk memusnahkan senyawa reaktif oksigen. Salah satu sistem pertahanan tubuh itu adalah system antioksidan enzimatis dan Non enzimatis yang bekerja menekan senyawa oksigen reaktif yang berlebihan. (Winarsi, 2007)

Disamping antioksidan yang bersifat enzimatis, ada juga antioksidan non enzimatis yang dapat berupa senyawa nutrisi maupun non-nutrisi (disebut juga

dengan antioksidan sekunder karena dapat diperoleh dari asupan dari luar tubuh) seperti vitamin A, C, E dan  $\beta$ -Karotein. Senyawa ini berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai dan berperan menginduksi antioksidan tubuh, seperti kandungan vitamin C dan antosianin dalam tumbuhan Rosella. Rosella telah banyak dilaporkan peranannya sebagai antioksidan,

**Tabel 2.2 Klasifikasi Antioksidan**

Antioksidan	Peranan	Ciri-ciri
Superoksida Dismutase (SOD)	Mengubah $O_2$ menjadi $H_2O_2$	Mengandung Mangan (MnSOD), tembaga dan seng (CuZnSOD)
Katalase	Mengubah $H_2O_2$ menjadi $H_2O$	Hemoprotein berbentuk tetramer
Glutathione Peroksidase	Mengubah $H_2O_2$ dan Lipid Peroksidase	Selenoprotein terutama berada di sitosol dan mitokondria
Alpha Tokoferol	Memutus peroksidase lipid <i>Scavenge</i> lipid peroksidase	Vitamin yang larut dalam lemak
Beta Karoten	<i>Scavenge</i> $O_2$ bereaksi langsung dengan peroksil	Vitamin yang larut dalam lemak
Asam Askorbat	<i>Scavenge</i> secara langsung $OH$ , $O_2^-$ Menetralkan oksidan dari stimulasi neutrofil Berperan dalam regenerasi Vit.E	Vitamin yang larut dalam air

Dikutip dari: Fouad T. Antioxidant System. ([www.thedoctorslounge.net](http://www.thedoctorslounge.net))

### 2.3.1 Metabolisme antioksidan dalam hati

Hati adalah organ utama untuk membersihkan zat - zat toksin berasal dari bakteri maupun zat kimia seperti indotoksin, oksidan, dan pro-oksidan. Untuk melakukan detoksikasi dari bahan berbahaya tersebut, liver mengandung

antioksidan dengan berat molekul rendah dan enzim yang merusak kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species*. ROS) yaitu glutathion tereduksi (GSH), vitamin C, vitamin E, superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, dan katalase.

## 2.4 Enzim Glutathion Peroksidase (GSH-px)

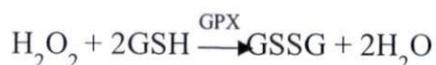
### 2.4.1 Fisiologi

Glutathion peroksidase (GSH-px) adalah protein dengan bentuk tetramer. Mempunyai berat molekul sebesar 85.000 D. Enzim ini mengandung 4 atom selenium yang terikat sebagai selenocysteine. Struktur enzim ini dapat dilihat pada gambar 2.5 di bawah ini :



**Gambar 2.5 Struktur Glutathion peroksidase. Didapat dari Anonim. Glutathion peroksidase. 2000. Didapat dari: [www.wikipedia/thefreeencyclopedia](http://www.wikipedia/thefreeencyclopedia).**

Enzim glutathion peroksidase membantu mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dengan cara mengkatalisa berbagai hidroperoksida. Glutathion peroksidase mereduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan glutathion disulfide (GSSG) dengan bantuan glutathion tereduksi. Reaksi enzim tersebut seperti di bawah ini:



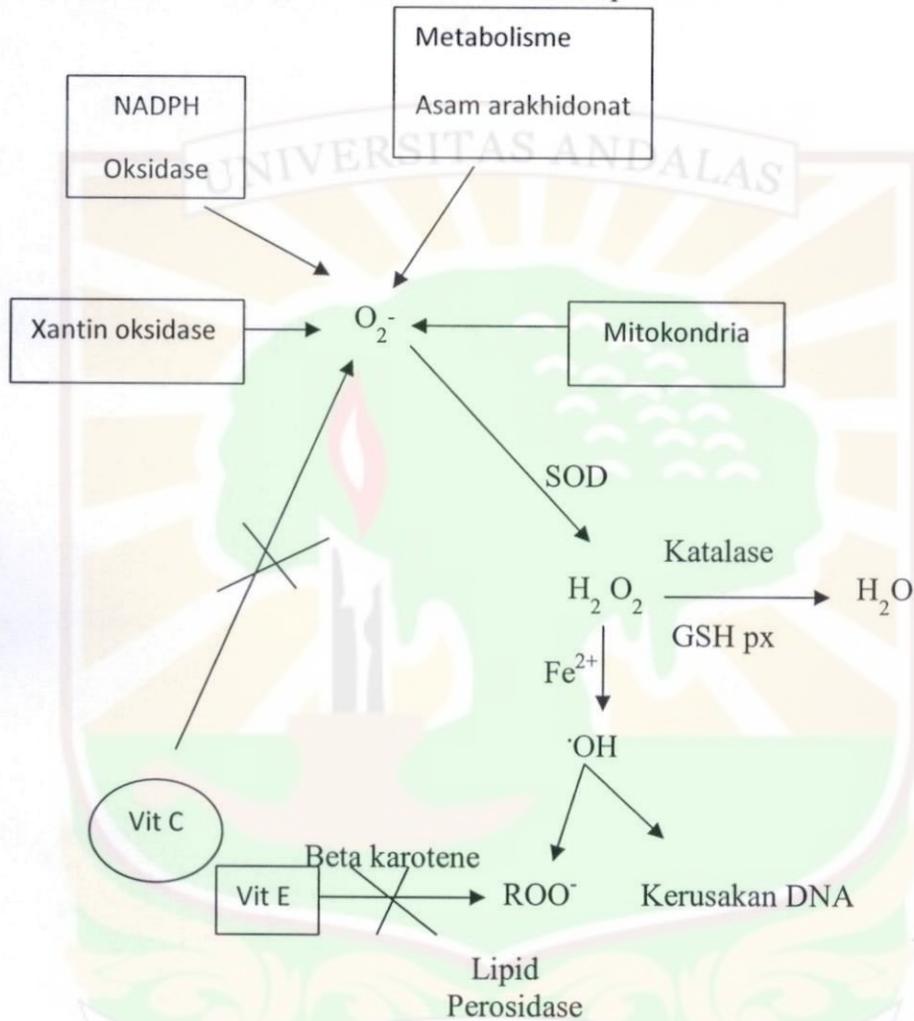
### 2.4.2 Glutation Peroksidase Dalam Tubuh

Dalam menghadapi serangan terhadap radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme perlindungan melalui sistem antioksidan tubuh, yang terdiri dari glutathion peroksidase (GSH-px), enzim superoksid dismutase (SOD), katalase dan antioksidan ekstraseluler yang kebanyakan berasal dari makanan, seperti vitamin E, vitamin C, dan beta karoten. Kekurangan salah satu komponen tersebut dapat menyebabkan terjadi penurunan status antioksidan secara menyeluruh pada seseorang, sehingga perlindungan tubuh terhadap serangan radikal bebas akan menurun (Chevion *et al*, 2003).

Status antioksidan dalam tubuh dapat diamati dalam berbagai parameter. Seperti aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (Winarsi dkk, 2003), aktifitas malondialdehida (MDA) (Winarsi, 2004), vitamin C, vitamin E, vitamin A plasma, dan lain - lain. Potensi satu jenis antioksidan perlu didukung oleh jenis antioksidan yang lain. Masing-masing jenis antioksidan memiliki sifat dan cara kerja yang mungkin tidak sama, namun keduanya memiliki target yang tidak berbeda, yaitu menekan atau menghambat reaktivitas radikal bebas (Damiani *et al*, 2008).

Gambar 2.6 berikut memperlihatkan sumber radikal bebas dan tempat kerja dari berbagai antioksidan. Radikal superoksida ( $O_2^-$ ) merupakan bentuk yang paling reaktif yang paling banyak dihasilkan oleh berbagai mekanisme di dalam tubuh antara lain, mitokondria, sistem enzim NADPH oksidase, reaksi dari xantine oksidase dan metabolisme asam arakidonat. Radikal superoksida kemudian dapat langsung di "makan" oleh antioksidan vitamin E atau diubah

menjadi  $H_2O_2$  yang kemudian diubah lagi menjadi air oleh enzim glutathione peroksidase.  $H_2O_2$  yang terbentuk juga dapat diubah menjadi radikal hidroksil ( $\cdot OH$ ). Jika tidak dinetralkan,  $\cdot OH$  akan merusak lipid dan DNA.



**Gambar 2.6 . Sumber radikal bebas dan tempat kerja antioksidan Fouad T. Antioxidant system [www. thedoctorslounge.net/medlounge/articles/](http://www.thedoctorslounge.net/medlounge/articles/)**

Glutation peroksidase sebagai enzim antioksidan bekerja sebagai peredam (*quenching*) radikal bebas (Sen *et al*, 2010). Glutation peroksidase juga berperan dalam metabolisme xenobiotik yang ditemukan dalam aktifitas milimolar dalam sel. Dalam hepar dan sel darah merah terdapat glutathione peroksidase dengan konsentrasi tinggi, sedangkan jantung, ginjal, paru - paru, adrenal, lambung, dan

jaringan adipose mengandung aktifitas glutathion peroksidase dalam aktifitas sedang. Glutathion peroksidase aktifitas rendah sering ditemukan dalam otak, otot, testis, dan lensa mata.

Aktifitas GSH di dalam darah berada dalam rentang 0,5 – 8 mM/l dengan konsentrasi tertinggi di dalam hati, yang merupakan organ terpenting dalam detoksifikasi. Penelitian menunjukkan bahwa semakin lanjut usia, aktifitas GSH semakin menurun. Aktifitas GSH pada usia 20 – 40 tahun, 20% - 40% lebih tinggi pada usia 60 - 80 tahun (Asikin, 2001). Stres oksidatif dapat menyebabkan depresi GSH. Stres oksidatif dapat berupa radiasi sinar ultra violet dan radiasi yang lain, infeksi virus, toksin limbah kimia dan logam berat. Glutathion peroksidase adalah enzim intraseluler yang terdispersi dalam sitoplasma, namun aktivitasnya juga ditemukan dalam mitokondria. Glutathion peroksidase ekstraseluler (secara genetik berbeda dari bentuk intraseluler) terdeteksi dalam berbagai jaringan.

Selenium (Se) adalah mineral yang penting untuk sintesis protein dan aktivitas enzim glutathion peroksidase. Selenium terdapat dalam glutathion peroksidase sel darah merah. Selenium tubuh berasal dari makanan dan minuman. Daging dan makanan laut mempunyai kandungan selenium yang tinggi. Kandungan total selenium dalam tubuh bervariasi antara 3mg sampai 20,3 mg. Distribusi selenium pada tubuh paling banyak terdapat di hepar, ginjal, otot dan plasma. Absorpsi selenium terjadi di duodenum dengan besar penyerapan 50% sampai 100% dan diekskresikan melalui urine, feses dan pernafasan. Kebutuhan selenium (berdasarkan RDA) untuk anak sebesar 20 mcg/hari sedangkan untuk dewasa sebesar 55 mcg/hari.

Aktivitas glutathion peroksidase memerlukan glutathion sebagai kosubstrat dan enzim glutathion reduktase untuk merestorasi glutathion teroksidasi menjadi bentuk tereduksi. Glutathion peroksidase sebagai enzim antioksidan bekerja sebagai peredam (*quenching*) radikal bebas (Sen *et al*, 2010). Enzim glutathion peroksidase yang ditemukan dalam dalam sitoplasma tersebut merupakan tetramer, dan mengandung selenosistein pada sisi aktifnya. Enzim ini bersifat nukleofilik, yang sangat mudah terionisasi dan mengakibatkan terlepasnya proton. Aktivitas enzim glutathion peroksidase juga ditemukan dalam mitokondria , plasma, dan saluran pencernaan.

Dalam sitoplasma, enzim glutathion peroksidase bekerja pada membran fosfolipid yang teroksidasi sehingga dikenal juga sebagai *hydroperoxide glutathione peroxidase*. Enzim glutathion peroksidase juga dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol, lipoprotein, dan fosfolipid yang teroksidasi dalam membran sel. Aktivitas enzim tersebut dapat juga diinduksi oleh keadaan hiperoksia (Asikin, 2001).

