



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH *Hibiscus sabdariffa* Linn. PADA TIKUS YANG
DIBERI LATIHAN FISIK AEROBIK TERHADAP
DISFUNGSI ENDOTEL DAN STRES OKSIDATIF AKIBAT
PERTAMBAHAN USIA**

TESIS

DONNA ADRIANI K. M.

1406504150

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK**

JAKARTA

DESEMBER 2015



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH *Hibiscus sabdariffa* Linn. PADA TIKUS YANG
DIBERI LATIHAN FISIK AEROBIK TERHADAP
DISFUNGSI ENDOTEL DAN STRES OKSIDATIF AKIBAT
PERTAMBAHAN USIA**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Ilmu
Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

DONNA ADRIANI K. M.

1406504150

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
DESEMBER 2015**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
NPM : 1406504150
Tanda tangan : 
Tanggal : 29 Desember 2015

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
NPM : 1406504150
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh *Hibiscus sabdariffa* Linn. pada tikus yang diberi latihan fisik aerobik terhadap disfungsi endotel dan stres oksidatif akibat penambahan usia

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. dr. Minarma Siagian, MS, AIFM
Pembimbing II: Dr. dr. Dewi Irawati S.S, MS, AIFM
Penguji I : Dr. dr. Ermita I. I. Ilyas, MS, AIFO
Penguji II : Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS
Penguji III : Prof. Dr. dr. Erni H. Purwaningsih, MS

(.....)
(.....)
(.....)
(.....)
(.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 29 Desember 2015

Ketua Program Magister Ilmu Biomedik

Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

(.....)



KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Minarma Siagian, MS, AIFM, selaku pembimbing I saya yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
2. Dr. dr. Dewi Irawati S.S, MS, AIFM, selaku pembimbing II saya yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
3. Dr. dr. Ermita I. I. Ilyas, MS, AIFO, selaku penguji I saya yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
4. Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS, selaku penguji II saya yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
5. Prof. Dr. dr. Erni H. Purwaningsih, MS, selaku penguji III saya yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
6. Dr. dr. Neng Tine Kartinah, M.Kes, AIFO, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
7. Dra. Retnosari Andrajati, PhD, Apt, yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.

8. Dr. dr. Ratna Sitompul, SpM(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
9. Dr. rer. Physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia yang telah banyak membantu penulis selama masa studi.
10. Seluruh staf pengajar Kekhususan Fisiologi Program Magister Ilmu Biomedik FKUI yang telah banyak membimbing dan membantu penulis selama masa studi.
11. dr. Hj Martiem Mawie, MS selaku Kepala Bagian Fisiologi FK Universitas Trisakti yang selalu memberikan dukungan dan saran – saran kepada penulis.
12. dr. Suriptiastuti, MS, DAP&E selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan pendidikan S2 hingga selesai.
13. Dr. dr. Elly Herwana, M.Biomed selaku WD I; Dr. dr. Maria Regina R, SpKFR(K) selaku WD II; dr. Tubagus Ferdi F, SpA, MKes, selaku WD III; Dr.dr. Raditya Wratsangka, SpOG(K), yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan pendidikan S2 dan mendukung baik secara moril maupun materi kepada penulis .
14. Dr. dr. Husnun Amalia, SpM, Kepala DRF FK Universitas Trisakti yang selalu memberikan dukungan dan saran – saran kepada penulis.
15. Yang tersayang, kedua orang tua, Ir.H. Rudy M Nur, MM dan Hj. Murni Astuty yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
16. Yang tersayang suami, dr. Andi Mursali, MKK dan anak – anak tersayang, Audrey dan Adzan yang selalu memberikan dukungan kepada penulis.
17. Kakak, Androe Adrian, ST, MM dan Ripanah, ST serta Farrel dan Raffa yang telah memberikan dukungan kepada penulis.
18. Teman – teman staf FK Universitas Trisakti yang selalu memberikan dukungan kepada penulis (dr. Rani, dr. Jihan, dr. Sisca, dr. Astri, dr Evelyn, dr. Juni, dr. Krisna, dr. Yudhis, dr. Putri, dr. Ken, dr. Reza, dr. Devi, dr. Wiwin).

19. Prof. dr. Adi Hidayat, MS, PhD yang telah membantu penulis dalam penulisan tesis ini.
20. Ns. Rustiana Tasya A, yang telah membantu penulis dalam penulisan tesis ini dan menyediakan fasilitas untuk penulis.
21. dr. Donna Novina Kahandjak, M.Biomed, yang telah membantu penulis dalam penulisan tesis ini.
22. Teman – teman mahasiswa S2 PMIB FKUI (Heni yang selalu menemani dan memberi semangat, Mba Maria, dr. Hanna, dr. Friska, dr. Inge, dr. Robert, Weeke, dr. Jules, Andam, Faiza, Tyas) yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
23. Drh. M. Wien Winarno, M.Kes, selaku Kepala Laboratorium Hewan Coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI dan stafnya (mas Herman, mas Anggi, mas Sahrul) yang telah banyak membantu penulis selama masa studi.
24. Dr. Drs. Heri Wibowo, M.Biomed, selaku Kepala Bidang Operasional dan Administrasi Laboratorium Terpadu FKUI.
25. Seluruh staf Laboratorium Terpadu (Bu Neneng, Bu Yuyun, Bu Sri, dr Rina, mas Agay) yang telah banyak membantu penulis.
26. Staf administrasi Departemen Fisiologi FKUI (Bu Rini, Pak Maksan, Pak Satam, Pak Sugeng, Pak Andi, Mba Uni), staf Program Studi Ilmu Biomedik FKUI (Pak Danny, mba Ella, Pak Zacky, mba Rinda), staf laboratorium BALITRO (Pak Dedy Kusnadi dan Pak Dedy Kustiwa) yang telah banyak membantu penulis selama masa studi.
27. Bu Nurvita Trianasari, S.Si, M.Stat, dosen Universitas Telkom dan Universitas Padjajaran Bandung yang telah membantu penulis dalam penulisan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu.

Jakarta, 29 Desember 2015

Penulis

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
NPM : 1406504150
Program Studi : Ilmu Biomedik
Departemen : Fisiologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

demi mengembangkan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneklusif** (*Non-Exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Pengaruh *Hibiscus sabdariffa* Linn. pada tikus yang diberi latihan fisik aerobik terhadap disfungsi endotel dan stres oksidatif akibat penambahan usia

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*data base*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Tanggal : 29 Desember 2015

Yang Menyatakan



(Donna Adriani Kusumadewi Muhammad)

ABSTRAK

Nama : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
Program Studi : Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh *Hibiscus sabdariffa* Linn. pada tikus yang diberi latihan fisik aerobik terhadap disfungsi endotel dan stres oksidatif akibat penambahan usia

Latar Belakang: Berdasarkan data dari WHO, penderita penyakit kardiovaskular diduga akan terus meningkat. Salah satu proses patologis yang mendasari penyakit kardiovaskular adalah aterosklerosis. Disfungsi endotel yang mengawali aterosklerosis dimulai sejak anak-anak. Stres oksidatif dapat disebabkan oleh penambahan usia. Salah satu herba yang memiliki efek antioksidan kuat dan dapat mencegah stres oksidatif adalah *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Metode: Penelitian eksperimental dilakukan pada 36 ekor tikus jantan galur Wistar usia 5 minggu selama 4 minggu, 8 minggu, dan 12 minggu. Hewan coba secara acak terbagi atas 12 kelompok, yaitu: kontrol (K4, K8, K12), latihan fisik aerobik (L4, L8, L12), pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari (H4, H8, H12) dan kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari (HL4, HL8, HL12). Pengukuran kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA menggunakan supernatan dari homogenat aorta abdominal.

Hasil: Pola kadar NO kelompok K dan L menurun sesuai peningkatan usia. Terdapat perbedaan bermakna antara kadar NO kelompok K dan L, K dan H, dan K dan HL. Kadar ET-1 pada semua kelompok tidak bermakna secara statistik. Terdapat peningkatan aktivitas spesifik SOD pada kelompok L, H, dan HL dibandingkan K. Terdapat perbedaan bermakna Kadar MDA antara K dan H, L dan HL. Terdapat korelasi sedang antara NO dan aktivitas spesifik SOD.

Kesimpulan: latihan fisik aerobik, pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari dan kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari menurunkan kadar MDA dan ET-1, sebaliknya meningkatkan aktivitas spesifik SOD dan NO. Penurunan kadar MDA lebih jelas terlihat pada kelompok HL. Peningkatan aktivitas spesifik SOD meningkatkan produksi NO. Tidak terjadi disfungsi endotel dan stres oksidatif pada seluruh kelompok.

Kata kunci:

Latihan fisik aerobik, *Hibiscus sabdariffa* Linn., NO, ET-1, SOD, MDA.

ABSTRACT

Name : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
Study Programe : Biomedical Science
Title : The effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn. and aerobic exercise on endothelial dysfunction and oxidative stress caused by increasing age in rats

Background: Based on data from WHO, patients with suspected cardiovascular disease will continue to rise. One of the pathological processes underlying cardiovascular disease is atherosclerosis. Endothelial dysfunction which is the first sign of atherosclerosis begins in childhood. Increasing age is one of the cause of oxidative stress. A herb that has strong antioxidant effects and can prevent oxidative stress is *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Methods: Thirty six male Wistar rats aged 5 weeks were randomly divided into 12 groups consisting of control group (K4, K8, K12), aerobic exercise group (L4, L8, L12), administration of *H. sabdariffa* L. 400 mg/kgBW/day group (H4, H8, H12) and combination of aerobic exercise and *H. sabdariffa* L. 400 mg/kgBW/day group (HL4, HL8, HL12). NO, ET-1, MDA level, and SOD activity was measured from abdominal aorta homogenate supernatant.