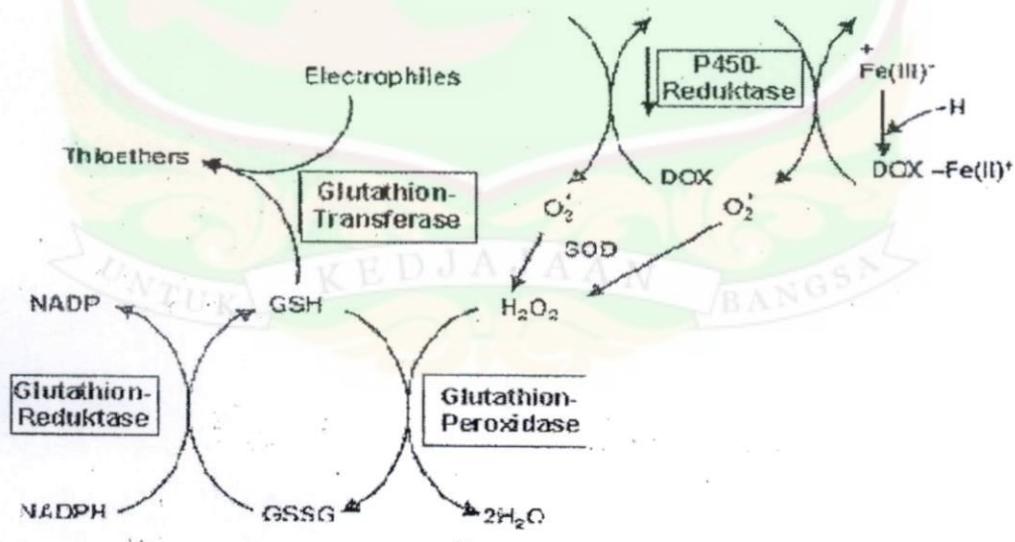
Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif, aktivitas glutathion peroksidase rendah karena terjadi defisiensi selenium. Aktivitas enzim ini juga dapat diinduksi oleh antioksidan sekunder isoflavon (Rohrdanz *et al* 2002.,Chen *et al*,2002).

#### **2.4.3 Biokimia dan Metabolisme Glutathion**

Sintesis GSH meliputi dua tahap, yang merupakan reaksi enzimatik dengan menggunakan ATP. Pertama, cystein dan glutamine bergabung, oleh

enzim *gamma-glutamyl cysteinyl syntetase*. Kedua, GSH *syntetase* mengabungkan *gamma-glutamyl cysteinyl* dengan gysin membentuk GSH. Ketersediaan *cystein* merupakan faktor penentu dalam mensintesis GSH. Kurang gizi, malnutrisi energy protein atau diet rendah asam amino menyebabkan terganggunya sintesis GSH (Monk.1994).

Recyle GSH dikatalisir oleh *glutathione disulfide reductase*, dimana menggunakan NADPH untuk mengubah GSSD 2GSH. GSH digunakan kofaktor (1) enzim peroksida, untuk mendetoksifikasi peroksida dari serangan radikal oksigen pada biologi molekuler;(2) transhydrogenase, untuk mengurangi oksidasi pada DNA, protein, dan biomolekuler yang lain; dan (3) glutathione S-transferase (GST) untuk menghubungkan GSH dengan substansi endogen dan substansi eksogen. Metabolisme glutation dapat dilihat pada gambar 2.7 berikut ini:



Gambar 2. 7. Metabolisme Glutation Dalam Tubuh (Sugiyanta, 2007)

Untuk mempertahankan produksi GSH optimal tubuh harus mempertahankan level optimal dari asam amino serta kofaktor yang membantu glutathione melakukan pekerjaannya seperti selenium, seng, vitamin c dan vitamin B2. Selenium merupakan komponen penting dari enzim glutathione peroksidase.

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

### 2.5.1. Klasifikasi

Menurut Van Steens (2002), dalam Shalilah (2008), klasifikasi rosella sebagai berikut:

Nama Umum :

Indonesia : Rosella, perambos, gamet walanda (Sunda) kasturi roriha (Ternate), rambos hijau (Jateng), asam jarot (Padang)

India Barat : Jamaican sorrel

Afrika Utara : karkade

Klasifikasi tanaman rosella adalah :

Kingdom : Plantae (tumbuhan)

Subkingdom : Tracheaobionta (berpembuluh)

Superdivisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)

Divisio : Magnoliophyta (berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua)

Familia : Malvaceae

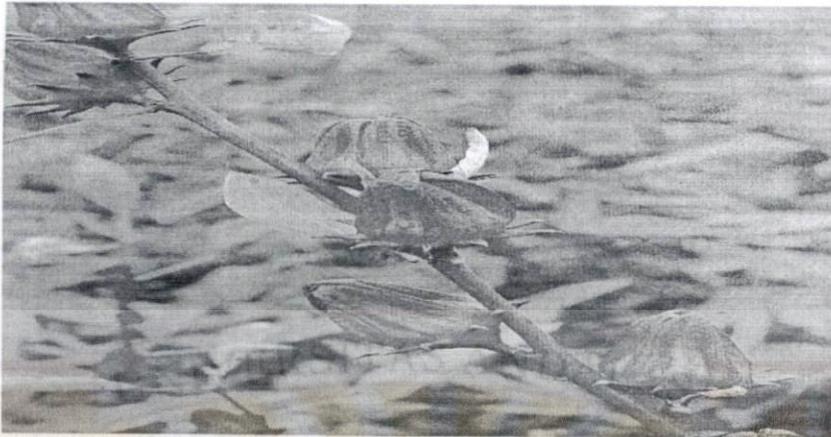
Genus : Hibiscus L.

Spesies : Hibiscus sabdariffa L.

### 2.5.2. Morfologi

Tanaman rosella merupakan herbal 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).



**Gambar 2.8. Bunga Rosella (Mardiyah et al, 2009)**

Mahkota bunga berbentuk corong terdiri dari 5 helai, 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).

### 2.5.3. Syarat Tumbuh

#### 1. Tanah

Tanaman rosella paling cocok tumbuh pada tanah yang subur dan gembur. Rosella tidak cocok ditanam di tanah salin atau berkadar garam tinggi. Kemasaman tanah (pH) optimum adalah 5 - 7. Apabila ditanam pada polibag yang berukuran sedang (diameter 30 cm), pertumbuhan tanaman

rosella menjadi tidak optimal. Tinggi tanaman kurang dari 1 meter. Akibatnya produksi bunga menjadi lebih rendah

## 2. Suhu

Tanaman rosella tumbuh optimal di daerah dengan ketinggian 600 meter di atas permukaan laut. Rosella bisa tumbuh pada daerah tropis dan sub tropis dengan suhu rata – rata 24 - 32<sup>0</sup>C.

## 3. Air

Jika curah hujan tidak mencukupi dapat diatasi dengan pengairan yang baik. Periode kering dibutuhkan rosella untuk pembuangan dan produksi biji. Sedangkan hujan atau kelembaban yang tinggi selama masa panen pengeringan dapat menurunkan kualitas kelopak bunga.

### 2.5.4. Kandungan Kimia

Kandungan penting yang terdapat pada kelopak bunga rosella adalah pigmen antosianin yang membentuk flavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Flavonoid rosella terdiri dari flavonols dan pigmen antosianin. Pigmen antosianin ini yang membentuk warna ungu kemerahan menarik di kelopak bunga.

Antosianin berfungsi sebagai antioksidan yang diyakini dapat menyembuhkan penyakit degeneratif. Antosianin pada rosella berada dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyanidin-3-sambubioside*, *delphinidin-3-glucose*, dan *delphinidin-3-sambubioside*. Sementara itu, flavonols terdiri dari *gossypetin*, *hibiscetine*, dan *quercetia*. Sebagai antioksidan, antosianin dapat mengurangi kerusakan oksidatif DNA, meningkatkan cadangan glutation, dan

meningkatkan ekspresi protein *glutathione S-transferase* P1 (hGSTP1) pada leukosit. hGSTP1 ditampilkan untuk mencegah kerusakan DNA dan mutagenesis (Corredor, 2007).

Zat lain yang tak kalah penting terkandung dalam rosella adalah kalsium, niasin, riboflavin dan besi yang cukup tinggi. Kandungan zat besi pada kelopak segar rosella dapat mencapai 8,98 mg/100 g, sedangkan pada daun rosella sebesar 5,4 mg/100 g. Selain itu, kelopak rosella mengandung 1,12% protein, 12% serat kasar, 21,89 mg/100 g sodium, vitamin C, dan vitamin A. Satu hal yang unik dari rosella adalah rasa masam pada kelopak rosella yang menyegarkan, karena memiliki dua komponen senyawa asam yang dominan yaitu asam sitrat dan asam malat.

Hasil studi kimia pada kelopak bunga sering rosella ditemukan aluminium, chromium, copper, besi (Arellano et al., 2004), polifenol (Liu et al., 2002; Lin et al., 2003), anthocyanidins (Lazze et al., 2003; Ojokoh et al., 2006), asam polisakarida heterogen dan komponen fenol termasuk gossypetine-3-glycoside, flavonoid (Amin dan Hamza, 2005). Karkade (bunga kering tanpa ovari) mengandung 13 % campuran asam sitrat dan asam malat, dua antosianin yaitu gosipetin (hidroksiflavon) dan hibiskin, asam askorbat 0,004-0,005%. Sterol minyak biji rosella terdiri atas 60,3 %  $\beta$ -sitosterol, 16,5 % kampasterol, 5,1% kolesterol, dan 3,2% ergosterol. Akar rosella mengandung saponin dan asam tartrat.

#### **2.5.4. Kandungan Gizi**

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 ge, 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 askorbat 6,7 mg. Selain kandungan vitamin C, rosella juga kaya akan mineral seperti kalsium, phosphor, potassium dan zat besi yang sangat penting bagi tubuh. Rosella juga mengandung vitamin B1, B2, niasin dan vitamin D.

Tubuh manusia membutuhkan 22 asam amino, dari 22 ini, 18 diantaranya terpenuhi dari bunga rosella. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rosella mengandung 24% antioksidan dan 51% antosianin. Antosianin yang menyebabkan warna merah pada tanaman ini. Antosianin merupakan pigmen alami yang memberi warna merah pada seduhan kelopak bunga rosella dan mempunyai sifat antioksidan yang kuat (Kustyawati dan Sulastri, 2008). Antosianin merupakan pigmen tanaman yang larut air. Antosianin hanya terdapat pada tanaman dengan warna terang pada setiap bagiannya mulai dari bunga, daun dan buah atau sayuran yang dapat dimakan (Gross, 2006).

### **2.5.5 Penggunaan Secara Tradisional**

Daun rosela secara tradisional digunakan untuk kosmetik dan makan, 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 sebabkan oleh flu dan rasa tidak enak di perut. Rosella digunakan untuk mengatasi bisul dan radang pada kulit, luka bakar, sariawan dan infeksi herpes zoster.

### 2.5.6. 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 orta tikus hipertensif spontan melalui jalur vaso dilatasi 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/kgBB/hari peroral selama 60 hari secara bermakna mengurangi berat badan mencit yang digemukakan, meningkatkan asupan cairan, dan menurunkan aktifitas alamin Aminotransferase (ALT)

#### 3. Antiinflamasi

Efek antiinflamasi rosella ditunjukkan oleh senyawa polifenol hasil ekstraksi rosella. Pada aktifitas 0,01 - 0,5 mg/ml, senyawa ini dapat menghambat enzim santin oksidase sampai 93% dengan  $EC_{50} = 0,742$  mg/ml. Dosis 0,5 mg/ml dapat menghambat nitran dan produksi  $PGE_2$  dan aktifitas iNOS protein pada makrofag sampai 20% pada mencit yang di induksi lipopolisakarisa (LPS).

Dosis 10 - 40 mg/kg dapat menurunkan perubahan patologi hati hewan uji. Pada mencit yang diberi LPS, polifenol secara bermakna menurunkan aktifitas alanin dan asparta aminotransferase dalam serum. Ekstrak metanol dengan aktifitas polifenol tinggi dapat menurunkan enzim lipid peroksidase dan radang pada hati dan meningkatkan aktivitas katase dan glutathion.

#### 4. Antikolesterol

Uji klinik yang melibatkan 42 orang, usia 18 - 75 tahun, aktifitas kolesterol serum 175 - 327 mg/dl menunjukkan bahwa pemberian 500 mg ekstrak air bunga rosella kering perhari selama 4 minggu dapat menurunkan aktifitas 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 di induksi dengan 2,4 dinitrofenilhidrazin (2,3-DNPH). Ekstrak secara bermakna menurunkan aktifitas enzim hati seperti alanin dan amino transferase dan mengurangi kerusakan hati. Ekstrak juga secara bermakna meniadakan efek DNPH pada protein hati, glutathion menghambat pembentukan malondialdehid pada hati.

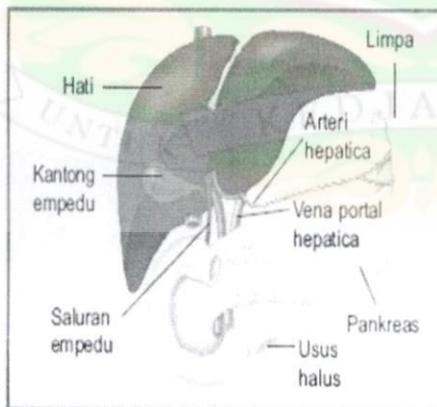
Ekstrak mahkota bunga rosella kering (kaya antosianin) dosis 100 mg/kg BB dua kali sehari terbukti mempunyai efek hepatoprotektif pada kelinci yang

sebelumnya di induksi dengan 2,4 dinitrofenilhidrazin (2,3-DNPH) secara bermakna mengurangi aktifitas produk peroksidasi lipid, meningkatkan aktifitas antioksidan seperti katalase, superoksida dismutase, glutathion peroksidase dan glutathion tereduksi pada jaringan otak tikus.

## 2.6. Hati

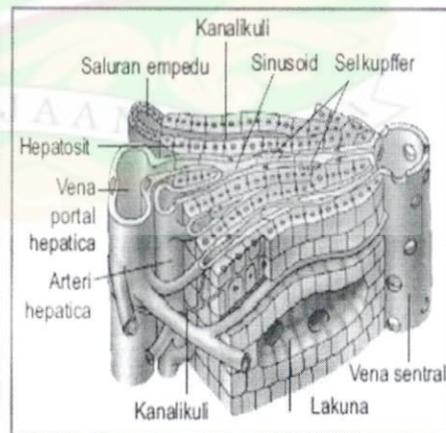
### 2.6.1 Anatomi Fisiologi Hati

Hati adalah kelenjar terbesar dalam tubuh, yang terletak dibagian teratas rongga abdomen di sebelah kanan dibawah diafragma. Hati terbagi dalam dua belahan kanan dan kiri. Permukaan atas berbentuk cembung dan terletak dibawah diafragma, permukaan bawah tidak rata dan memperlihatkan lekukan, yaitu fisura transversua. Permukaannya dilintasi pembuluh darah yang masuk keluar hati. Fisura longitudinal memisahkan belahan kanan dan kiri dipermukaan bawah, sedangkan ligamen folsiformis melakukan hal yang sama dipermukaan atas hati (Pearce, 2008). Bagian – bagian hepar dapat di lihat pada gambar 2.9:



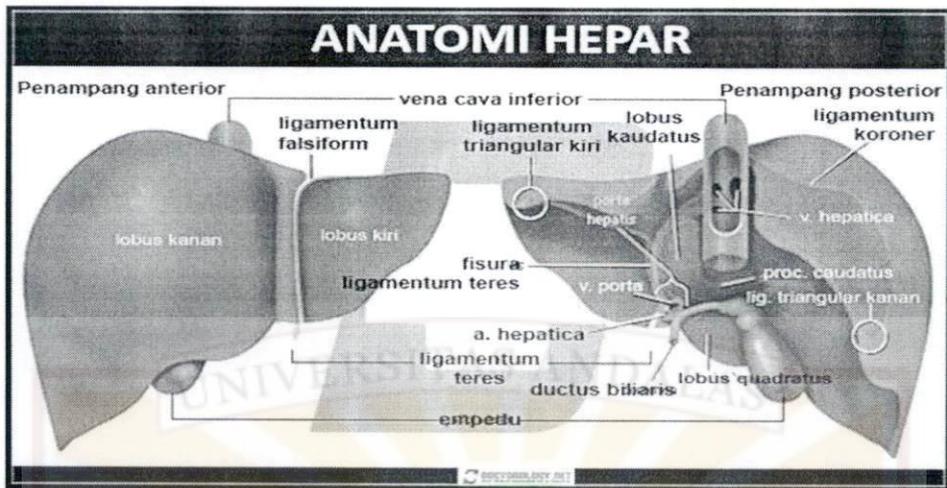
Sumber: *Biology, Glenn and Susan Toole*

Gambar 8.10  
Organ hati sebagai alat ekskresi



Sumber: *New Understanding Biology, Glenn and Susan Toole*

Gambar 8.11  
Struktur hati



**Gambar 2.9 Anatomi Hati (dikutip dari Sherwood, 2011)**

Ligamen fasliformis berjalan dari hati ke diafragma dan dinding depan abdomen. Permukaan hati diliputi oleh peritoneum viseralis, kecuali daerah pada permukaan posterior yang melekat langsung pada diafragma. Beberapa ligamentum yang merupakan peritoneum membantu menyokong hati. 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 hati tempat masuknya vena porta dan arteri hepatica dan tempat keluarnya duktus hepatica (Price, at al 2002)

### 2.6.2 Struktur Mikroskopis Hati

Setiap lobus hati 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 hati berbentuk kubus. Hati manusia memiliki maksimal 100.000 lobulus.

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

Selain cabang - cabang vena porta dan arteri hepatica yang melingkari bagian perifer lobulus hati, juga terdapat saluran empedu. Saluran empedu interlobular membentuk kapiler empedu. Saluran empedu interbular membentuk kapiler empedu yang sangat kecil yang disebut sebagai *kanalikuli*, yang berjalan ditengah lempengan sel hati. Empedu yang dibentuk dalam hepatosit di ekskresi ke dalam kanalikuli yang bersatu membentuk saluran empedu yang makin lama makin besar sehingga membentuk duktus koledokus (Price, et al 2002)

### **2.6.3. Sirkulasi Hati**

Hati 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 hati setiap menitnya adalah 1.500 ml, dan dialirkan melalui vena hepatica kanan dan kiri yang selanjutnya bermuara pada vena kava inferior (Price, et All, 2002). Arteri hepatica yang keluar dari

aorta memberikan seperlima darahnya pada hati, darah ini mempunyai kejenuhan oksigen 95 sampai 100 persen (Evelyn et all, 2008).

Vena porta terletak diantara dua daerah kapiler, yang satu terletak dalam hati, dan satu lagi terletak dalam saluran cerna. Saat mencapai hati, vena porta bercabang -cabang yang menempel melingkari lobulus hati. 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 all.2002). Vena porta mengantarkan empat perlima darahnya ke hati, 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 di absorpsi oleh mukosa usus ke hati. Vena hepatica mengembalikan darah dari hati kevena kafa inferior. Di dalam vena hepatica tidak terdapat katup (Evelyn et all, 2008).

#### **2.6.4 Fungsi Hati**

##### **1. Fungsi Metabolik hati**

Sel hepar merupakan suatu kumpulan besar sel reaktan kimia dengan laju metabolisme yang tinggi, saling memberikan substrat dan energi dari satu sistem metabolisme ke sistem yang lain, mengolah dan menyintesis berbagai zat yang diangkut ke daerah tubuh lainnya, dan melakukan berbagai fungsi metabolisme. Pada metabolisme Karbohidrat, hepar melakukan fungsi spesifik, yaitu menyimpan glikogen, mengubah galaktosa dan fruktosa

menjadi glukosa, glukoneogenesis dan membentuk banyak senyawa kimia penting dari hasil perantara metabolisme karbohidrat. Hati sangat penting mempertahankan konsentrasi glukosa darah normal. Penyimpanan glikogen memungkinkan hati mengambil kelebihan glukosa dari darah, menyimpannya, dan kemudian mengembalikan kembali ke darah bila konsentrasi glukosa darah turun terlalu rendah. *Glukoneogenesis* dalam hati juga penting untuk mempertahankan konsentrasi normal glukosa darah. *Glukoneogenesis* hanya terjadi apabila konsentrasi glukosa darah mulai menurun di bawah normal. Sejumlah besar asam amino dan gliserol dari trigliserida diubah menjadi glukosa.

Fungsi spesifik hati pada metabolisme lemak adalah sebagai berikut: Oksidasi asam lemak untuk menyuplai energi bagi fungsi tubuh yang lain, sintesis kolesterol, fosfolipid dan sebagian besar lipoprotein. Lemak pertama di pecah menjadi gliserol dan asam lemak, kemudian asam lemak dipecah oleh oksidasi beta menjadi radikal asetil berkarbon 2 yang membentuk *asetil koenzim A*. Hati mengubah asetil -KoA melalui kondensasi dua molekul asetil - KoA menjadi *asam asetoasetat*, yaitu asam dengan kelarutan tinggi yang lewat dari sel hati masuk ke cairan ekstra sel dan kemudian ditranspor ke seluruh tubuh untuk diabsorpsi oleh jaringan lain.

Fungsi hati pada metabolisme protein, adalah sebagai berikut: pembentukan ureum untuk mengeluarkan ammonia dari cairan tubuh, pembentukan protein plasma, interkonversi beragam asam amino dan sintesis senyawa lain dari asam amino dan deaminasi asam amino. Deaminasi asam

amino dibutuhkan sebelum asam amino digunakan untuk energi atau diubah menjadi karbohidrat atau lemak. Pembentukan ureum oleh hati mengeluarkan ammonia dari cairan tubuh. Sejumlah besar ammonia dibentuk melalui proses deaminasi. Bila hati tidak membentuk ureum, konsentrasi ammonia plasma meningkat dengan cepat dan menimbulkan *koma hepaticum* dan kematian. Pada dasarnya semua protein plasma, kecuali bagian gamma globulin dibentuk oleh sel hati. Sel hati menghasilkan 90% dari semua protein plasma. Sisa gammaglobulin adalah antibodi yang dibentuk terutama oleh sel plasma dalam jaringan limfe tubuh.

## 2. Biotransformasi Metabolik

Hati memiliki peran penting dalam mentransformasi zat – zat biologis yang bersifat racun.

### a. Biotransformasi Bilirubin

Bilirubin adalah suatu produk penguraian sel darah merah. Setelah berusia 120 hari sel darah merah menjadi sangat rapuh dan pecah. Hemoglobin dilepaskan dan diubah menjadi bilirubin bebas oleh sel – sel fagositik. Bilirubin bebas berikatan dengan albumin plasma dan mengalir dalam darah menuju hati.

Setelah berada di hati, bilirubin dibebaskan dari albumin dan, karena bilirubin bebas bersifat larut dalam lemak, bilirubin tersebut mudah masuk ke dalam hepatosit. Setelah berada dalam hepatosit, bilirubin dengan cepat berikatan dengan dengan asam glukoronat.

b. Biotransformasi Hormon

Hati memodifikasi atau membuat banyak hormon dalam tubuh menjadi tidak aktif. Hati mengolah hormon – hormon steroid termasuk kortisol, estrogen, progesterone, testosterone dan aldosteron agar hormon – hormon tersebut lebih larut dalam air ketimbang larut dalam lemak sehingga dapat dieksresikan.

c. Biotransformasi Amonia

Amonia adalah suatu produk sampingan penguraian protein. Ammonia dapat ditransformasi menjadi urea di hati dan dieksresikan dalam urine. Tanpa fungsi hati ini, terjadi penimbunan ammonia dalam darah.

3. Pembentukan protein plasma

Hati bertanggung jawab untuk mensintesis protein plasma, termasuk albumin. Konsentrasi albumin di dalam plasma adalah penentu utama tekanan osmotik koloid plasma, gaya utama yang menyebabkan reabsorpsi cairan dari ruang interstisium kembali ke kapiler. Apabila hati tidak mampu mempertahankan jumlah protein plasma secara adekuat, maka tekanan osmotik kapiler menjadi rendah dan plasma yang tersaring keluar di pangkal kapiler tidak dapat mengalir balik ke dalam kapiler yang membentuk sebuah vena.

4. Fungsi Imunologis

Kapiler di hati disebut sinusoid. Aliran darah di dalam sinusoid adalah campuran darah vena dari vena porta dan darah arteri dari arteri hepatica. Sinusoid dilapisi oleh sel – sel makrofag fagositik yang disebut sel kuffer. Sel

ini menyingkirkan bakteri, sel mati, dan benda asing lainnya yang berasal dari darah, terutama darah porta, yang mengalir dari usus menuju hati.

#### 5. Fungsi Metabolik Hati Yang Lain

##### a. Sebagai tempat penyimpanan Vitamin

Hati merupakan tempat penyimpanan vitamin. Vitamin yang paling banyak disimpan di hati adalah vitamin A, tetapi sejumlah besar juga disimpan vitamin D dan Vitamin B12.

##### b. Hati menyimpan Besi dalam bentuk Ferritin.

Hati juga menyimpan Besi dalam bentuk ferritin. Kecuali besi dalam hemoglobin darah, sebagian besar besi disimpan di hati dalam bentuk ferritin. Sel hati mengandung sejumlah besar protein yang disebut *apoferritin*. Bila besi dalam sirkulasi cairan tubuh mencapai kadar yang rendah, maka ferritin akan melepas besi.

##### c. Hati membentuk zat yang digunakan untuk koagulasi darah

Zat – zat yang dibentuk di hati yang digunakan pada proses koagulasi meliputi *fibrinogen, protombin, globulin akselerator, faktor VII*, dan beberapa faktor koagulasi yang lain. Vitamin K dibutuhkan oleh proses metabolisme hati, untuk membentuk protrombin dan faktor VII, IX dan X. Bila tidak terdapat Vitamin K, maka konsentrasi akan turun dan keadaan ini mencegah koagulasi darah.