Results: NO level pattern in the K and L groups tend to decline with age. NO level in L, H and HL groups were higher than K. The difference of ET-1 level in all groups were not statistically significant. Specific activity of SOD in L, H and HL groups were higher than control. The concentration of MDA of group K is significantly lower compare to groups H, L and HL. There is a moderate correlation between specific activity of SOD and NO.

Conclutions: Aerobic exercie, administration of *H. sabdariffa* L. 400 mg/kgBW/day, and combination of both decreases MDA and ET-1 concentration. While, specific activity of SOD and NO are increased. The decrease at MDA concentration was more prominent in HL group. An increase in spesific activity of SOD, increases the NO level. No endothelial dysfunction nor oxidative stress were observed in all groups.

Keywords:

Aerobic exercise, *Hibiscus sabdariffa* Linn., nitric oxide, endothelin-1, malondyaldehyde, spesific activity of superoxide dismutase.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR.....	vii
ABSTRAK.....	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Hipotesis.....	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.4.1 Tujuan Umum.....	4
1.4.2 Tujuan Khusus.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Latihan Fisik	6
2.2 <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn.....	9
2.3 Fungsi Vaskular.....	13
2.3.1 <i>Nitric Oxide</i>	14
2.3.2 Endothelin-1.....	15
2.4 Interaksi NO dan ET-1 dalam Menjaga Tonus Vaskular.....	17
2.5 Efek Disfungsi Endotel terhadap Fungsi Vaskular.....	18
2.5.1 Aterosklerosis.....	20
2.6 Stres Oksidatif.....	22
2.7 Hubungan antara Latihan Fisik Aerobik dan Fungsi Vaskular.....	24
2.8 Hubungan antara Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. dan Fungsi Vaskular	26
2.9 Kerangka Teori.....	27
2.10 Kerangka Konsep.....	28
3. METODE PENELITIAN.....	29
3.1 Desain Penelitian.....	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.3 Subjek Penelitian.....	30
3.4 Penetapan Jumlah Hewan Coba.....	30
3.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	31
3.6 Prosedur Penelitian.....	31
3.7 Variabel Penelitian.....	41

3.8 Alur Penelitian.....	42
3.9 Analisis Data.....	42
3.10 Definisi Operasional.....	43
4. HASIL PENELITIAN.....	45
4.1 Perbandingan Kadar NO pada Semua Kelompok.....	45
4.2 Perbandingan Kadar ET-1 pada Semua Kelompok.....	46
4.3 Perbandingan Aktivitas Spesifik SOD pada Semua Kelompok.....	47
4.4 Perbandingan Kadar MDA pada Semua Kelompok.....	48
4.5 Korelasi antara NO, ET-1, Aktivitas Spesifik SOD dan MDA.....	49
4.6 Analisis Multivariat Pengaruh MDA, SOD, dan ET-1 terhadap NO.....	50
4.7 Analisis Multivariat Pengaruh MDA dan SOD terhadap ET-1.....	50
4.8 Analisis Multivariat Pengaruh NO dan MDA terhadap SOD.....	50
5. PEMBAHASAN.....	51
5.1 Pertambahan Usia dan Disfungsi Endotel.....	52
5.2 Pertambahan Usia dan Stres Oksidatif.....	52
5.3 Perubahan pada Kontrol.....	53
5.4 Perubahan pada Latihan Fisik Aerobik.....	55
5.5 Perubahan pada Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L.....	58
5.6 Perubahan pada Latihan Fisik Aerobik dan Pemberian <i>H.</i> <i>sabdariffa</i> L.....	59
6. SIMPULAN DAN SARAN.....	62
6.1 Simpulan.....	62
6.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	67
ARTIKEL PENELITIAN.....	84
RIWAYAT HIDUP	99

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Pembagian kelompok tikus.....	29
Tabel 4.1	Analisis korelasi antara NO, ET-1, SOD, dan MDA.....	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn.....	10
Gambar 2.2	Struktur kimia antosianidin.....	11
Gambar 2.3	Rentang warna antosianidin.....	11
Gambar 2.4	Sintesis NO dari L-Arginin.....	15
Gambar 2.5	Jalur Sintesis ET-1.....	16
Gambar 2.6	Interaksi antara NO dan ET-1 dalam Pengaturan Tonus Vaskular Kondisi Fisiologi Normal.....	17
Gambar 2.7	Dinding Arteri dalam Kondisi Sehat.....	18
Gambar 2.8	Interaksi antara NO dan ET-1 dalam Pengaturan Tonus Vaskular Kondisi Hilangnya <i>Bioavailability</i> NO.....	19
Gambar 2.9	Dinding Arteri dalam Kondisi Disfungsi Endotel.....	20
Gambar 2.10	Tahap Aterosklerosis.....	21
Gambar 2.11	Pengaruh Stres Oksidatif dan Disfungsi Endotel.....	22
Gambar 4.1	Perbandingan kadar NO pada semua kelompok.....	45
Gambar 4.2	Perbandingan kadar ET-1 pada semua kelompok.....	46
Gambar 4.3	Perbandingan aktivitas spesifik SOD pada semua kelompok.....	47
Gambar 4.4	Perbandingan kadar MDA pada semua kelompok.....	48
Gambar 4.5	<i>Scatter dot</i> antara NO dan aktivitas spesifik SOD.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Lolos Kaji Etik.....	67
Lampiran 2	Metode Pembuatan Ekstrak.....	68
Lampiran 3	Kebutuhan Sediaan Harian.....	69
Lampiran 4	Kurva Standar Protein.....	72
Lampiran 5	Rerata Kadar Protein.....	73
Lampiran 6	Kurva Standar NO.....	74
Lampiran 7	Rerata Kadar NO.....	75
Lampiran 8	Kurva Standar ET-1.....	76
Lampiran 9	Rerata Kadar ET-1.....	77
Lampiran 10	Kurva Standar Aktivitas SOD.....	78
Lampiran 11	Rerata Aktivitas SOD.....	79
Lampiran 12	Kurva Standar MDA.....	80
Lampiran 13	Rerata Kadar MDA.....	81
Lampiran 14	Sertifikat Pengujian Antioksidan dan Fitokimia.....	82
Lampiran 15	Sertifikat Pengujian Antosianin.....	83

DAFTAR SINGKATAN

ACSM	: <i>American College of Sports Medicine</i>
AHA	: <i>American Heart Association</i>
CDC	: <i>Central for Disease Control and Prevention</i>
EDRF	: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
eNOS	: <i>endothelial NO synthase</i>
ET-1	: <i>Endothelin-1</i>
ET-2	: <i>Endothelin-2</i>
ET-3	: <i>Endothelin-3</i>
FITT/FIDT	: <i>Frequency, Intensity, Time/Duration, and Type of Activity</i>
GPx	: <i>Glutation Peroxidase</i>
HR _{max}	: <i>Heart Rate Maximal</i>
ICAM-1	: <i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
JNC	: <i>Joint National Committee</i>
MDA	: <i>Malondialdehyd</i>
NHANES	: <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
ox LDL	: <i>Oxidized LDL</i>
PECAM-1	: <i>Platelete-endothelial adhesion molecules-1</i>
PJK	: <i>Penyakit Jantung Koroner</i>
Riskesmas	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
VCAM-1	: <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VSMC	: <i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data dari WHO, penderita penyakit kardiovaskular diduga akan terus meningkat. Diperkirakan 17,3 juta orang meninggal akibat penyakit kardiovaskular pada tahun 2008 yang merepresentasikan 30% dari seluruh kematian di dunia.^{1,2} Pada tahun 2030 diperkirakan 23,6 juta orang meninggal akibat penyakit kardiovaskular. Berdasarkan data dari *American Heart Association* (AHA 2011) penyebab kematian akibat penyakit kardiovaskular sebesar 229,6 per 100.000 penduduk Amerika. Penyakit kardiovaskular merupakan salah satu penyebab dari tiga penyebab kematian utama di Amerika.²

Beberapa penyakit yang termasuk ke dalam penyakit vaskular adalah hipertensi, penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke. Berdasarkan data nasional Riset Kesehatan Dasar 2013 (Riskesdas 2013) prevalensi hipertensi di Indonesia sebesar 25,8%, penyakit jantung koroner adalah sebesar 1,5%, dan prevalensi stroke di Indonesia adalah sebesar 12,1 per 1000 penduduk.³ Prevalensi penyakit jantung koroner dan stroke terlihat meningkat seiring dengan peningkatan umur responden. Berdasarkan data nasional dari Riskesdas 2007 proporsi penyebab kematian lima terbesar pada kelompok umur lima tahun ke atas di daerah perkotaan adalah stroke (19,4%), diabetes melitus (9,7%), hipertensi (7,5%), tuberkulosis (7,3%) dan penyakit jantung iskemik (6,5%).⁴

Salah satu proses patologis yang mendasari penyakit kardiovaskular adalah aterosklerosis. Aterosklerosis diawali oleh disfungsi endotel yang terjadi pada masa anak – anak karena berbagai faktor risiko. Berdasarkan penelitian Hong YM (2010)⁵ pada 50% anak – anak di Amerika usia 10 – 14 tahun terdapat tanda awal aterosklerosis yang didasari oleh adanya stres oksidatif akibat berbagai sebab, seperti: makanan yang tidak sehat, inaktivitas fisik, obesitas, dan lain-lain. Untuk mencegah disfungsi endotel, pada penelitian ini dilakukan latihan fisik

aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. pada tikus usia juvenil (5 minggu) yang setara dengan anak usia 10 tahun pada manusia.^{6,7} Demikian pula penelitian Junqueira VBC dkk (2004)⁸, dijelaskan bahwa pertambahan usia dapat menyebabkan stres oksidatif.

American College of Sports Medicine (ACSM)⁹ merekomendasikan latihan fisik intensitas sedang selama 30 menit selama lima sampai tujuh kali per minggu. *World Health Organization* (WHO)^{1,10} merekomendasikan latihan fisik intensitas sedang selama 30 menit sebanyak 5 kali dalam satu minggu atau selama 150 menit dalam satu minggu.