##### d. Hati mengeluarkan atau mengekskresikan obat- obatan, hormon dan zat lain.

Medium kimia yang aktif dari hati dikenal kemampuannya dalam melakukan detoksifikasi atau eksresi berbagai obat – obatan seperti : sulfonamide, penisilin, ampisilin dan eritromisin ke dalam empedu. Dengan cara yang sama beberapa hormon disekresikan oleh kelenjer endokrin diekskresikan atau dihambat secara kimia oleh hati, meliputi tiroksin dan terutama hormon steroid seperti, estrogen, kortisol, dan aldosteron (Corwin, 2009).

#### 2.6.5 Sel Hati (Hepatosit)

Hepatosit merupakan kira - kira 80% dari populasi sel hati. 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 kontak dengan hepatosit bersebelahan adalah *domein lateral*. Sebagian dari membral lateral yang membentuk dinding dari kanakuli biliaris intersel adalah *domein kanakuli biliaris*.

Intinya bulat, dengan kelompok heterokromatin di tepian dan satu atau dua nukleoli nampak jelas. Ukuran inti itu bervariasi, 40 - 60% diantaranya adalah poliploid. Kebanyakan hepatosit memiliki satu inti, namun 25% diantaranya adalah binuklear. Sisterna perinuklear memiliki lamina nuklear tipis pada permukaan dalamnya. Terdapat pula unsure - 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. Didalam lumennya sering ada

globul padat kecil yaitu lipoprotein serum berdensitas sangat rendah (VLDL) yang dibuat dalam hati dan dibebaskan kedalam darah sebagai carier dari kolesterol.

#### 2.6.6 Jejas Seluler Hepatosit

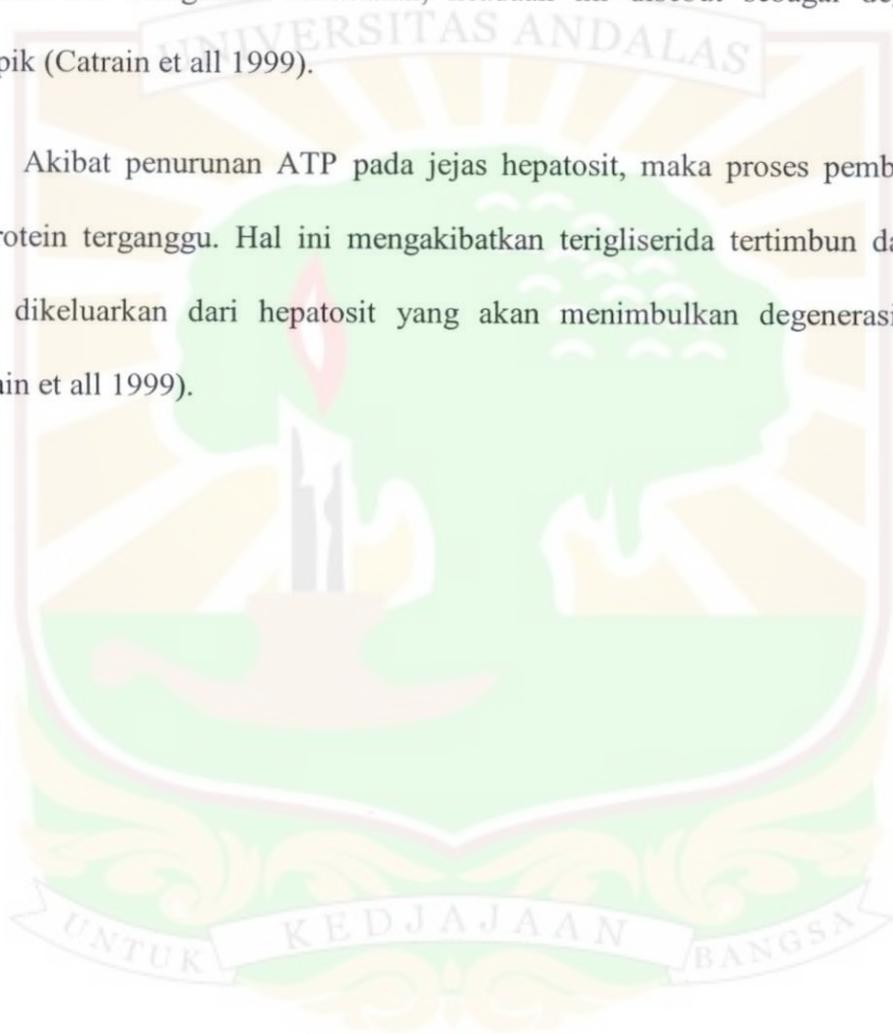
Sel hati dapat menjadi tidak normal baik bentuk, komponen atau fungsi sel karena keracunan atau karena penyebab lain, seperti hipoksia, infeksi, reaksi imunologik, kerusakan genetika dan ketidak seimbangan nutrisi. Kerusakan sel hati tergantung pada aktifitas racun yang masuk ke dalam tubuh, aliran darah 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 (Catrain et all 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 irevesibel pada mitokondria (Catrain et all 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.

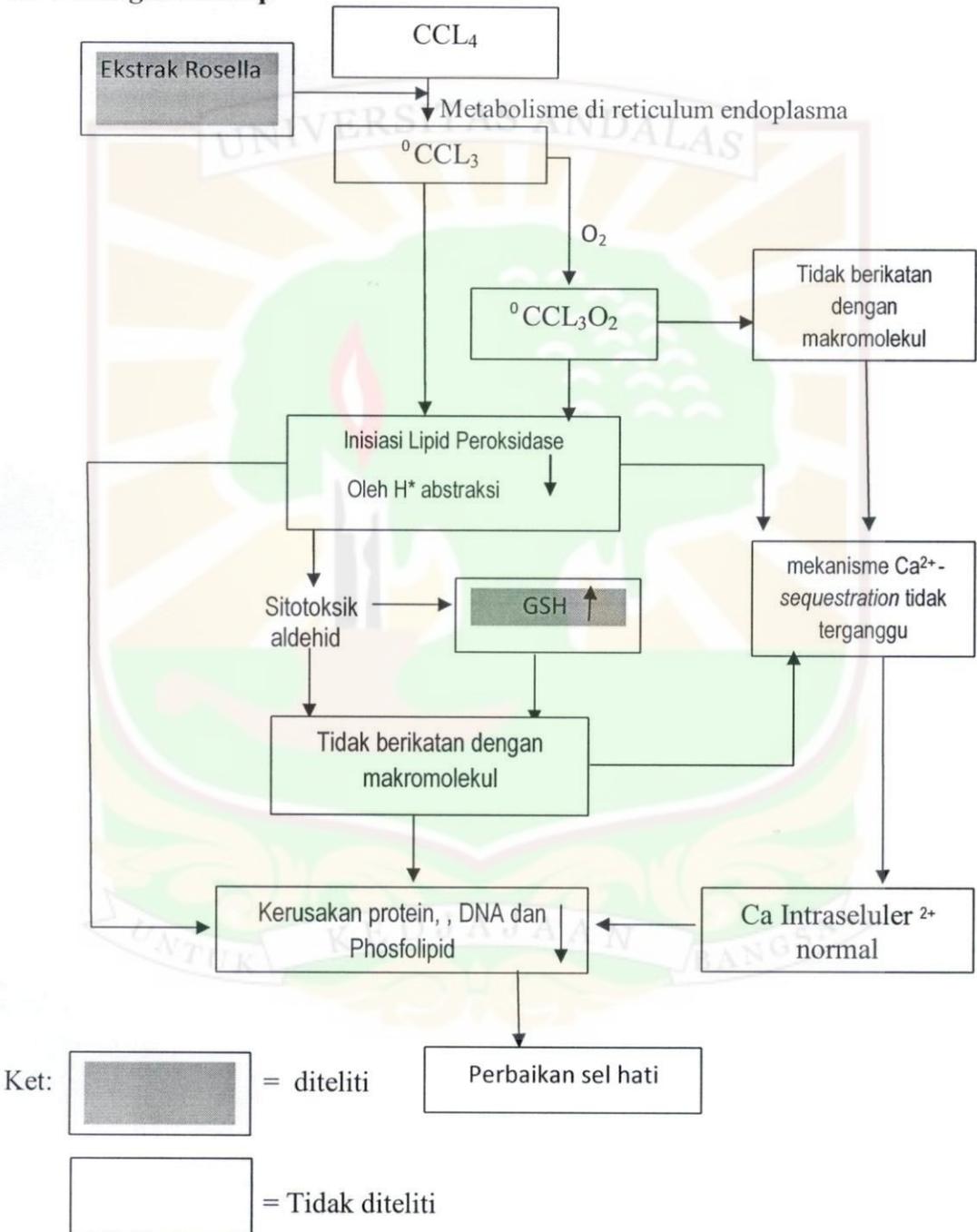
Apabila pemasukan air ke dalam sel berlangsung terus, maka akan terbentuk vakuola - vakuola yang berisi air dalam sitoplasma. Dengan mikroskop cahaya akan terlihat sebagai rongga yang jernih di dalam sitoplasma. Dengan mikroskop elektron organela - organela sel nampak semakin membengkak dan membran sel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

Akibat penurunan ATP pada jejas hepatosit, maka proses pembentukan lipoprotein terganggu. Hal ini mengakibatkan tergliserida tertimbun dan tidak dapat dikeluarkan dari hepatosit yang akan menimbulkan degenerasi lemak (Catrain et all 1999).



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

**3.1 Kerangka Konsep**



## 2.7 Penjelasan Kerangka Konsep

Efek hepatotoksik  $\text{CCL}_4$  tergantung pada aktifitas metabolik  $\text{CCL}_4$  yang berlangsung dalam retikulum endoplasma sel hati melalui intreraksi dengan transpor elektron NADPH sitokrom P450.  $\text{CCL}_4$  dimetabolisme di reticulum endoplasma oleh sitokrom P450 menghasilkan zat yang reaktif yaitu  $\text{CCL}_3^0$ .

Radikal bebas  $\text{CCL}_3^0$  akan segera bereaksi dengan oksigen membentuk  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  yang jauh lebih reaktif dari pada  $\text{CCL}_3^0$ .  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  bersifat sangat reaktif terhadap biomolekul seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleotida.  $\text{CCL}_3^0$  dan  $\text{CCL}_3\text{O}_2$  menyebabkan inisiasi lipid peroksidase meningkat. Peningkatan lipid peroksidase ini menyebabkan terjadinya penurunan glutathion peroksidase. Pemberian ekstrak Rosella di duga dapat meningkatkan aktifitas glutathion peroksidase.

Hal ini mengakibatkan kerusakan mekanisme  $\text{Ca}^{2+}$  sequestration, sehingga terjadi peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler. Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler menyebabkan kerusakan protein, lipid dan DNA. maka selanjutnya terjadi peningkatan cytotoxic aldehyd dan kerusakan sel.

## 2.8 Hipotesis

Ada pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktifitas enzim glutathion peroksidase tikus yang terpapar karbon tetraklorida.

## 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 kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (Sudigdo, 2011).

#### 4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat pemeliharaan binatang percobaan dilakukan di Laboratorium Farmasi bagian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Andalas Padang. Pembuatan ekstrak rosella dan pemberian perlakuan dilaksanakan pada Laboratorium Farmasi FMIPA Unand di Padang. Pemeriksaan aktifitas glutathion peroksidase darah tikus dilaksanakan di Laboratorium Biomedik, Universitas Andalas Padang. Waktu penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juni 2013.

#### 4.3. Populasi dan sampel

##### 4.3.1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus putih strain wistar yang di dapatkan dari unit pengembangan hewan penelitian (UPPH) Surabaya, dengan

pertimbangan tikus adalah mamalia coba atau sering disebut hewan laboratorium karena sering dipakai pada penelitian biologi di laboratorium. Hewan laboratorium tersebut digunakan sebagai model untuk penelitian terutama pengaruh bahan kimia atau obat – obatan sebelum diperlakukan pada manusia.

#### 4.3.2. Sampel

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

- a. Umur 2 - 3 bulan
- b. Jenis kelamin jantan
- c. Berat badan rata-rata 175 - 230 gr

Kriteria eksklusi yaitu tikus yang mengalami penurunan keadaan fisik atau mati. Besar sampel minimal penelitian ditentukan berdasarkan rumus Kemas (1991), yaitu :

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

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

$$r-1 \geq 15/3$$

$$r = 6$$

Keterangan :

t : treatment / perlakuan

r : replikasi / ulangan

Jumlah sampel di tiap kelompok adalah 6 ekor. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok. Jadi jumlah sampel keseluruhan  $4 \times 6 = 24$  ekor. Walaupun demikian sebagai cadangan untuk mengganti tikus 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 independent dalam penelitian ini adalah ekstrak rosella

##### **4.4.2. Variabel Dependen**

Variabel dependen dalam penelitian ini yaitu aktifitas glutathion peroksidase.

#### **4.5. Definisi Operasional**

Variabel : Ekstrak Rosella

Definisi Operasional: Ekstrak kelopak bunga rosella yang dipakai adalah bunga rosella yang di dapat dari petani di daerah Solok Selatan. Pembuatan ekstrak kelopak bunga rosella menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Ekstrak kelopak bunga rosella diberikan peroral sekali dalam sehari menggunakan sonde lambung, diberikan pada pukul 12.00 WIB.

Alat Ukur: Timbangan analitik

Cara Ukur : melakukan penimbangan dosis ekstrak rosella. Pemberian ekstrak rosella dilakukan pada kelompok perlakuan I selama 14 hari dengan dosis 250 mg/kgbb dan pada kelompok perlakuan II dengan dosis 500 mg/kgbb

Hasil Ukur: Kelompok perlakuan 1, dengan dosis ekstrak rosella 250 mg kelompok perlakuan II dengan dosis ekstrak rosella 500 mg.

Skala Ukur: Ordinal

#### 4.5.2 Aktifitas Glutathion peroksidase (GSH)

Aktifitas GSH dalam darah tikus strain wistar yang diperiksa setelah pemberian  $CCL_4$  dan ekstrak rosella. Pemeriksaan aktifitas Glutathion Peroksidase dilakukan dengan metode elisa.

Alat Ukur: Menggunakan Cayman's GSH px

Cara Ukur : melakukan pengukuran aktifitas enzim glutathion peroksidase

Hasil Ukur: Hasil pengukuran aktifitas enzim glutathion peroksidase yang dinyatakan dalam mikro mol.

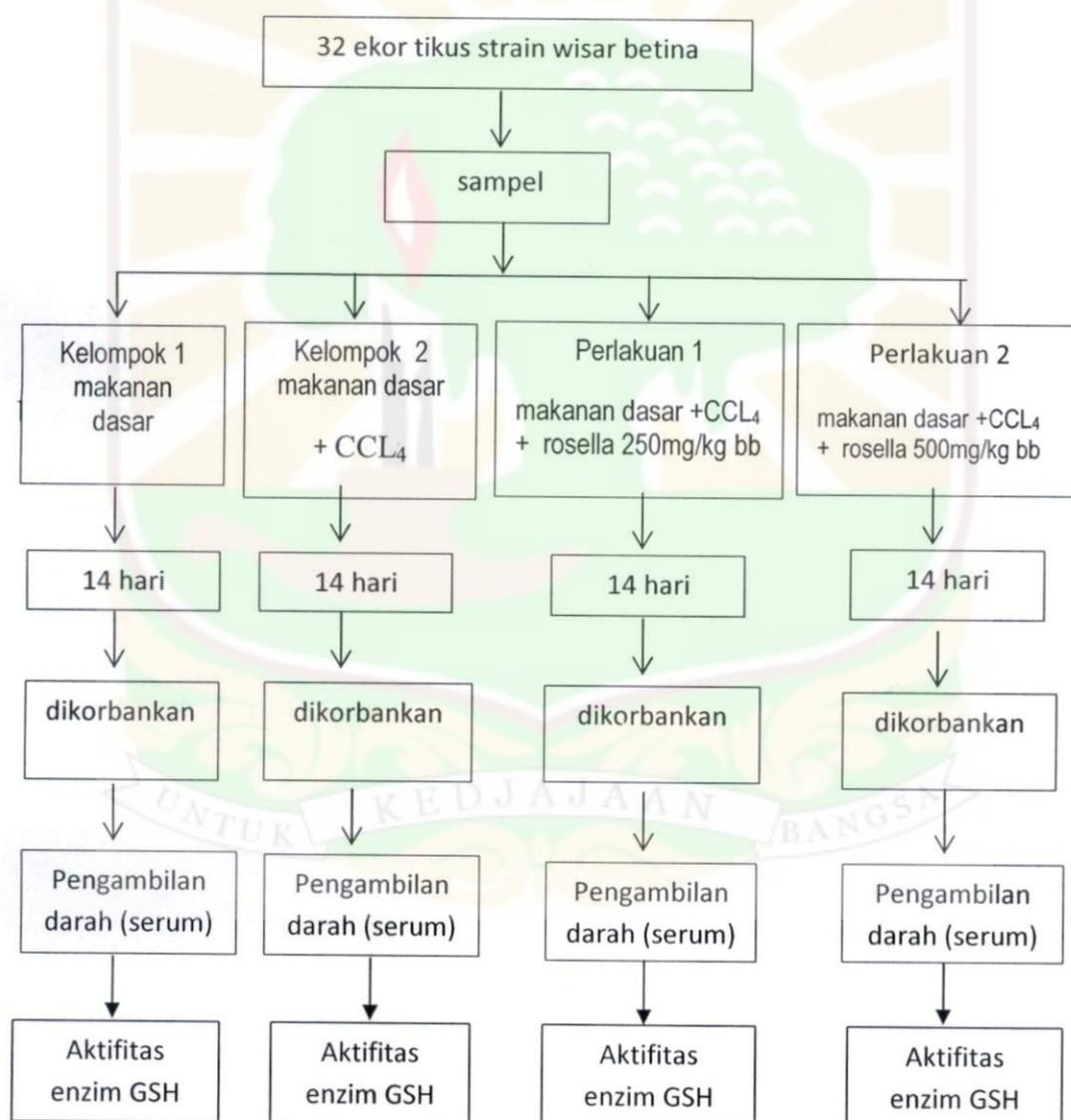
Skala Ukur: Rasio

#### 4.6. Prosedur penelitian

Penelitian dimulai setelah mendapatkan persetujuan dari Tim Penguji dan Tim pembimbing, serta tidak melanggar *Ethical Clearen* Kedokteran Fakultas Kedokteran Unand. Sebelum melakukan penelitian, peneliti mengurus surat izin

penelitian dan mempersiapkan kebutuhan untuk penelitian. Penelitian ini bekerjasama dengan Bagian Laboratorium Farmasi FMIPA Unand di Limau Manis Padang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Unand di Jati Padang.

#### 4.7. Rancangan Penelitian



#### 4.8. Prosedur Kerja

Penelitian ini dibagi menjadi 3 proses, yaitu persiapan alat, bahan, dan hewan coba, perlakuan pada hewan coba dan pemeriksaan aktifitas enzim glutathion peroksidase.

##### 4.8.1 Persiapan alat, bahan dan hewan coba

###### 1. Persiapan alat

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makanan dan minuman tikus
- c. Pakan (pellet) dan air
- d. Timbangan Ohaus Triple beam balance
- e. Karbon tetraklorida
- f. Ekstrak rosela
- g. sentrifus
- h. sonde
- i. sekam
- j. eter
- k. botol plastik
- l. spuit
- m. tabung edta
- n. label
- o. NADPH

- p. Glutation Reduktase/GSH
- q. Cumene Peroksida
- r. GPx kontrol positif
- s. Assay Buffer
- t. Plat elisa 96 well
- u. Elisa Reader, set pada 340 nm
- v. Mikro pipet dan tip
- w. Tikus strain wistar jantan sebanyak 32 ekor.

## **2. Pemilihan dan Pemeliharaan Hewan Uji**

- a. Tikus yang dijadikan sampel adalah tikus jantan wistar, berumur 2 – 3 bulan, dengan berat badan antara 175 gram – 220 gram. Tikus berasal dari Unit Pengembangan Hewan Penelitian (UPHP) Surabaya, penyesuaian lingkungan selama 1 minggu sebelum diberi perlakuan.
- b. Tikus dipelihara dalam kandang plastik dengan anyaman kawat sebagai penutup. Bagian lantai kandang diisi dengan sekam dengan tujuan untuk menyerap kotoran tikus. Kandang ditempatkan dalam ruangan yang memiliki ventilasi dan mendapat cahaya matahari langsung.
- c. Kandang, tempat makanan dan minuman dibersihkan tiga kali dalam seminggu. Temperature dipertahankan pada suhu kamar, kelembaban antara 40 - 60%. Kandang harus cukup kuat, tidak mudah rusak. Kandang harus mudah dibersihkan, mudah dibongkar dan mudah dipasang kembali. Kandang harus tahan gigitan, hewan tidak mudah lepas dan hewan harus tampak jelas dari luar.

- d. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*. Pakan yang diberikan berupa pellet c-05 produksi PT. Charoen Medan dan aquades. Jumlah konsumsi pakan perhari rata – rata 5 gr/100grbb. Kebutuhan air 8 - 11 ml/grbb (Kasumawati,2004).
- e. Sebelum perlakuan, terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat badan tikus. Tikus yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam kandang, masing – masing kandang berisi 4 ekor tikus. Kandang dibersihkan terlebih dahulu sebelum digunakan dengan cara menyemprotkan formalin 10% sebagai desinfektan, ditempatkan dalam suhu kamar.

### 3. Pembuatan Ekstrak Rosella

Penyiapan simplisia Kelopak bunga rosella diperoleh dari hasil budidaya para petani di daerah Solok Selatan. Adapun langkah – langkah pembuatan ekstrak rosella adalah sebagai berikut:

- a. Kelopak bunga rosella segar disiapkan sebanyak 5 kg. kelopak bunga dibersihkan dari semua kotoran yang melekat lalu dicuci sampai bersih.
- b. kelopak bunga rosella segar di keringkan. Selanjutnya bunga rosella yang telah dikeringkan (simplisia) dimasukkan ke dalam wadah maserasi (botol yang berwarna gelap) 1/3 bagian.
- c. Maserasi dimulai dengan cara menuangkan etanol 70% ke dalam wadah maserasi, sampai seluruh simplisia terendam dan pelarut dilebihkan setinggi kurang lebih 2 cm di atas permukaan simplisia. (Penggunaan etanol sebagai pelarut karena sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar dan non polar serta

kemampuannya untuk mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim sehingga dapat terhindar proses hidrolisis dan oksidasi (Djamil, 1998). Keuntungan lainnya, etanol lebih murah, kurang berbahaya bagi peneliti dibandingkan dengan methanol. Etanol yang digunakan adalah etanol 70% karena sampel berupa kelopak bunga kering .

- d. Simplisia direndam selama 3 hari, selama perendaman dilakukan pengadukan 2 kali sehari agar senyawa-senyawa yang terdapat pada kelopak bunga rosella dapat larut dengan baik.
- e. Setelah tiga hari kemudian, sarinya disaring dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cara yang sama (2 kali pengulangan).
- f. Maserat (cairan etanol hasil maserasi) dipisahkan dalam dirigen yang bersih dan proses diulangi dua kali dengan jumlah pelarut yang sama.
- g. Setelah melalui proses maserasi, ekstrak etanol dipekatkan dengan destilasi vakum.
- h. Kemudian ekstrak tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut dan air yang masih tersisa sehingga diperoleh ekstrak kental.

#### 4. Pemberian Karbontetraklorida (CCL<sub>4</sub>)

- a. Pemberian karbontetraklorida dilakukan sebanyak 1 kali (dosis tunggal). Berdasarkan penelitian Dahiru (2009), bahwa pemberian dosis CCL<sub>4</sub> dengan dosis tunggal 1.0 mg/kg berat badan
- b. CCL<sub>4</sub> dibuat menjadi suspense hingga menjadi 1 CC, kemudian dimasukkan ke dalam sonde. Posisi tikus dipegang sedemikian rupa

diberikan secara oral, yaitu dimasukkan melalui tepi langit – langit sambil didorong perlahan – lahan ke belakang sampai oesepagus.

- c. Dosis CCL<sub>4</sub> yang diberikan sebanyak 1 mg/kg bb tikus dapat dilihat pada tabel 4.1 di bawah ini:

Tabel 4.1 Dosis CCL<sub>4</sub> berdasarkan berat badan tikus

Kelompok	Berat Badan Tikus (mg)	Dosis (ml)
KP	229	0.22
	200	0.2
	188	0.18
	197	0.2
	190	0.19
	192	0.19
	175	0.17
	217	0.21
P1	192	0.19
	186	0.18
	174	0.17
	177	0.17
	196	0.19
	205	0.2
	210	0.21
	222	0.22
P2	180	0.18
	187	0.19
	171	0.17
	177	0.18
	190	0.19
	172	0.17
	174	0.17
	174	0.17

## 5. Pemberian dosis ekstrak Rosella

Pada penelitian yang sudah dilakukan, Dahiru *et al.* (2003) menggunakan dosis 250 dan 500 mg/kg BB. Pada penelitian yang

dilakukan Ali *et al.* (2003), dosis ekstrak kelopak bunga rosella yang digunakan adalah dengan dosis 50, 100 dan 200 mg/kg BB, didapatkan dalam dosis di bawah 200 mg/kg BB tidak memberikan hasil yang efektif. Langkah – langkah penentuan dosis ekstrak rosella adalah sebagai berikut:

- a. Dosis ekstrak kelopak bunga rosella yang digunakan pada penelitian ini adalah 250 dan 500 mg/kg BB tikus. Jumlah ekstrak kelopak bunga rosella yang dibutuhkan = (kelompok I 250 mg + kelompok II 500 mg) x 14 hari x 16 ekor tikus = 168000 mg
- b. Pada proses pembuatan ekstrak kelopak bunga rosella, didapatkan 465 gram ekstrak kelopak bunga rosella dari 1160 gram kelopak bunga rosella kering. Jadi untuk setiap gram ekstrak mengandung 2,495 gram rosella, dibulatkan menjadi 2,5 gram. (2500 mg)
- c. Pembuatan larutan ekstrak kelopak bunga rosella, diambil 6 gram ekstrak kelopak bunga rosella lalu ditambahkan aquades sampai mencapai volume 150 ml, sehingga didapatkan dosis 15000 mg/150 ml atau 100 mg ekstrak kelopak bunga rosella/ml larutan.