Latihan fisik yang dilakukan secara teratur dapat memperbaiki disfungsi endotel melalui mekanisme peningkatan *vascular shear stress* akibat peningkatan aliran darah. Peningkatan *vascular shear stress* akan meningkatkan fosforilasi *endothelial NO synthase* (eNOS), sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas eNOS. Dengan demikian *bioavailability Nitric Oxide* (NO) akan meningkat, sehingga produksi NO akan meningkat. Hal ini akan menghambat produksi *Endothelin-1* (ET-1), sehingga fungsi vaskular akan meningkat.¹¹⁻¹³

Stres oksidatif dapat menyebabkan *bioavailability* NO berkurang sehingga menyebabkan hipertensi dan aterosklerosis. Berkurangnya produksi NO menyebabkan peningkatan ET-1 terhadap reseptornya (ET_A/ET_B) bertambah sehingga kadar kalsium di sel otot polos vaskular meningkat, menyebabkan vasokonstriksi, dan akan mengakibatkan hipertensi.^{10,11}

Berdasarkan penelitian Utami TP (2014)¹⁴ kadar malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar jantan juvenil usia 5 minggu kelompok latihan fisik aerobik selama 8 minggu lebih tinggi dibandingkan kontrol. Salah satu herba yang memiliki efek antioksidan kuat dan dapat mencegah stres oksidatif adalah *Hibiscus sabdariffa* Linn.^{15,16} Antioksidan berperan dalam mendonorkan elektronnya sehingga mencegah oksidasi. *Hibiscus sabdariffa* Linn. mengandung antosianin yang berperan sebagai antioksidan. Pada penelitian Kahanjak DN (2014)¹⁷ menjelaskan bahwa ekstrak air *Hibiscus sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas GPx

pada sindrom *overtraining*. Oleh karena itu, *Hibiscus sabdariffa* Linn. diharapkan dapat mencegah stres oksidatif dan mencegah disfungsi endotel.

Berdasarkan studi patologi Jarvisalo MJ dkk (2010)¹⁸ dijelaskan bahwa aorta abdominal adalah tempat deposit lemak pertama pada anak-anak pada risiko aterosklerosis. Penelitian Padilla J dkk (2013)¹⁹ juga menjelaskan bahwa aorta abdominal lebih mudah mengalami aterosklerosis dibandingkan aorta torasis pada tikus.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan pada tikus juvenil. Untuk melihat bahwa penambahan usia dapat menyebabkan stres oksidatif, maka penelitian ini dilakukan pada tikus usia anak, remaja, dan dewasa. Pada penelitian ini, akan digunakan homogenat aorta abdominal untuk mengukur kadar NO, ET-1, MDA dan aktivitas spesifik *Superoxide Dismutase* (SOD). MDA merupakan hasil peroksidasi lipid akibat radikal bebas yang sering dipakai untuk menentukan stres oksidatif. SOD adalah antioksidan primer, lini pertama yang mengubah superoksida menjadi H₂O₂. Untuk mencegah disfungsi endotel karena radikal bebas, pada penelitian ini sejak tikus usia juvenil diberi *Hibiscus sabdariffa* Linn. yang mengandung antosianin dan berfungsi sebagai antioksidan. Latihan fisik diketahui dapat menjaga fungsi vaskular sehingga latihan fisik dapat dilakukan untuk mengurangi faktor risiko penyakit kardiovaskular. Namun, penelitian – penelitian yang menjelaskan manfaat latihan fisik aerobik dan pemberian antioksidan pada anak - anak masih sedikit. Penelitian pada manusia memerlukan waktu yang lama, sehingga penelitian awal dapat dilakukan terlebih dahulu pada hewan percobaan yang waktu hidupnya lebih singkat.

Pertanyaan penelitian:

1. Bagaimana pengaruh latihan fisik aerobik terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol?
2. Bagaimana pengaruh *H. sabdariffa* L. terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol?

3. Bagaimana pengaruh latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol?
4. Adakah korelasi di antara NO dan ET-1, NO dan aktivitas spesifik SOD, NO dan MDA, ET-1 dan aktivitas spesifik SOD, ET-1 dan MDA, aktivitas spesifik SOD dan MDA?

1.3 Hipotesis

1. Latihan fisik aerobik meningkatkan kadar NO, menurunkan kadar ET-1, meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
2. Pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan kadar NO, menurunkan kadar ET-1, meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
3. Latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih meningkatkan kadar NO, lebih menurunkan kadar ET-1, lebih meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan lebih menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
4. Terdapat korelasi antara NO dan ET-1, NO dan aktivitas spesifik SOD, NO dan MDA, ET-1 dan aktivitas spesifik SOD, ET-1 dan MDA, aktivitas spesifik SOD dan MDA.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Menganalisis potensi latihan fisik aerobik dan pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn. terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada tikus juvenil hingga dewasa.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh latihan fisik aerobik terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol.

2. Menganalisis pengaruh *H. sabdariffa* L. terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol.
3. Menganalisis pengaruh latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. terhadap kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA pada berbagai tingkat usia dibandingkan kontrol.
4. Menganalisis korelasi di antara NO dan ET-1, NO dan aktivitas spesifik SOD, NO dan MDA, ET-1 dan aktivitas spesifik SOD, ET-1 dan MDA, aktivitas spesifik SOD dan MDA.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi berbagai pihak, khususnya kepada masyarakat supaya latihan fisik aerobik diaplikasikan sejak usia anak – anak dan memberikan informasi mengenai penggunaan *Hibiscus sabdariffa* Linn. sebagai antioksidan alami dalam mencegah disfungsi endotel.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 LATIHAN FISIK

Aktivitas fisik adalah gerak tubuh yang dihasilkan oleh kerja otot - otot rangka yang akan menghasilkan pengeluaran energi melebihi pengeluaran energi pada saat istirahat dan diukur dalam kilokalori. Setiap orang melakukan aktivitas fisik dalam kehidupannya sehari – hari. Bentuk aktivitas fisik amat bervariasi sehingga memberi gambaran gaya hidup setiap orang. Latihan fisik (*exercise*) adalah serangkaian aktivitas fisik yang terencana, terstruktur dan berirama dengan intensitas tertentu dalam jangka waktu tertentu, dilakukan berulang - ulang dan bertujuan untuk meningkatkan atau memelihara kesehatan serta kebugaran jasmani. Olahraga (*sport*) adalah serangkaian aktivitas fisik yang dilakukan secara terstruktur dengan berpedoman pada aturan – aturan atau kaidah – kaidah tertentu tetapi tidak terikat pada intensitas dan waktunya.²⁰

Latihan fisik yang dilakukan berulang – ulang secara terus menerus dapat menimbulkan adaptasi. Adaptasi ini merupakan perubahan fungsi fisiologis yang terjadi sebagai akibat terhadap latihan fisik dalam jangka waktu tertentu. Respons akut latihan fisik aerobik pada sistem kardiovaskular adalah peningkatan curah jantung, peningkatan frekuensi denyut jantung, peningkatan tekanan darah sistolik, sedikit peningkatan tekanan arteri rata – rata dan tekanan darah diastolik.

21

Adaptasi jangka panjang yang disebabkan oleh latihan fisik aerobik adalah penurunan tekanan darah. Latihan yang teratur akan menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sehingga resistensi perifer menurun, dan pada akhirnya menyebabkan penurunan tekanan darah. Pada penderita hipertensi ringan latihan fisik aerobik jangka panjang dapat menurunkan tekanan darah sistolik dan diastolik (dalam keadaan istirahat) sebesar 6-7 mmHg.²¹

WHO^{1,10} merekomendasikan latihan fisik aerobik intensitas sedang selama 30 menit 5 – 7 kali per minggu pada pasien dengan hipertensi esensial ringan sedang. Berdasarkan pedoman ini efek baik akan muncul setelah 10 minggu ketika pasien melakukan latihan fisik setidaknya 30 menit dan setidaknya 3 kali seminggu.

Definisi kebugaran jasmani menurut *American College of Sports Medicine* (ACSM)⁹ adalah kemampuan fisik seseorang untuk melakukan berbagai aktivitas fisik. Komponen kemampuan fisik ada 3, yaitu komponen yang berkaitan dengan keterampilan, komponen yang berkaitan dengan kesehatan, dan komponen fisiologis. Komponen yang berkaitan dengan keterampilan berhubungan dengan kinerja keterampilan motorik dan olahraga prestasi, seperti ketangkasan, keseimbangan, koordinasi, kecepatan, kekuatan, dan kecepatan reaksi. Komponen yang berkaitan dengan kesehatan adalah daya tahan jantung paru, daya tahan kekuatan otot, kelenturan, dan komposisi tubuh. Kebugaran jasmani yang berkaitan dengan kesehatan adalah kemampuan fisik untuk melakukan kegiatan sehari – hari dari yang ringan sampai berat, dan pengaruhnya terhadap penurunan risiko penyakit tidak menular. Komponen fisiologis adalah komponen yang berhubungan dengan sistem biologi, meliputi metabolik, morfologi, dan integritas tulang.¹⁷

Latihan fisik secara umum disusun mengikuti prinsip – prinsip dasar yang dikenal dengan FITT/FIDT, yang merupakan singkatan dari: *frequency, intensity, time/duration*, dan *type of activity*. Frekuensi adalah jumlah latihan per minggu. Menurut *American College of Sports Medicine* (ACSM)⁹ dan *American Heart Association* (AHA)⁹ minimal lima kali seminggu untuk intensitas sedang atau minimal tiga kali seminggu untuk intensitas berat.