- d. Perhitungan dosis ekstrak rosella, adalah sebagai berikut:

$$1 \text{ CC cairan ekstrak rosella} = 100 \text{ mg ekstrak rosella}$$

$$\text{Tikus dengan berat badan } 200 \text{ gram} / 1000 \text{ gram} \times 250 \text{ mg} = 50 \text{ mg}$$

$$50 \text{ mg} / 100 \text{ mg} \times 1 \text{ cc} = 0,5 \text{ ml/mg}$$

Jadi pada tikus dengan berat badan 200 gram diberikan ekstrak rosella sebanyak 0,5 ml.

- e. Setiap tikus ditimbang berat badannya sebelum diberikan ekstrak rosella. Larutan ekstrak kelopak bunga rosella yang diberikan sesuai dosis kelompok perlakuan dan berat badan masing - masing tikus. Tikus 200 gram BB pada kelompok perlakuan P1 (dosis 250 mg/kg BB) mendapat larutan ekstrak kelopak bunga rosela sebanyak 0,50 ml setiap kali pemberian, sedangkan pada kelompok perlakuan P2 (dosis 500 mg/kgBB) 1 ml setiap kali pemberian.
- f. Pemberian ekstrak rosella pada tikus dilakukan setiap hari dengan cara memcomot kulit kuduk tiku dengan tangan kiri sehingga kulit terjepit telunjuk dan ibu jari. Ini diperkuat dengan jepitan pangkal ibu jari dan jari lainnya pada kulit punggung dan ekornya dikaitkan pada kelingking tangan kiri. Ekstrak rosella diberikan diberikan peroral dengan sonde tumpul. Sonde dimasukkan dengan hati – hati sampai di lambung. Setelah yakin sonde masuk ke dalam lambung dan tidak ke paru barulah ekstrak rosella di pompa ke lambung (Ngatidjan, 2006)
- g. Dosis ekstrak rosella yang diberikan berdasarkan berat badan tikus dapat dilihat pada tabel 4.2 di bawah ini:

Tabel 4.2 Dosis ekstrak rosella berdasarkan berat badan tikus

Kelompok	Berat Badan Tikus (mg)	Dosis (ml)
P1	192	0.48
	186	0.47
	174	0.44
	177	0.44
	196	0.49
	205	0.51
	210	0.53
	222	0.56
P2	180	0.9
	187	0.94
	171	0.86
	177	0.89
	190	0.95
	172	0.86
	174	0.87
	174	0.87

#### 4.8.2. Perlakuan Pada Hewan Coba

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

1. Kelompok 1 sebagai kontrol (tanpa paparan CCL<sub>4</sub>)
2. Kelompok 2 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kgbb dosis tunggal.
3. Kelompok 3 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kgbb dosis tunggal, 24 jam kemudian di beri ekstrak rosela 250 mg/kgbb selama 14 hari.
4. Kelompok 4 diberikan CCL<sub>4</sub> 1,0 mg/kgbb dosis tunggal, 24 jam kemudian di beri ekstrak rosela 500 mg/kgbb selama 14 hari.

#### 4.8.3. Pemeriksaan Enzim Glutathion Peroksidase (GSHpx)

Pada hari ke 15 dilakukan pengambilan sampel darah tikus untuk dilakukan pemeriksaan aktifitas enzim Glutathion Peroksidase, 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 enzim glutathione peroksidase (GSH).

Pemeriksaan Glutathion Peroksidase dilakukan di laboratorium Biomedik Universitas Andalas Padang. Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode elisa dengan prosedur sebagai berikut :

1. Persiapkan sampel (serum), Masukkan 10 ul serum /well, tambahkan assay buffer hingga total volume 50 ul/well

2. Buat kurva standar
  - a. Encerkan 25 ul NADPH dengan 975 ul dH<sub>2</sub> (konsentrasi 100 nmol)
  - b. Masukkan masing – masing 0, 20, 40, 60, 80 dan 100 ul NADPH ke dalam sumuran. Tambahkan assay buffer hingga total volume 100 ul.  
Berdasarkan campuran ini konsentrasi NADPH menjadi 0, 20, 40, 60, 80 dan 100 mmol/well. (tabung yang berisi 100 ul NADPH tidak ditambahkan assay buffer lagi karena volume sudah 100 ul)
3. Masukkan positif kontrol, 10 ul GPx, tambahkan assay buffer hingga volume total 50 ul.
4. Masukkan 50 ul assay buffer ke well sebagai negatif kontrol.
5. Buat reaction mix per well dengan total volume 40 ul
  - a. Assay Buffer : 33 ul
  - b. 40 mM NADPH solution : 3 ul
  - c. GR solution : 2 ul
  - d. GSH solution : 2 ul
6. Masukkan reaction mix 40 ul per well dan inkubasi 15 menit
7. Baca pada 340 nm (A1), jika OD < 1 tambahkan NADPH 1 ul
8. Tambahkan 10 ul cumene peroksida
9. Baca pada 340 nm (A2)

#### 4.9. Teknik Analisa 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 (Sudigdo, 2011).



## BAB V

### HASIL PENELITIAN

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdarifa Linn*) terhadap aktifitas glutation peroksidase tikus putih strain wistar yang terpapar karbon tetraklorida. Setelah pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 mg/Kg bb dan dosis 500 mg/Kg bb selama 14 untuk melihat aktifitas enzim glutation peroksidase yang dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian ekstrak rosella.

Penelitian ini menggunakan 24 ekor tikus jantan, penelitian dimulai pada tanggal 23 Mei sampai dengan 16 Juni 2013 dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA). Pemeriksaan serum hasil penelitian dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas di Padang pada tanggal 15 Juli 2013

Rerata aktifitas enzim glutation peroksidase pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan I dan perlakuan II dengan dosis 250 mg/kgbb dan 500 mg/kgbb dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rerata aktifitas glutation peroksidase tikus pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak rosella.

<b>Kelompok</b>	<b>Aktifitas Glutation Peroksidase Rerata <math>\pm</math> SD (nmol/ml)</b>	<b>P</b>
KN	189.87 $\pm$ 9.32	0,000
KP	128.89 $\pm$ 16.34	
P1	158.10 $\pm$ 8.55	
P2	228.95 $\pm$ 15.80	

Keterangan :

- KN : Kelompok kontrol negatif yang diberi diet standar  
 KP : Kelompok kontrol positif diberi diet standardan  $\text{CCl}_4$  1 mg/kg bb  
 P1 : Kelompok perlakuan 1, diberi  $\text{CCl}_4$  1 mg/kg bb dan diberi ekstrak rosella 250 mg/kg bb  
 P2 : Kelompok perlakuan 2, diberi  $\text{CCl}_4$  1 mg/kg bb dan diberi ekstrak rosella 500 mg/kg bb

Pada tabel 5.1 ditemukan bahwa setelah pemberian  $\text{CCl}_4$  1 mg/kg bb terjadi penurunan rerata aktifitas glutation peroksidase tikus putih jantan pada kelompok kontrol positif yaitu 128,89 nmol/ml dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan  $\text{CCl}_4$  (kontrol negatif) yaitu 189,87 nmol/ml. Setelah pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 mg/kgbb terjadi peningkatan rerata aktifitas glutation peroksidase yaitu 158,10 dan dengan dosis ekstrak rosella 500 mg/kgbb terdapat peningkatan rerata aktifitas glutation peroksidase yaitu 228.95 nmolml. Secara statistic terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) yang berarti ada pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap aktifitas glutation peroksidase.

Untuk melihat perbedaan antara kelompok maka dilanjutkan dengan uji *Multiple Comparation Post Hoc* test jenis *Bonfferoni*. Hasil analisa Uji *Post Hoc Bonferoni* dapat dilihat pada tabel 5.2 di bawah ini:

**Tabel 5.2 Tingkat Kebermaknaan Hasil Uji *Post Hoc Bonferoni* Terhadap Rerata Aktifitas Glutation Peroksidase Tikus pada Masing-masing kelompok penelitian.**

Kelompok	KN	KP	PI	PII
KN	-	0,000*	0,002*	0,000*
KP	0,000*	-	0,005*	0,000*
PI	0,002*	0,005*	-	0,000*
PII	0,000*	0,000*	0,000*	-

(\* terdapat perbedaan bermakna)

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Test* pada tabel 5.2 didapatkan bahwa dengan dosis ekstrak rosella 250 mg/kgbb sudah terjadi peningkatan rerata aktifitas glutathion peroksidase secara signifikan ( $p < 0,05$ ) dan dengan peningkatan dosis ekstrak rosella menjadi 500 mg/kgbb terlihat perbedaan yang lebih signifikan ( $p < 0,005$ ).



## BAB VI

### PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang terlihat pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa terdapat penurunan rerata aktifitas glutathion peroksidase tikus yang dipaparkan dengan  $\text{CCl}_4$ . Hasil analisa menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan rerata aktifitas glutathion peroksidase antara kelompok perlakuan.

Terjadinya penurunan aktifitas glutathion peroksidase ini merupakan akibat pemberian karbon tetraklorida. Pemberian karbon tetraklorida pada kelompok kontrol positif dengan tujuan untuk membuat kondisi meningkatnya radikal bebas/*Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$  (kontrol positif) aktifitas glutathion peroksidasinya mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok yang tidak terpapar  $\text{CCl}_4$  (kontrol negatif). Hal ini sesuai dengan teori Halliwell 1999, bahwa terjadinya penurunan kadar Glutathion Peroksidase sesudah diberikan  $\text{CCl}_4$ , karena  $\text{CCl}_4$  merupakan bahan kimia yang bersifat toksik yang memicu terjadinya radikal bebas.  $\text{CCl}_4$  sebagai pelarut lipid memudahkan senyawa tersebut menyeberangi membran sel dan terdistribusi ke semua organ. Sifat toksik  $\text{CCl}_4$  telah terbukti dari beberapa penelitian, bahwa dosis yang kecil sekalipun dapat menimbulkan efek pada berbagai organ tubuh. (Dahiru, 2003)

Karbon tetraklorida akan menghasilkan karbon triklorometil ( $\text{CCl}_3$ ) dan karbon triklorometilperoksi ( $\text{CCL}_3\text{O}_2$ ), yang merupakan sumber radikal bebas, sehingga prooksidan (*Reactive oxygen Spesies*/ROS) lebih dominan terhadap antioksidan. Radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan ini sangat reaktif dan dapat bereaksi cepat dengan DNA, protein dan lipid sehingga terjadi stres

oksidatif. Stres oksidatif menginduksi terganggunya homeostasis kalsium yang pada akhirnya mempengaruhi metabolisme seluler. Stres oksidatif menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang mengakibatkan kerusakan membran sel.

Peningkatan aktifitas glutathion peroksidase dapat membentuk pertahanan terhadap oksidan atau radikal bebas didalam tubuh dan mencegah kerusakan sel dengan cara mengkatalisa hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Pada kondisi normal terbentuknya hidrogen peroksida ini tidak begitu berbahaya, namun adanya logam transisi seperti Fe akan membentuk radikal hidroksil yang sangat berbahaya melalui reaksi *Haber Weiss* dan *Fenton*. Hal ini dapat menghancurkan struktur sel. Glutathion peroksidase dapat mencegah atau menghambat oksidasi substrat sehingga kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap sel, jaringan atau organ dapat dicegah.

Pemberian ekstrak rosella pada tikus yang terpapar  $\text{CCl}_4$  berpengaruh terhadap peningkatan aktifitas glutathion peroksidase, hal ini disebabkan karena rosella mengandung sumber antioksidan, seperti antosianin, vitamin C, 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. Vitamin C atau *L-ascorbic acid*, merupakan senyawa hidrofilik. Senyawa ini merupakan antioksidan paling penting dalam cairan ekstraseluler. Vitamin C secara efisien dapat mencegah terbentuknya superoksida, hidrogen peroksida, hipoklorit, radikal hidroksil, radikal peroksil dan radikal oksigen. Vitamin C lebih efektif dalam menghambat peroksidasi lemak oleh radikal peroksil bila dibandingkan komponen plasma lain seperti  $\alpha$ -tokoferol.

Dari hasil analisa data dengan menggunakan uji statistik *Post hoc Test* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan rerata aktifitas glutathion peroksida antara kelompok kontrol positif (KP) dengan kelompok PI dan kelompok PII yang diberikan dosis ekstrak rosella 250 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB. Peningkatan rerata aktifitas glutathion peroksidase pada kelompok PII sampai 1,4 kali. Sedangkan hasil uji beda antar kelompok PI dengan PII juga terdapat perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa makin tinggi pemberian dosis ekstrak rosella akan menghasilkan rerata aktifitas glutathion peroksidase yang lebih tinggi.