Intensitas adalah ukuran berat ringannya suatu beban latihan. Berdasarkan denyut nadi maksimal pada latihan selama 20 – 60 menit, ACSM^{22,23} mengklasifikasikan intensitas sangat ringan (< 57% HR_{max}), ringan (57 – 63% HR_{max}), sedang (64-76% HR_{max}), berat (77 – 95% HR_{max}) dan mendekati maksimal ($\geq 96\%$ HR_{max}). Cara termudah untuk menentukan intensitas olahraga yang tepat dan memantau tingkat intensitas adalah dengan memeriksa denyut

jantung. Perkiraan kecepatan denyut jantung maksimal ditentukan dengan mengurangi angka 220 dengan usia seseorang.^{9,11}

Durasi (waktu) adalah berapa lama latihan berlangsung. Menurut ACSM⁹ dan AHA, dilakukan 30 menit per hari untuk intensitas sedang atau 20 menit per hari untuk intensitas berat. Tipe adalah jenis atau bentuk aktivitas fisik yang dipilih untuk latihan. Jenis latihan ini dapat aerobik atau anaerobik atau kombinasi keduanya. Untuk kesehatan yang dianjurkan adalah jenis latihan fisik aerobik. Dengan menggunakan prinsip FITT, perencanaan kegiatan latihan fisik akan dapat tepat sasaran karena volume latihan dapat diperhitungkan, namun juga sekaligus mencakup variasi kegiatannya.^{17,23}

Latihan fisik aerobik adalah bentuk latihan fisik yang sumber energi utamanya didapat dari sistem oksidatif aerob (memerlukan ketersediaan oksigen). Latihan fisik dengan intensitas ringan sampai sedang menggunakan sistem energi aerob. Jalan kaki, jogging, lari maraton, bersepeda, berenang, dan senam merupakan bentuk latihan aerobik yang dianjurkan untuk dilakukan oleh karena dapat memperbaiki status kesehatan. ACMS menganjurkan agar seseorang melakukan olahraga aerobik minimal tiga kali seminggu selama 20 sampai 60 menit untuk mengurangi risiko hipertensi dan penyakit arteri koronaria serta untuk meningkatkan kemampuan kerja fisik.¹¹

Latihan fisik aerobik melibatkan banyak kelompok otot dan dilakukan pada intensitas yang cukup rendah dan untuk jangka waktu yang cukup lama sehingga sumber – sumber bahan bakar dapat diubah menjadi ATP dengan menggunakan siklus asam sitrat dan rantai transpor elektron sebagai jalur metabolik utama. Latihan fisik aerobik dapat dipertahankan dari 15 – 20 menit hingga beberapa jam dalam satu kalinya. Aktivitas jangka pendek berintensitas tinggi misalnya angkat beban dan lari cepat 100 meter, yang berlangsung dalam hitungan detik bergantung pada energi yang disimpan di otot dan glikolisis anaerobik, adalah bentuk olahraga anaerobik (tanpa oksigen).¹¹

2.2 *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Hibiscus sabdariffa Linn. atau yang dikenal dengan rosella, akhir – akhir ini sedang naik daun dan mulai dibicarakan oleh banyak orang. Dalam taksonomi tumbuhan, *Hibiscus sabdariffa* Linn. masih berkerabat dekat dengan kembang sepatu. Klasifikasi tanaman ini adalah:²⁴⁻⁶

- Kingdom : Plantae (tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (berpembuluh)
- Superdivisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)
- Divisio : Magnoliophyta (berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
- Sub-kelas : Dilleniidae
- Ordo : Malvales
- Familia : Malvaceae (suku kapas-kapasan)
- Genus : *Hibiscus*
- Spesies : *Hibiscus sabdariffa* Linn

Hibiscus sabdariffa Linn. merupakan tanaman semak yang tumbuh tegak dan bercabang. Batang berwarna merah, berbentuk bulat dan berbulu. Pohon rosella merah tumbuh dari biji atau benih dengan ketinggian yang bisa mencapai 3 – 5 meter serta mengeluarkan bunga hampir sepanjang tahun.²⁵⁻⁶

Bunga rosella bertipe tunggal yaitu hanya terdapat satu kuntum bunga pada setiap tangkai bunga. Tangkai bunga berukuran 5 – 20 mm. Bunganya berbentuk lonceng, mempunyai 8-11 helai kelopak yang berbulu dengan panjang 1 cm, pangkal saling berlekatan dan berwarna merah. Mahkota bunga rosella berwarna merah sampai kuning dengan warna lebih gelap di bagian tengahnya. Tangkai sari merupakan tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran pendek dan tebal. Putik berbentuk tabung dan berwarna kuning atau merah.

Bunga bersifat hermaphrodit sehingga mampu melakukan penyerbukan sendiri. Daunnya tunggal, berbentuk bulat telur, pertulangan menjari, ibu tulang daun kemerahan, tangkai daun pendek, letaknya berseling 3-5 helai dengan panjang 7,5 – 12,5 cm, berwarna hijau dan pinggirannya bergerigi. Buah kapsul berbentuk bulat telur, ukuran buah 13-22 mm x 11-20 mm, tiap buah berisi 30 – 40 biji. Ukuran biji 3 – 5 mm x 2 – 4 mm, warna coklat kemerahan.²⁴⁻⁶



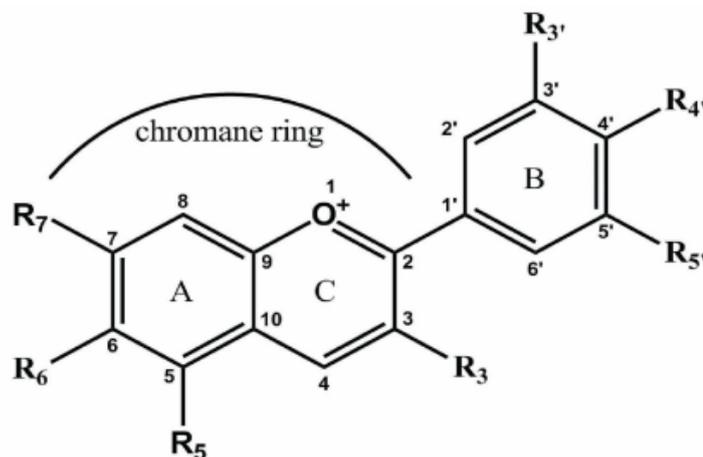
Gambar 2.1: *Hibiscus sabdariffa* Linn.²⁴

Hibiscus sabdariffa Linn. diperkirakan berasal dari Asia (India sampai Malaysia) atau daerah tropis Afrika. Tanaman ini dapat tumbuh dan berkembang di seluruh dunia, terutama daerah tropis. Tanaman ini banyak dibudidayakan di Eropa. Di negara lain dikenal sebagai roselle atau red sorrel (Inggris), oseille rouge (Prancis), karkade (Afrika Utara), lou shen kui atau lou shen hua (Cina), jamaican sorrel (India Barat), meshta (India), dan lain – lain.²⁵⁻⁷

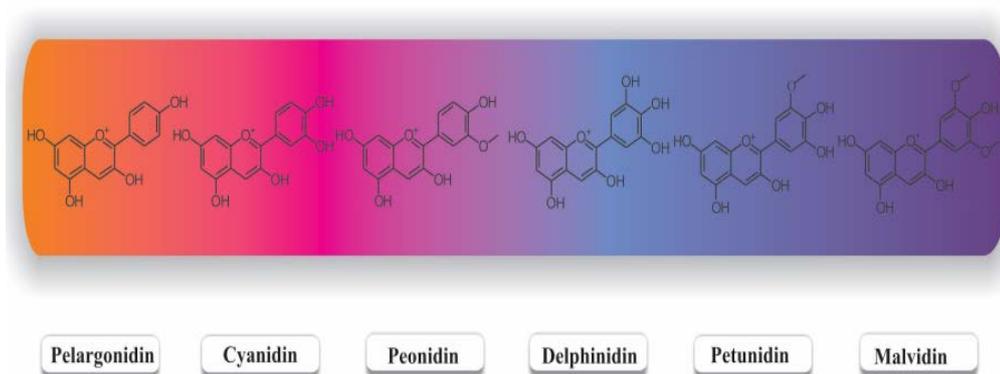
Hibiscus sabdariffa Linn. di Indonesia pertama kali ditemukan di pulau Jawa pada tahun 1576, tepatnya di halaman sebuah rumah, oleh ahli botani asal Belanda yang bernama M. De L'Obel.²⁵⁻⁶ Tanaman ini diduga dibawa oleh pedagang India saat datang ke Indonesia sekitar abad ke-14. Rosella di Indonesia

dikenal dengan nama daerah gamet walanda (Sunda), kasturi roriha (Ternate), mrambos hijau (Jawa Tengah), asam jarot (Padang), asam rejang (Muara Enim), dan lain-lain.²⁵⁻⁶

Kandungan kimia tanaman ini adalah antosianin yang menyebabkan warna merah pada tanaman ini. Warna antosianidin berbeda-beda tergantung dari jumlah kelompok hidroksil yang melekat pada molekul. Antosianin mengandung delphinidin-3-siloglukosida, delphinidin-3-glukosida, sianidin-3-siloglukosida, sedangkan flavonoidnya mengandung gosipetin dan mucilago (rhamnolakturonan, arabinogalaktan, arabinan).^{24,27,28}



Gambar 2.2: Struktur kimia antosianidin²⁸



Gambar 2.3: Rentang warna antosianidin²⁸

Bunga *Hibiscus sabdariffa* Linn. mengandung campuran asam sitrat dan asam malat, dua antosianin; gosipetin (hidroksiflavin) dan hibiskin, asam

askorbat. Mahkota bunga mengandung glikosida-flavon hibiskritin, yang mengandung aglikon hibisketin. Akar rosela mengandung saponin dan asam tartrat. Daun tanaman ini mengandung protein, lemak, karbohidrat, serat, abu, kalsium, fosfor, zat besi, tiamin, β -karoten, riboflavin, niasin, dan asam askorbat.²⁷

Tanaman herbal ini memiliki khasiat sebagai antioksidan, anti-hipertensi, anti-hiperlipidemia, antikanker, hepatoprotektor, serta sebagai antikanker. Bahan aktifnya adalah antosianin. Kandungan antosianin ini membuat warna merah pada kaliks dari *Hibiscus sabdariffa* Linn. Sifat antioksidan dari antosianin tergolong lebih tinggi dibandingkan dengan antioksidan lainnya, seperti vitamin E, asam askorbat, dan β -karoten.^{24,27,29}

Sifat antioksidan kuat dari *Hibiscus sabdariffa* Linn. telah banyak diteliti. Penelitian yang dilakukan oleh Kahanjak DN (2014)¹⁷ menjelaskan bahwa ekstrak air *Hibiscus sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari dapat mencegah sindrom *overtraining* berdasarkan penurunan kadar MDA dan peningkatan aktivitas GPx pada tikus Wistar. Penelitian yang dilakukan oleh Ilyas E.I.I dkk (2014)¹⁵ menjelaskan bahwa pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn. dapat mencegah penurunan kadar IGFBP-3 pada tikus dengan *overtraining*, yang menjelaskan sifat antioksidan yang dimilikinya dapat mencegah terjadinya sindrom *overtaining* akibat peningkatan ROS.

Nilai LD₅₀ ekstrak mahkota bunga rosela pada tikus di atas 5000 mg/kgBB. Nilai LD₅₀ yang sama juga diperoleh untuk ekstrak air dan ekstrak etanol biji rosela. Pada uji toksisitas subkronis ditemukan bahwa nilai SGOT, SGPT, *alkaline fosfatase*, bilirubin dan albumin berada dalam rentang nilai normal. Urea dan kreatinin sebagai indikator fungsi ginjal juga dalam nilai normal.²⁴

2.3 Fungsi Vaskular

Endotel memiliki peran penting dalam regulasi fungsi vaskular dengan memproduksi sejumlah besar substansi yang aktif secara biologi yang berperan dalam regulasi tonus vaskular, pertumbuhan sel, inflamasi, dan trombosis/homeostasis. Disfungsi endotel adalah awal perkembangan penyakit kardiovaskular dan berhubungan erat dengan aterosklerosis dan hipertensi.¹³

Sel endotel adalah lapisan tunggal sel epitel khusus yang melapisi lumen semua pembuluh darah, melepaskan berbagai mediator kimiawi yang berperan penting dalam mengatur diameter arteriol secara lokal. Selama ini ilmuwan menganggap sel endotel tidak lebih dari sawar antara darah dan bagian dinding pembuluh lainnya. Kini diketahui bahwa sel endotel berperan aktif dalam berbagai aktivitas yang berkaitan dengan pembuluh darah.¹¹

Sel endotel berfungsi melapisi bagian dalam pembuluh darah dan rongga jantung; berfungsi sebagai sawar fisik antara darah dan bagian dinding pembuluh darah lainnya. Sel endotel mengeluarkan: mediator vasoaktif sebagai respons terhadap perubahan kimiawi dan fisika lokal; bahan – bahan ini menyebabkan relaksasi (vasodilatasi) atau kontraksi (vasokonstriksi) otot polos di bawahnya. Mengeluarkan bahan – bahan yang merangsang pertumbuhan pembuluh baru dan proliferasi sel otot polos di dinding pembuluh darah. Ikut serta dalam pertukaran bahan antara darah dan sel jaringan sekitar menembus kapiler melalui transpor vesikel. Mempengaruhi pembentukan sumbat trombosit, pembekuan darah, dan pelarutan bekuan darah. Ikut serta menentukan permeabilitas kapiler dengan berkontraksi untuk mengubah ukuran pori antara sel – sel endotel yang berdekatan. Berbagai mediator vasoaktif lokal ini bekerja pada otot polos untuk mengubah keadaan kontraksinya.¹¹

Sel – sel endotel membentuk suatu organ yang besar dan penting. Organ ini mengeluarkan zat mediator vasoaktif. Zat – zat vasoaktif tersebut antara lain nitrat oksida dan endotelin.^{30,31}

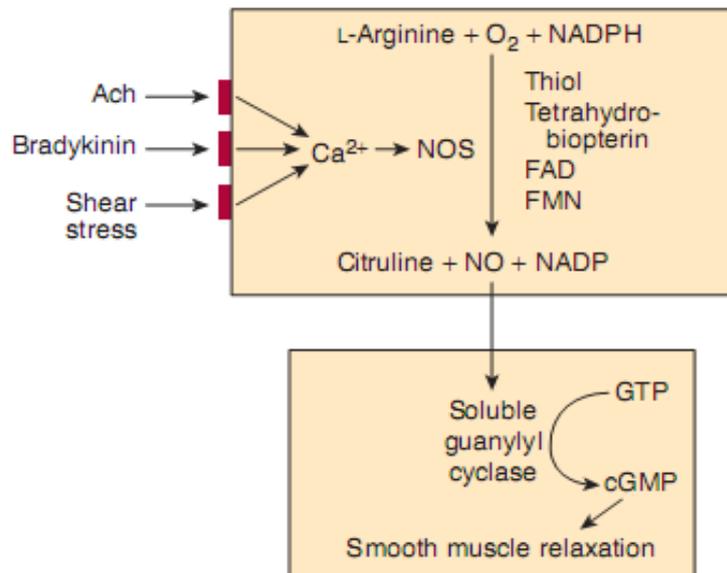
2.3.1 Nitric Oxide

Nitric Oxide (NO) adalah gas yang tidak berwarna, kelarutannya dalam air sedang (2 mM pada suhu 20°C, sekitar 1,6 mM pada suhu 20°C), dan lebih larut dalam pelarut organik. NO dapat berdifusi melintasi membran sel. NO adalah radikal bebas karena memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbitnya. NO dalam skala reaktivitas radikal bebas termasuk golongan lemah dan bereaksi lambat. Literatur dalam reaksi radikal bebas NO difokuskan pada reaksi NO dengan superoksida yang menghasilkan peroksinitrit.³²

Nitric Oxide adalah mediator vasoaktif lokal yang menyebabkan vasodilatasi arteriol dengan memicu relaksasi otot polos arteriol. Melalui efek ini, NO berperan penting dalam mengontrol aliran darah melalui jaringan dan dalam mempertahankan tekanan darah arteri rerata.¹¹

NO dahulu dikenal sebagai *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). NO disintesis dari L-Arginin dalam suatu reaksi yang dikatalisis oleh NO sintase. Asetilkolin, bradikinin dan *shear stress* meningkatkan konsentrasi kalsium intrasel sehingga mengaktifkan NOS. L-Arginin dikatalisis oleh NOS menjadi NO. NO yang terbentuk di endotel berdifusi ke dalam sel otot polos, kemudian mengaktifkan guanilil siklase yang larut dalam sel, dan menghasilkan siklik GMP. Siklik GMP selanjutnya bertindak sebagai perantara relaksasi otot polos vaskular.³⁰

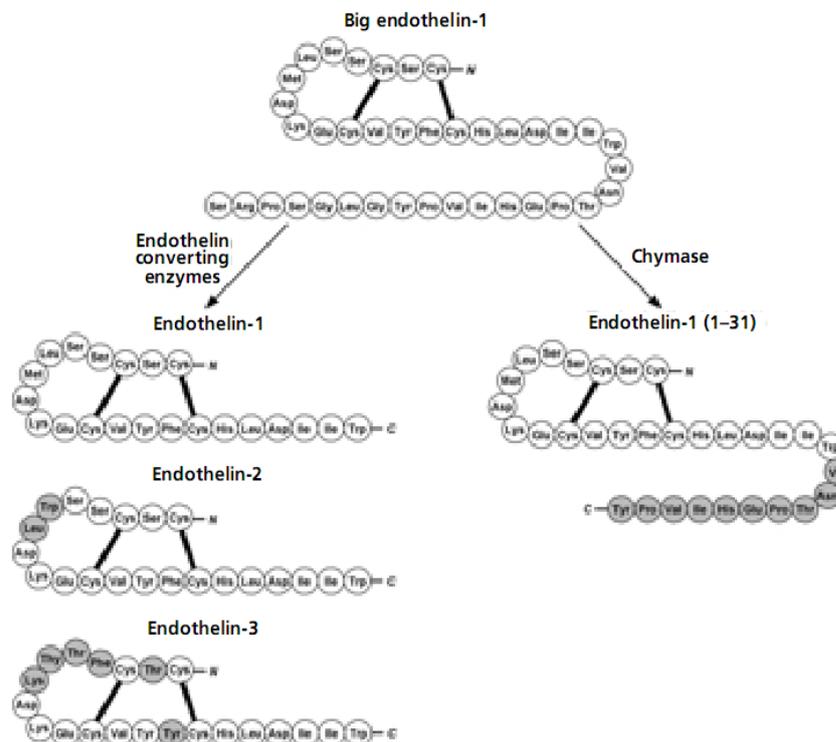
NO dapat menyebabkan vasodilatasi. Produksi siklik GMP intraselular yang meningkat, menghambat masuknya kalsium pemicu kontraksi ke dalam sel – sel otot polos, sehingga menyebabkan penurunan kalsium sitoplasmik, sehingga menyebabkan vasodilatasi. Mekanisme lain melalui aktivasi kanal kalium yang menyebabkan hiperpolarisasi sehingga menyebabkan relaksasi sel – sel otot polos. Produksi NO distimulus oleh *shear stress* (yang terjadi selama latihan fisik), asetilkolin, dan bradikinin. Produksi NO dihambat melalui inhibisi terhadap NOS, misalnya oleh karena stres oksidatif atau inflamasi.¹³