Hal ini dapat terjadi karena rosella juga mengandung antioksidan non enzimatis jenis flavonoid terutama antosianin. Antosianin merupakan pigmen alami yang memberi warna merah pada seduhan kelopak bunga rosella dan bersifat antioksidan. Antosianin berfungsi sebagai pengangkut formasi kolagen, meningkatkan sirkulasi mikro, meningkatkan aliran darah dan mengurangi kolesterol. Sebagai antioksidan, antosianin dapat mengurangi kerusakan oksidatif DNA, meningkatkan cadangan glutathion, dan meningkatkan ekspresi protein

*glutathione S-transferase* P1 (hGSTP1) pada leukosit. hGSTP1 ditampilkan untuk mencegah kerusakan DNA dan mutagenesis. Disamping itu antosianin juga berpengaruh dalam ekspresi gen dari sel - mediator antioksidan endogen (Corredor, 2007). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Nanik (2011) dimana pemberian jus delima merah meningkatkan aktifitas glutathione peroksidase tikus dengan aktifitas fisik maksimal.

Disamping antosianin dan vitamin C 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.

Dengan demikian dapat dilihat bahwa kelopak bunga rosella mengandung antioksidan, asam amino, vitamin dan mineral. Kandungan antioksidan kelopak bunga rosella antara lain: vitamin C, vitamin E, beta karoten, omega 3 dan flavanoid. Kandungan vitamin C dalam kelopak bunga rosella cukup tinggi, yaitu 260-280 mg dalam setiap 100 gram kelopak bunga rosella. Kandungan antioksidan kelopak bunga rosella inilah yang meredam efek radikal bebas yang disebabkan pemberian karbon tetraklorida. Radikal bebas dapat menimbulkan, salah satunya peroksidasi lipid. (Pangkahila, 2007).

## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh ekstrak rosella (*Hibiscus Sabdarifa* Linn) terhadap aktifitas enzim glutation peroksidase tikus yang terpapar karbon tetra klorida, maka didapatkan beberapa kesimpulan dan saran, yaitu:

#### 7.1 Kesimpulan

Pemberian ekstrak rosella dengan dosis 250 dan 500 mg/kg bb memberi pengaruh secara signifikan terhadap peningkatan aktifitas glutation peroksidase pada tikus yang terpapar CCl<sub>4</sub>.

#### 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak rosella dengan menggunakan jaringan hepar untuk melihat aktifitas glutation peroksidase.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang toksisitas ekstrak rosella dan kerusakan organ yang ditimbulkannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S. 1997. *Peran Radikal Bebas Pada Patogenesis Kerusakan Hepar*. Kumpulan makalah, seminar dana lokakarya radikal bebas patogenesis penyakit, fakultas kedokteran universitas Brawijaya. Malang.
- Asikin. N. 2001. *Antioksidan Endogen dan Penilaian Status Antioksidan*. Dalam: Kursus penyegaran dan pelatihan Radikal bebas dan antioksidan: dasar, aplikasi, dan Pemanfaatan Bahan Alam. Jakarta: FK UI
- Aspan, Rustam et.all.2010. *Rosella (Hibiscus Sabdarifa Linn) Serial data ilmiah Terkini Tumbuhan Obat*. Jakarta. Direktorat obat asli Indonesia. Badan Pengawas Obat dan makanan RI.
- Anonim. Facts About Dietary Supplements, December 2002. Didapat dari [WWW.cc.nih.gov/ccc/supplements/selen.html](http://WWW.cc.nih.gov/ccc/supplements/selen.html)
- Anonim,2001. Glutation,Reduced (GSH):Technical Monograph, Alternative Medicine Review.<http://www.woodmed.com>. diakses tanggal 3 Desember 2012
- ATSDR. 2005. *Toxilogical Profile for Carbon Tetraclorida* (Update). Atlanta, GA: U.S. Department of Public Helath and Human Services, Public Health Service.
- Chevion, S., Moran, D.S., Heled, Y., Shani, Y., Regrev, G., Abbou, B., Berenshtein, E., Stadman, E.R., dan Epstein, Y., 2003. Plasma Antioxidant Status and Cell Injury After Severe Physical Exercise. *Proc Nati Acad Sci*. 100(9): 5119-5123.
- Cochrane.G.C.2004, *Celluler Injuri By Oxidants*.Am.J.Med..
- Cooper, K. 2001. Sehat Tanpa Obat. Empat Langkah Revolusi Antioksidan yang Mengubah Hidup Anda. Cetakan Pertama. Bandung: Kaifa.
- Corwin J, Elizabeth. 2009. *Patofisiologi*. Jakarta.EGC
- Corredor, R.G. 2007. *Medox, Purified Anthocyanins: Antioxidant Power with Many*

Review.<http://72.14.235.104/search:>

[www.medoxusa.com/Purified\\_Anthocyanins.pdf](http://www.medoxusa.com/Purified_Anthocyanins.pdf)+anthocyanin,antioxidant

- Dahiru, D., Obi, O and Umaru H. 2003. *Effect of Hibiscus sabdariffa Calyx Extract on Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage*. BIOKEMISTRI 15 (1): 27-33.
- Damiani, E., Astolfi, P., Carloni, P., Stipa, P., dan Greci, L. 2008. Antioxidants : How They Work. Oxidants in Biology. Editor : Giuseppe Valamli. Springer. Droge, W. 2007. Free Radical in the Physiological Control of Cell Function. Rev. 82: 47-95.
- Djamal, R. 1998. *Prinsip – Prinsip Dasar Bekerja dalam Kimia Bahan Alam*. Padang: FMIPA Universitas Andalas
- Digilib.unsri.ac.id/download/selenium  
Didapat dari Fouad T. Free Radical,Types,Source and damaging Reactions di dapat dari [www.thedoctorslounge.net./medlounge/articles/antioxidant](http://www.thedoctorslounge.net./medlounge/articles/antioxidant)
- 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
- Ganda, R., Handharyani, E., Chairul., Masriani., Zakiah, Z, dan Manalu, W. 2007. Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida Terhadap Fungsi Hati Dan Ginjal Tikus. Makara kesehatan, vol. 11, no. 1: 11-16.
- Gutman J.2002. *GSH: Your body's most powerful healing agent*. Montreal Canada:Stephan Schettini.
- Guyton, Arthur C.2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. EGC:Jakarta.
- Halliwell B dan Gutteridge JM. 1999. *Free radicals, reactive species and toxicology*. Dalam: *Free radicals in biology and medicine Third edition*. New York: Oxford University Press: 547-550.
- Inayati L. 2004. *Pengaruh Ekstrak Etanol buah mahkota dewa terhadap kadar malandialdehid tikus diabetes mellitus yang diinduksi aloksan*. Jakarta: medical Kartika.

- Judge, S., Mok Jang, Y., Smith, A., Hagen, T., dan Leeuwenburg, C. 2005. *Age-Associated Increases in Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activities in Cardiac Interfibrillar Mitochondria: Implication For the Mitochondrial Theory of Aging*. University of Florida. *The FASEB Journal*.
- Junqueira, I. Carlos *et al.* 1998. *Histologi Dasar*. Alih Bahasa Tambayong. Jakarta: EGC.
- Jusman SA *et al.* 1995. Bawang prei (*Allium fistulosum* Linn) dan metabolisme: Penghambat kenaikan kandungan peroksida lipid hati karena radikal bebas pada tikus yang diratembagani CCl<sub>4</sub>. *Majalah kedokteran Indonesia*; 45 (10): 588-591.
- Koeman, J.H. 1987. *Pengantar Umum Toksikologi*. Yogyakarta: UGM Press
- Kumalaningsih S. 2007. Antioksidan Alami, Penangkal Radikal Bebas “Sumber, Manfaat, Cara Penyajian dan Pengolahan”. Trubus Agrisarana, Surabaya.
- Mardiah., Sawarni, H., Ashadi, A dan Rahayu. 2009. *Budi Daya dan Pengolahan Rosella si Merah Segudang Manfaat*. Cetakan 1. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Marks, Dawn B. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Jakarta. EGC.
- Maryani, H., Kristina, L. 2008. *Khasiat dan manfaat Rosella*. Jakarta. Argomedia. Pustaka
- Muhilal. 1991. *Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran Cermin Dunia Kedokteran* . 73: 9-11.
- Ngatidjan. 2006. *Metode Laboratorium Dalam Toksikologi*. Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran UGM. Yogyakarta.
- Ogeturk, M; Kus I; Kavakli, A; Zararsiz, I; Ilhan, N dan Sarsilmaz, M. 2004. *Effects of Melatonin on Carbon tetrachloride-Induced Changes in rat Serum*. in: *Journal of Departement Physiology and Biochemistry* Vol. 60
- Pokorny JN, M Yanishlieva, Gordon. 2001. *Antioxidants in Food*. Boca Raton Boston New York Washington, DC: CRC Press.
- Price, Silvia Anderson and Wilson Lorraine McCarty. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis proses – Proses Penyakit*. Jakarta. EGC
- Rahmawati, 2012. *Khasiat dan manfaat Rosella*. Jakarta. EGC

- Reindi. 2009. <http://www.warungedukasi.co.cc/2009/02/rosella-sebagai-zat-antioksidan.html>
- Rice-Evans C, NJ Miller & G Paganga. 1997. *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Trends in Plant Science.
- Rohrdanz, E., O. Sandra, T. Quynh-Hoa, dan K. Regine. 2002. The Phytoestrogen. Daidzein Affects the Antioxidant Enzyme System of Rat Hepatoma H4IIE Cells. *Journal of Nutrition*. 132: 370-375.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., dan Biplab D. 2010. Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines : Current Status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(1): 021.
- Sherwood, Lauralee, 2011. *Fisiologi Manusia: Dari Sel Ke Sistem*. Jakarta. EGC
- Sies H., Stahl W., 2005. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal Clinical Nutrition* 62(suppl):1315S-21S
- Sugiyanta, 2007. *Peran Glutation Sebagai Master Antioksidan*. Jurnal Biomedis. Vol 1 No.1, Juni 2007
- Sulistyowati Y. 2006. Pengaruh pemberian likopen terhadap status antioksidan (vitamin C, vitamin E, dan glutathion peroksidase) tikus (*Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik [tesis] : Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
- Supariasa et al. 2002. *Penilaian antioksidan* Jakarta. EGC
- Sudigdo, SastroAsmoro. 2011. *Dasar – dasar metodologis Penelitian Klinis*. Jakarta :
- Sagung Seto
- Tilak, J. C dan Devasagayam, T. P. A. 2006. Oxidative Damage to Mitochondria. In Singh, K. K., editor. *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Singapura: Mainland Press, p.85-150.
- Valko M et al. 2006. Free Radical, metal and antioxidant in oxidative stress induced cancer. *J Chem. Biol. Rusia* edisi 160. p.1-40.

Whanger PD. 2002. *Selenium*, The Linus Pauling Institute, Nopember 18:2002.  
Didapat dari : [www. Highwire.stanford.edu](http://www.Highwire.stanford.edu).

Winarsi Hery. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.

Winaya dan Suarsana. 2005. *Perubahan Morfologi Hati dan Ginjal Mencit yang diinduksi Karbontetraklorida (CCl<sub>4</sub>)*. *Jurnal Penelitian*. Denpasar:

WHO. Selenium. Human Vitamin and mineral.FHO/WHO.Roma 2002

Yan Wirasti, 1997. *Perlindungan Sel Hepar Tikus Percobaan Oleh Vitamin A Terhadap Serangan Radikal Bebas Yang ditimbulkan oleh Keracunan Karbon Tetraklorida*.

Youngson, Robert. 2005. *Antioksidant*. Jakarta. Arcan.



Lampiran I

**MASTER TABEL**  
**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELLA TERHADAP AKTIFITAS GLUTATION PEROKSIDASE**  
**TIKUS TERPAPAR KARBON TETRAKLORIDA**

NO	KADAR GSH (nmol/ml)			
	KONTROL NEGATIF	KONTROL POSITIF	PERLAKUAN I	PERLAKUAN II
1	201,863	142,352	170,609	242,536
2	184,416	119,875	151,878	207,964
3	192,123	136,786	150,166	233,937
4	198,652	100,288	166,649	236,649
5	184,630	131,542	157,016	242,536
6	177,566	142,532	152,306	210,104
<b>JUMLAH</b>	1139,25	773,375	948,624	1373,726
<b>MEAN</b>	<b>189,875</b>	<b>128,896</b>	<b>158,104</b>	<b>228,954</b>

EXAMINE

VARIABLES=GSH BY KLPK  
 /PLOT NPLOT  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES  
 /CINTERVAL 95  
 /MISSING LISTWISE  
 /NOTOTAL.