Gambar 2.4: Sintesis NO dari L-Arginin³⁰

2.3.2 Endotelin-1

Endotelin merupakan bahan vasoaktif endotel yang menyebabkan kontraksi otot polos, dan merupakan salah satu vasokonstriktor paling kuat. Struktur endotelin yang unik mirip dengan struktur sarafotoksin, yaitu polipeptida yang terdapat pada racun ular. Terdapat tiga bentuk isoform endothelin, yaitu endothelin-1 (ET-1), endothelin-2 (ET-2), dan endothelin-3 (ET-3). ET-1, ET-2, dan ET-3 adalah anggota dari tiga famili polipeptida serupa yang mengandung 21-asam amino setiap polipeptida dikode oleh gen yang berbeda yang diubah oleh *endothelin converting enzymes* (ECE) dari *big endothelin-1* (bET-1).^{11,30,31}



Gambar 2.5: Jalur sintesis ET-1³¹

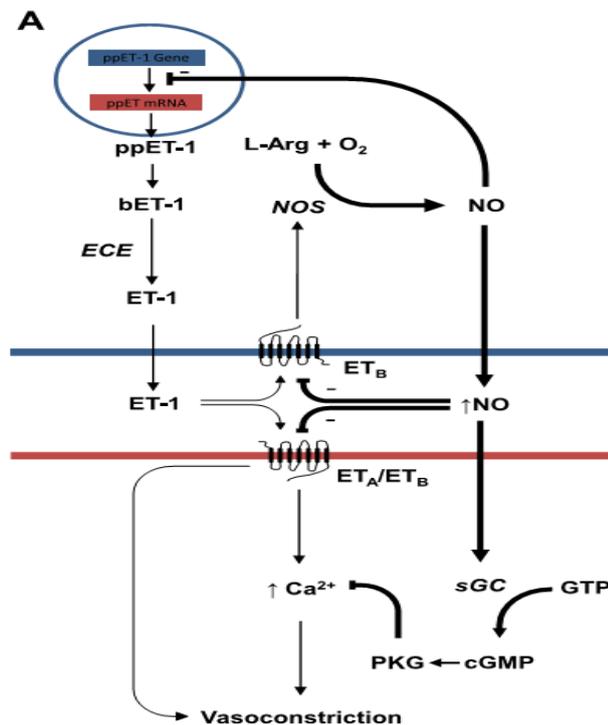
Tempat produksi utama ET-1 adalah di sel endotel vaskular. ET-1 juga diproduksi di jantung, ginjal, SSP, dan hipofisis posterior. ET-2 diproduksi di sel endotel, jantung, dan ginjal. ET-3 diekspresikan di endokrin, gastrointestinal, dan susunan saraf pusat, tidak pada sel endotel.^{30,31}

ET-1 adalah isoform yang utama diekspresikan di pembuluh darah (sel endotel vaskular) dan merupakan vasokonstriktor potent. ET-1 melaksanakan fungsinya dengan berikatan dengan *G protein-coupled ET reseptors*, yang diekspresikan pada jaringan vaskular, juga pada miokardium, paru, pankreas, limpa dan jaringan saraf. Ada dua reseptor endothelin, yaitu ET_A dan ET_B. Reseptor ET_A terletak di dalam sel otot polos vaskular (VSMC), sementara reseptor ET_B terletak pada endotel dan VSMC. Pengikatan ET-1 terhadap reseptor ET_A dan ET_B pada VSMC menyebabkan vasokonstriksi, dengan predominansi pengikatan ET-1 terhadap reseptor ET_B di endotel meningkatkan sintesis NO.¹³

ET-1 meningkat oleh berbagai rangsangan seperti: hormon vasoaktif, faktor pertumbuhan, hipoksia, lipoprotein, radikal bebas, endotoksin dan siklosporin. Produksi ET-1 dihambat oleh NO, nitrovasodilator, peptida natriuretik, heparin, dan prostaglandin.^{30,31}

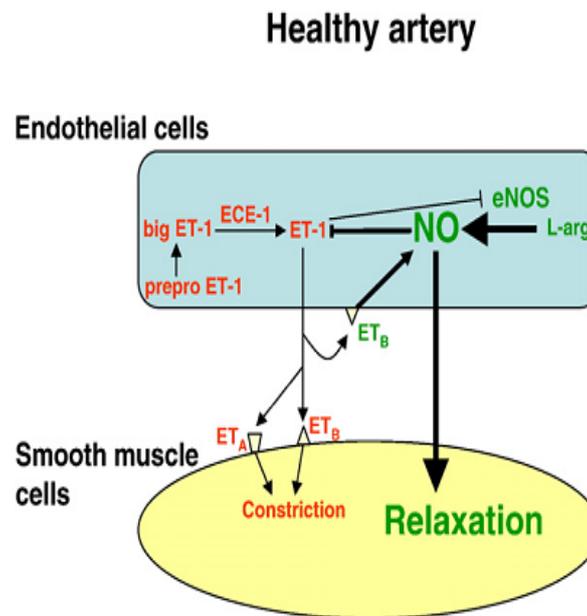
2.4 Interaksi NO dan ET-1 dalam Menjaga Tonus Vaskular

Pada manusia yang sehat ET-1 berperan dalam tonus vasokonstriktor basal melalui reseptor ET_A . Pengikatan reseptor ET_B oleh ET-1 menyebabkan peningkatan produksi NO dalam kadar yang rendah, di bawah kadar yang dapat menyebabkan vasodilatasi yang dapat menghambat sintesis dan pelepasan ET-1. NO dapat menghambat pelepasan dan aktivitas ET-1.¹³



Gambar 2.6: Skema interaksi antara NO dan ET-1 dalam pengaturan tonus vaskular kondisi fisiologi normal¹³

Pada arteri yang sehat, ET-1 diproduksi dalam jumlah sedikit dan sebaliknya *bioavaililty* NO dipertahankan. Hal ini menyebabkan relaksasi pembuluh darah melalui peningkatan sinyal siklik GMP.¹²



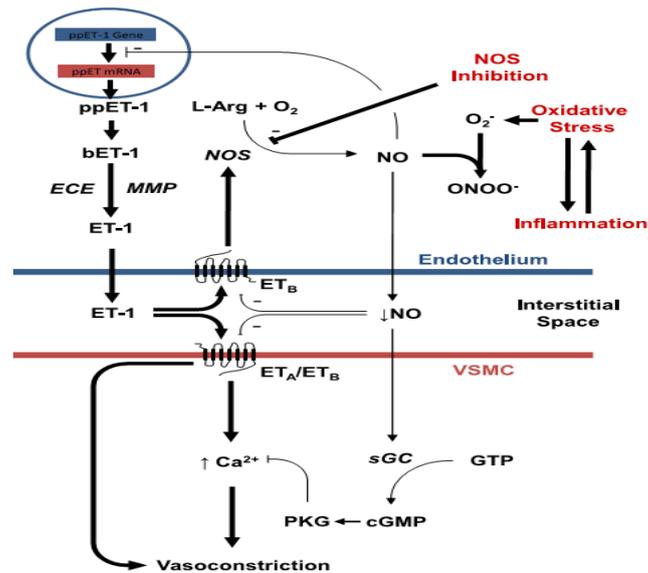
Gambar 2.7: Skema dinding arteri dalam kondisi sehat¹²

2.5 Efek Disfungsi Endotel terhadap Fungsi Vaskular

Endotel berperan penting sebagai regulator homeostasis vaskular. Endotel mengeluarkan sejumlah mediator yang memiliki efek vasoprotektif yang menyebabkan vasodilatasi, menekan pertumbuhan sel otot polos, dan menghambat respons inflamasi. Efek ini diperantarai oleh NO sebagai vasodilator endogen yang paling poten. NO menghambat ET-1 dan menghambat oksidasi *low-density lipoprotein*. Defek dalam produksi atau aktivitas NO dapat menyebabkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel adalah penanda awal aterosklerosis dan dapat dideteksi sebelum perubahan struktural pembuluh darah terlihat melalui angiografi atau ultrasonografi.³³

Dalam keadaan hilangnya *bioavaililty* NO karena beberapa kondisi seperti: inhibisi NOS, stres oksidatif, dan inflamasi, ET-1 menyebabkan vasokonstriksi dan remodeling, sehingga dapat menyebabkan hipertensi dan

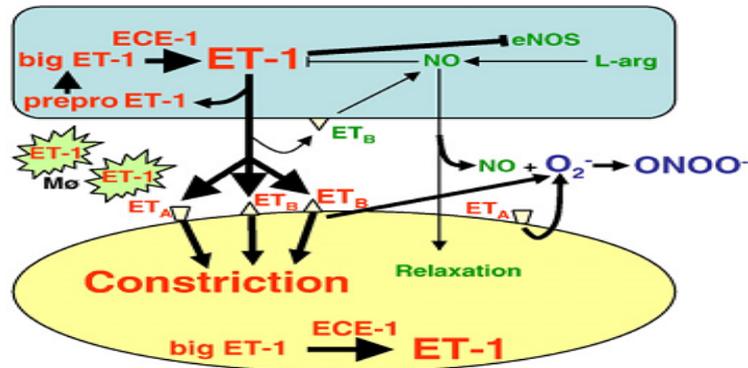
aterosklerosis. Pada pasien dengan hipertensi dan aterosklerosis, sensitivitas vaskular terhadap reseptor ET-1 meningkat.¹³



Gambar 2.8: Skema interaksi antara NO dan ET-1 dalam pengaturan tonus vaskular dalam kondisi hilangnya *bioavailability* NO¹³

Peningkatan ekspresi reseptor ET_B pada sel otot polos yang memediasi vasokonstriksi. ET-1 dapat menurunkan ekspresi eNOS, sehingga menurunkan produksi NO. Kedua reseptor ET_A dan reseptor ET_B pada sel otot polos dapat memediasi pembentukan superoksida pada disfungsi endotel. Superoksida akan menurunkan *bioavailability* NO dengan membentuk peroksinitrit, sehingga produksi ET-1 meningkat yang dapat mengakibatkan hipertensi.¹²