## KELOMPOK

### Case Processing Summary

KELOMPOK	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
KADAR GSH 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

KELOMPOK	Statistic	Std. Error
KADAR GSH 1.00	Mean	189.8750
	95% Confidence Interval for Mean	3.80624
	Lower Bound	180.0908
	Upper Bound	199.6592
	5% Trimmed Mean	189.8928
	Median	188.3765
	Variance	86.925
	Std. Deviation	9.32334
	Minimum	177.57
	Maximum	201.86
	Range	24.30
	Interquartile Range	16.75
	Skewness	.088
	Kurtosis	-1.505
2.00	Mean	128.8958
	95% Confidence Interval for Mean	6.67346
	Lower Bound	111.7411
	Upper Bound	146.0505
	5% Trimmed Mean	129.7276
	Median	134.1640
	Variance	267.211
	Std. Deviation	16.34658
	Minimum	100.29
	Maximum	142.53

3.00	Range		42.24		
	Interquartile Range		27.42		
	Skewness		-1.282	.845	
	Kurtosis		1.080	1.741	
	Mean		158.1040	3.49269	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		149.1257	
		Upper Bound		167.0823	
	5% Trimmed Mean		157.8503		
	Median		154.6610		
	Variance		73.194		
	Std. Deviation		8.55532		
	Minimum		150.17		
	Maximum		170.61		
	Range		20.44		
Interquartile Range		16.19			
Skewness		.787	.845		
4.00	Kurtosis		-1.495	1.741	
	Mean		228.9543	6.45210	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		212.3687	
		Upper Bound		245.5400	
	5% Trimmed Mean		229.3659		
	Median		235.2930		
	Variance		249.777		
	Std. Deviation		15.80435		
	Minimum		207.96		
	Maximum		242.54		
	Range		34.57		
	Interquartile Range		32.97		
	Skewness		-.787	.845	
	Kurtosis		-1.845	1.741	

#### Tests of Normality

KELOMPOK	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KADAR GSH 1.00	.213	6	.200(*)	.946	6	.710
2.00	.231	6	.200(*)	.862	6	.196
3.00	.251	6	.200(*)	.857	6	.178
4.00	.290	6	.124	.798	6	.057

\* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

ONEWAY

GSH BY KLPK

/STATISTICS DESCRIPTIVES

/MISSING ANALYSIS

/POSTHOC = BONFERRONI ALPHA(.05).

## Oneway

### Descriptives

KADAR GSH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
1.00	6	189.8750	9.32334	3.80624	180.0908	199.6592	177.57	201.86
2.00	6	128.8958	16.34658	6.67346	111.7411	146.0505	100.29	142.53
3.00	6	158.1040	8.55532	3.49269	149.1257	167.0823	150.17	170.61
4.00	6	228.9543	15.80435	6.45210	212.3687	245.5400	207.96	242.54
Total	24	176.4573	39.88843	8.14219	159.6139	193.3007	100.29	242.54

### ANOVA

KADAR GSH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33209.459	3	11069.820	65.395	.000
Within Groups	3385.532	20	169.277		
Total	36594.992	23			

### Descriptives

KADAR GSH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
1.00	6	189.8750	9.32334	3.80624	180.0908	199.6592	177.57	201.86
2.00	6	128.8958	16.34658	6.67346	111.7411	146.0505	100.29	142.53
3.00	6	158.1040	8.55532	3.49269	149.1257	167.0823	150.17	170.61
4.00	6	228.9543	15.80435	6.45210	212.3687	245.5400	207.96	242.54
Total	24	176.4573	39.88843	8.14219	159.6139	193.3007	100.29	242.54

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: KADAR GSH  
Bonferroni

(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Upper Bound	Lower Bound
1.00	2.00	60.97917(*)	7.51169	.000	38.9915	82.9668
	3.00	31.77100(*)	7.51169	.002	9.7834	53.7586
	4.00	-39.07933(*)	7.51169	.000	-61.0670	-17.0917
2.00	1.00	-60.97917(*)	7.51169	.000	-82.9668	-38.9915
	3.00	-29.20817(*)	7.51169	.005	-51.1958	-7.2205
	4.00	100.05850(*)	7.51169	.000	-122.0461	-78.0709
3.00	1.00	-31.77100(*)	7.51169	.002	-53.7586	-9.7834
	2.00	29.20817(*)	7.51169	.005	7.2205	51.1958
	4.00	-70.85033(*)	7.51169	.000	-92.8380	-48.8627
4.00	1.00	39.07933(*)	7.51169	.000	17.0917	61.0670
	2.00	100.05850(*)	7.51169	.000	78.0709	122.0461
	3.00	70.85033(*)	7.51169	.000	48.8627	92.8380

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





**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: 213/KEP/FK/2013

**KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK  
ETHICAL CLEARANCE**

Tim Komite Etika Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang, dalam upaya melindungi hak azasi 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 glutation peroksidase tikus yang terpapar karbon tetraklorida”**

Nama Peneliti Utama : Zulfitra  
*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 Juni 2013

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

Ketua  
*Chairperson*



**Dr. dr. Maspar, MSc, Sp.GK**  
NIP. 1956 1226 1987 101 001

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



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
FAKULTAS FARMASI

Universitas Andalas

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

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

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

**SURAT KETERANGAN SELESAI PENELITIAN**

No. 09/H.16. Farmakol/PP/2013

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

Nama : Zulfitra  
No. BP : 10 21212 001  
Program Studi : S-2 Biomedik

Telah selesai melakukan penelitian di laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang dengan judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Terhadap Aktifitas Enzim Glutation Peroksidase Tikus Yang Terpapar Karbontetraklorida , yang dimulai 23 Mai sampai 16 Juni 2013.

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

Demikianlah surat keterangan ini dibuat, agar dapat digunakan dengan semestinya.

Padang, 20 Juli 2013



Tembusan :

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

Syafriman, SPT

NIP. 19641020198902001001

**Biomedical Laboratory  
University of Andalas  
Medical Faculty**

Jl. Perintis Kemerdekaan. PO.Box 49, Padang 25127  
West Sumatera - Indonesia  
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844  
e-mail : [fkunand@pdg.vision.net.id](mailto:fkunand@pdg.vision.net.id)



**Laboratorium Biomedik  
Universitas Andalas  
Fakultas Kedokteran**

Jl. Perintis Kemerdekaan. PO.Box 49, Padang 25127  
Sumatera Barat - Indonesia  
Phone : +62 751 31746 Fax : +62 751 39844  
e-mail : [fkunand@pdg.vision.net.id](mailto:fkunand@pdg.vision.net.id)

**SURAT KETERANGAN BEBAS LABORATORIUM**

**No: 061/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 : Zulfitra  
Instansi : S2 Biomedik

Telah melakukan penelitian dengan judul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Rossella Terhadap Aktifitas Glutation Peroksidase 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, 15 Juli 2013

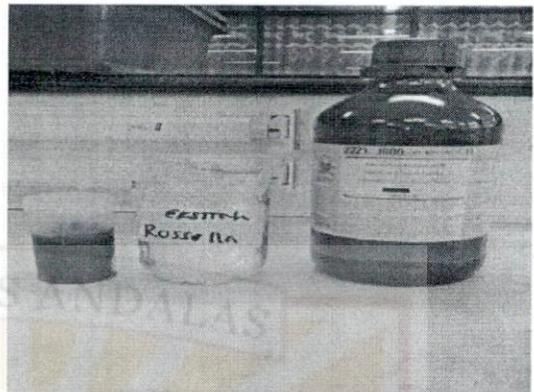
Ketua Laboratorium Biomedik  
Fakultas Kedokteran Unand

  
(Prof. Dr. dr. Hj. Yanwirasti, P.A.)  
NIP. 194309301973032001





Tikus yang baru datang dari Surabaya



CCl<sub>4</sub> dan ekstrak rosella



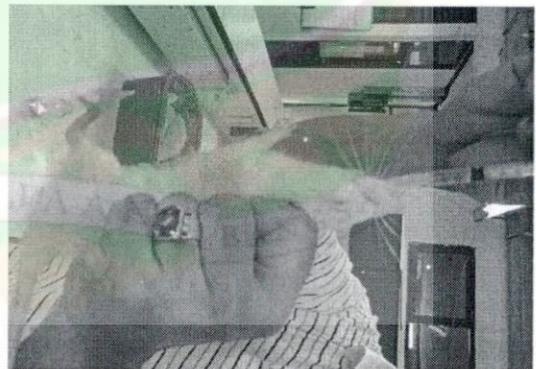
Tikus yang ditimbang dengan timbangan Ohaus



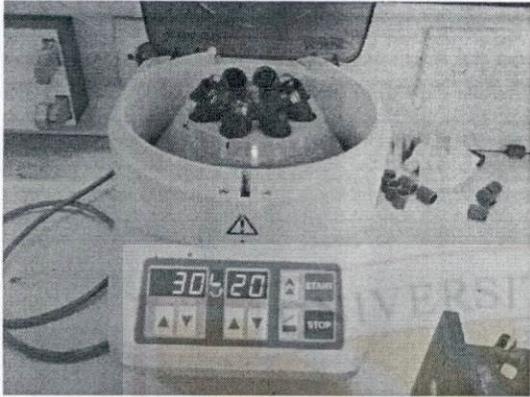
Tikus yang telah dikelompokkan



Tikus yang diberi ekstrak rosella secara oral



Tikus yang diberi karbon tetraklorida secara oral

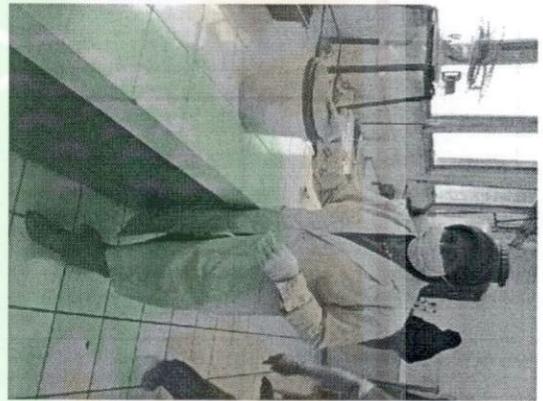


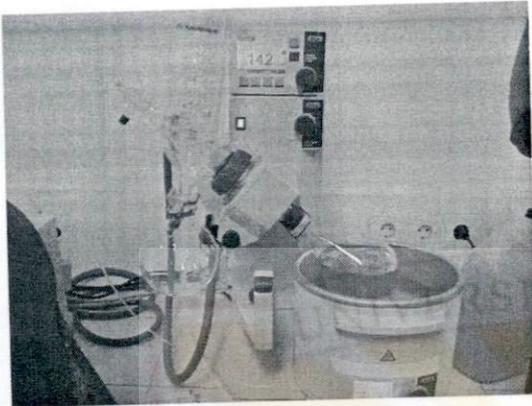


Darahtikus

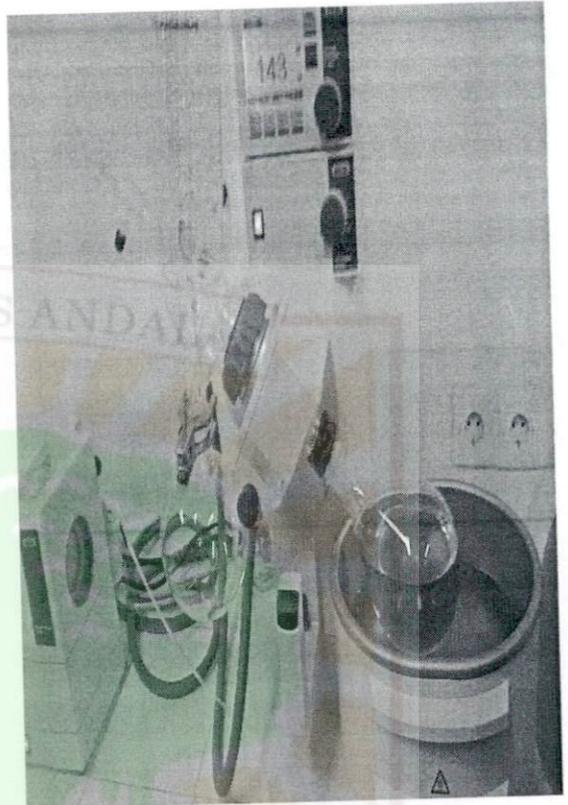


Serum darahtikus





Rotari evaporator untuk mengekstrak



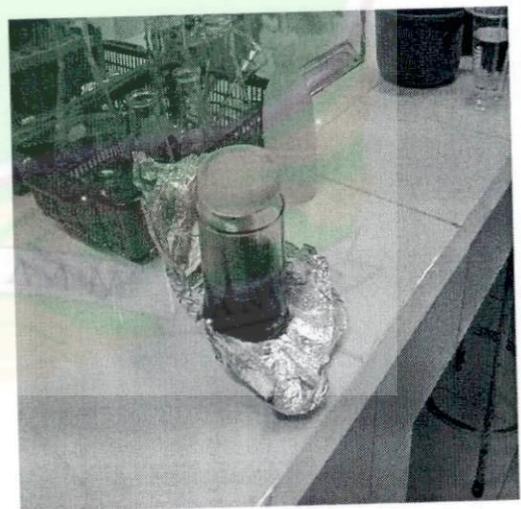
Pembuatan ekstrak rosella sedang diproses



Pengaturan tekanan Rotari



Hasil maserasi ekstrak rosella



Hasil ekstrak Rosella