Endothelial dysfunction



Gambar 2.9: Skema dinding arteri dalam kondisi disfungsi endotel¹²

2.5.1 Aterosklerosis

Aterosklerosis adalah penyakit degeneratif progresif pada arteri yang menyebabkan oklusi (sumbatan bertahap) pembuluh tersebut, mengurangi aliran darah yang melaluinya. Aterosklerosis ditandai oleh plak – plak yang terbentuk di bawah lapisan dalam pembuluh di dinding arteri.¹¹

Untuk dapat memahami evolusi alamiah aterosklerosis banyak peneliti telah melakukan otopsi mayat pada berbagai usia. Pada pembuluh darah koroner terlihat penonjolan yang diikuti dengan garis lemak (fatty streak) pada intima pembuluh yang timbul sejak usia di bawah 10 tahun. Garis lemak ini mula – mula timbul pada aorta dan arteri koroner. Berdasarkan data dari Hong YM (2010) pada 50% anak – anak di Amerika usia 10 – 14 tahun terdapat tanda awal aterosklerosis.⁵

Penelitian di Jepang berdasarkan hasil otopsi pada usia 1 bulan – 39 tahun, mendapatkan bahwa pada usia < 1 tahun, sebesar 29% terdapat *fatty streaks* pada aortanya dan sebesar 3,1% pada arteri koroner anak usia 1 – 9 tahun. Pada *Bogalusa Heart Study*, prevalensi plak fibrosa pada aorta dan arteri koroner pada 204 pasien usia 2-39 tahun sebanyak 50% pada usia 2-15 tahun, dan meningkat sebesar 85% pada usia 21-39 tahun.⁵

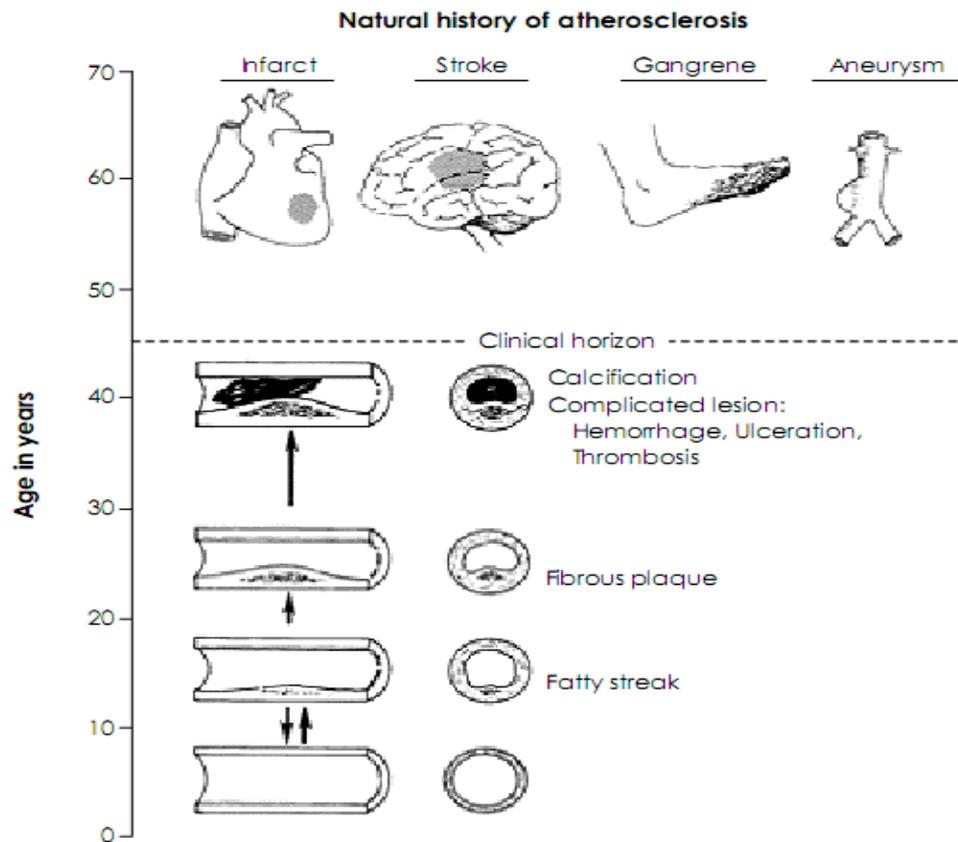


Fig. 1. Natural history of atherosclerosis.

Gambar 2.10: Tahap aterosklerosis⁵

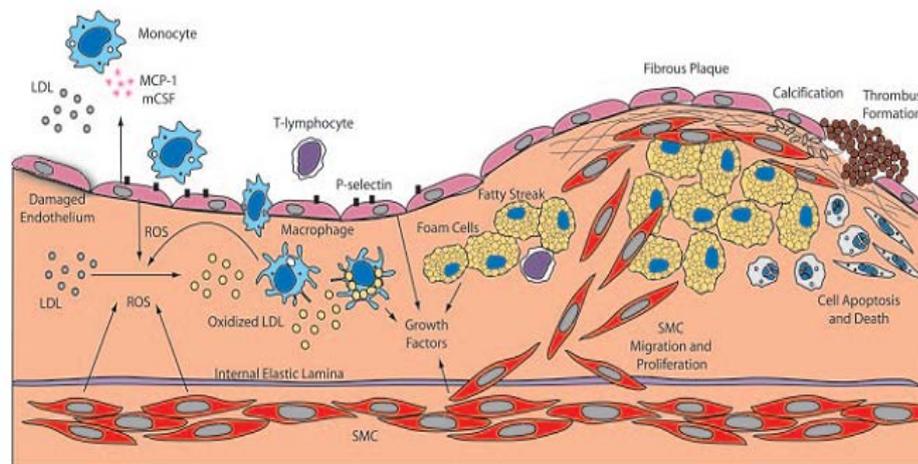
Disfungsi endotel yang mengawali aterosklerosis dimulai saat masa anak – anak. Ketika endotel pembuluh darah terpapar kolesterol LDL dan radikal bebas, terjadi perubahan permeabilitas endotel. Endotel menjadi lebih permeabel terhadap limfosit dan monosit. Terjadi adhesi monosit dan migrasi monosit ke dalam lapisan dalam intima. Setelah masuk ke dalam lapisan intima, monosit menetap permanen, membesar dan menjadi sel fagositik besar yang disebut makrofag. Kolesterol LDL berakumulasi di antara endotel dan jaringan ikat dan dioksidasi. LDL teroksidasi menghambat pelepasan vasodilator nitrat oksida (NO) dan peningkatan produksi dan aktivitas biologis vasokonstriktor poten endothelin 1 (ET-1).^{5,11,12,34,35}

Tahap aterosklerosis selanjutnya adalah makrofag menfagosit LDL teroksidasi sampai sel ini dipenuhi butir – butir lemak sehingga tampak berbusa

yang disebut dengan *foam cell*. *Foam cell* menumpuk di bawah dinding pembuluh darah dan membentuk *fatty streak*.^{1,5,11,34,35}

Inti lipid berakumulasi di bawah endotel, jaringan parut fibrosa terbentuk untuk melapisi inti lipid. Sel otot polos membelah dan berkontribusi terhadap penebalan intima. Kalsifikasi diendapkan dalam plak, terbentuklah plak fibrosa stabil.^{1,5,11,34,35}

Makrofag dapat melepaskan enzim yang melarutkan kolagen dan mengubah plak stabil menjadi tidak stabil. Plak tidak stabil memiliki tudung fibrosa tipis yang mudah pecah, memajukan kolagen dan mengaktifasi trombosit untuk memulai pembekuan darah (*thrombus*).^{1,5,11,34,35}



Gambar 2.11: Pengaruh stres oksidatif dan disfungsi endotel³⁵

2.6. Stres Oksidatif

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Molekul ini memiliki jumlah elektron yang ganjil. Molekul ini bersifat tidak stabil dalam keadaan elektron yang tidak memiliki pasangan, dan menjadi sangat reaktif dengan molekul lain untuk mencapai kestabilan molekular.²⁹

Radikal bebas yang berasal dari oksigen dikenal dengan *Reactive oxygen species* (ROS), contohnya adalah superoksida, radikal hidroksil, dan hidrogen peroksida, asam hipoklorit. ROS dapat bereaksi dengan makromolekul di dalam tubuh seperti protein, lipid, dan asam nukleat. ROS memiliki kemampuan untuk mengoksidasi *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) yang terdapat dalam struktur membran sel. Reaksi ini menyebabkan peroksidasi lipid, reaksi berantai yang menghasilkan malondialdehid (MDA). MDA merupakan hasil peroksidasi lipid di dalam tubuh akibat radikal bebas, yang sering dipakai untuk menentukan stres oksidatif.^{11,29,36}

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang, ketika kapasitas oksidan melebihi kapasitas antioksidan, sehingga keseimbangan homeostatis terganggu. Dalam kehidupan sehari – hari tubuh terpapar oleh species reaktif dalam kadar tinggi dari berbagai sumber di luar tubuh (seperti polusi lingkungan) dan stres oksidatif juga berhubungan dengan berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskular, inflamasi, penyakit metabolik dan neurodegeneratif, kanker, dan proses penuaan. Diet yang mengandung antioksidan dapat mengontrol stres oksidatif.³⁷

Sejak lebih dari dua dekade telah dilaporkan berbagai penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif. Salah satunya adalah penyakit kardiovaskular. Spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) terutama anion superoksida, merupakan molekul sinyal pada sel – sel kardiovaskular. Peningkatan produksi superoksida ini akan menyebabkan inaktivasi *Nitric Oxide* (NO) yang akan mengakibatkan penumpukan peroksinitrit. ROS berperan dalam pertumbuhan, apoptosis, dan migrasi sel – sel otot polos pembuluh, modulasi fungsi endotel, modifikasi matriks ekstrasel. Hal ini berperan penting dalam mencetuskan penyakit kardiovaskular, seperti hipertensi.³⁸

Untuk melawan species reaktif tubuh kita dilengkapi dengan sistem pertahanan antioksidan yang sangat efektif. Jenis – jenis antioksidan adalah nonenzimatik, enzimatik, dan yang didapat dari makanan. Contoh antioksidan nonenzimatik yang berasal dari sumber endogen adalah glutathion, asam urat, asam lipoat, bilirubin, dan koenzim Q10. Antioksidan nonenzimatik sering merupakan hasil metabolisme selular. Antioksidan enzimatik yang utama adalah enzim

superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase (GPX) dan glutathion reduktase. Antioksidan yang didapat dari makanan, yaitu tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), karotenoid (β -karoten), flavonoid (antosianin), lignan, tannin.³⁷

Superoksida Dismutase (SOD) adalah salah satu antioksidan enzimatis yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. SOD dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, sehingga berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. SOD bekerja sebagai antioksidan yang menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi stabil. SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutase dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 .^{37,39}

2.7. Hubungan antara Latihan Fisik Aerobik dan Fungsi Vaskular (NO dan ET-1)

Latihan fisik merupakan salah satu mekanisme penting yang meningkatkan aliran darah. Aliran darah yang meningkat selama latihan fisik memicu suatu gaya longitudinal pada permukaan dalam pembuluh darah yang dikenal sebagai *vascular shear stress* pada sel endotel. Aliran darah ini menimbulkan kekuatan gesekan (friksi) pada permukaan sel endotel dari lumen pembuluh darah. Dengan demikian, peningkatan aliran darah akan menyebabkan peningkatan *vascular shear stress* meningkat.^{11,40,41}

Peningkatan tekanan darah dan aliran darah selama latihan fisik menyebabkan terjadinya *shear stress* terhadap dinding pembuluh darah. *Shear stress* tersebut memicu sel endotel memproduksi dan melepaskan berbagai mediator yang berperan dalam menjaga fungsi vaskular.⁴²

Peningkatan *shear stress* menyebabkan *up-regulation endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) mRNA dan protein (transkripsi dan translasi), hal ini menyebabkan sel endotel memproduksi *nitric oxide* dalam jumlah yang banyak, sehingga menyebabkan peningkatan fungsi vaskular.⁴¹

Shear stress mengaktifkan molekul sinyal multipel, termasuk protein kinase C (PKC), FAK, cSRC, *Rho family* GTPases, PI3K, dan MAPKs. Dengan

demikian *shear stress* dapat mengaktifkan molekul *mechano-sensing multipel*. Dan menyebabkan inisiasi dan propagasi sinyal melalui jalur berbagai jaringan.⁴²

Penelitian – penelitian eksperimental menjelaskan bahwa *shear stress* memediasi mekanotransduksi, seperti *phosphatidyl-inositol-3-kinase/Akt pathway*, *c-Src*, *heat shock protein*, *hypoxia-inducible factor-1 pathway*, *Ras/Raf/MEK/ERK pathway*, berkontribusi terhadap upregulasi endothelial NOS (eNOS) mRNA dan eNOS protein selama latihan fisik.¹⁰

Dalam kondisi fisiologis, peran dasar NO di dalam pembuluh darah adalah menghambat efek vasokonstriktor dari ET-1, sehingga menjaga tonus vaskular. NO dan ET-1 berada dalam keseimbangan. NO dan ET-1 adalah mediator alami yang bekerja berlawanan dalam fungsi vaskular. NO dan ET-1 berinteraksi melalui mekanisme langsung maupun tidak langsung. Bukti – bukti menunjukkan bahwa keseimbangan di antar kedua mediator penting dalam fungsi vaskular, dan sudah sangat jelas bahwa ketidakseimbangan di antara kedua mediator ini merupakan karakteristik disfungsi endotel dan berperan penting dalam progresi penyakit vaskular. NO memodulasi aktivitas ET-1, NO menghambat fungsi ET-1. Dalam keadaan *bioavailabilty* NO menghilang, ET-1 akan menyebabkan vasokonstriksi dan *remodelling* serta disfungsi vaskular.¹³

Latihan fisik yang dilakukan secara teratur efektif memperbaiki disfungsi endotel melalui mekanisme peningkatan *vascular shear stress* akibat peningkatan aliran darah. Peningkatan *vascular shear stress* akan meningkatkan fosforilasi eNOS, sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas eNOS, dengan demikian *bioavailability* NO akan meningkat, sehingga produksi NO akan meningkat dan inaktivasi NO akan berkurang. Hal ini akan menghambat produksi ET-1, sehingga fungsi vaskular akan meningkat.^{12,13}

Pada penelitian Goto dkk (2007)¹⁰ pada delapan laki – laki sehat yang melakukan latihan fisik aerobik intensitas sedang selama 30 menit didapatkan peningkatan *bioavailability* NO. Latihan fisik dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas *endothelial NO synthase* (eNOS), sehingga mengakibatkan peningkatan kadar NO. Latihan fisik meningkatkan *vascular shear stress* di seluruh tubuh, kemudian akan meningkatkan ekspresi dan aktivitas eNOS, sehingga menyebabkan peningkatan NO baik pada manusia maupun hewan percobaan.

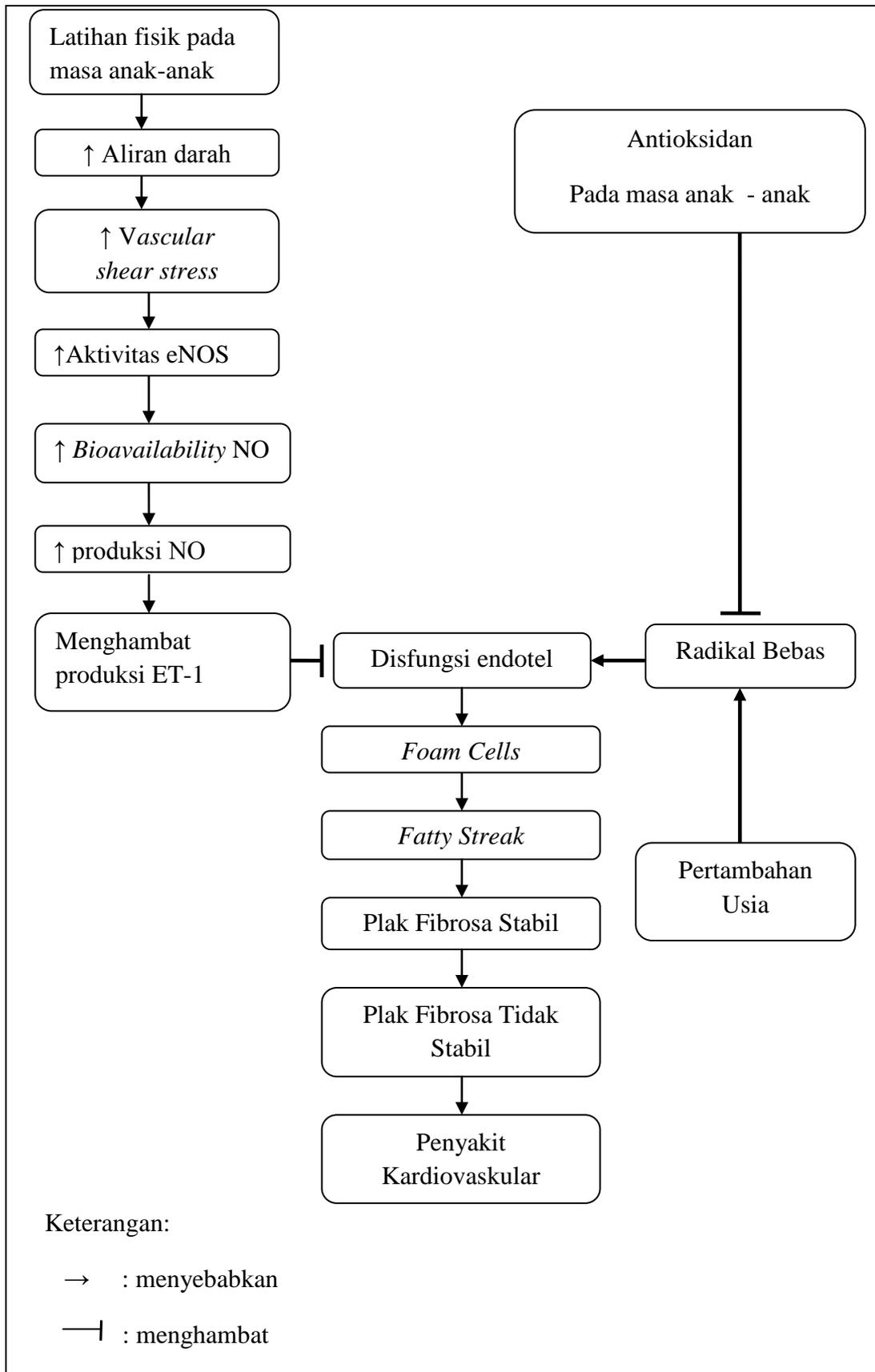
2.8. Hubungan antara Pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn. dan Fungsi Vaskular (NO dan ET-1)

Hibiscus sabdariffa Linn. adalah suatu antioksidan poten. Indonesia kaya akan tanaman rempah yang mengandung antioksidan seperti *Hibiscus sabdariffa* Linn. atau rosella, yang juga dikenal sebagai “teh merah”. Tanaman ini termasuk ke dalam famili Malvaceae dan sering digunakan sebagai antihipertensi, antioksidan, antikanker, antipiretik, antibakterial, anti-inflamasi, dan anti-hiperlipidemi. Kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* Linn. digunakan sebagai fitofarmaka dimana komponen aktif utamanya adalah antosianin. Dalam kondisi tertentu, antosianin memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi jika dibandingkan vitamin E, asam askorbat, dan β -carotene.^{27,29}

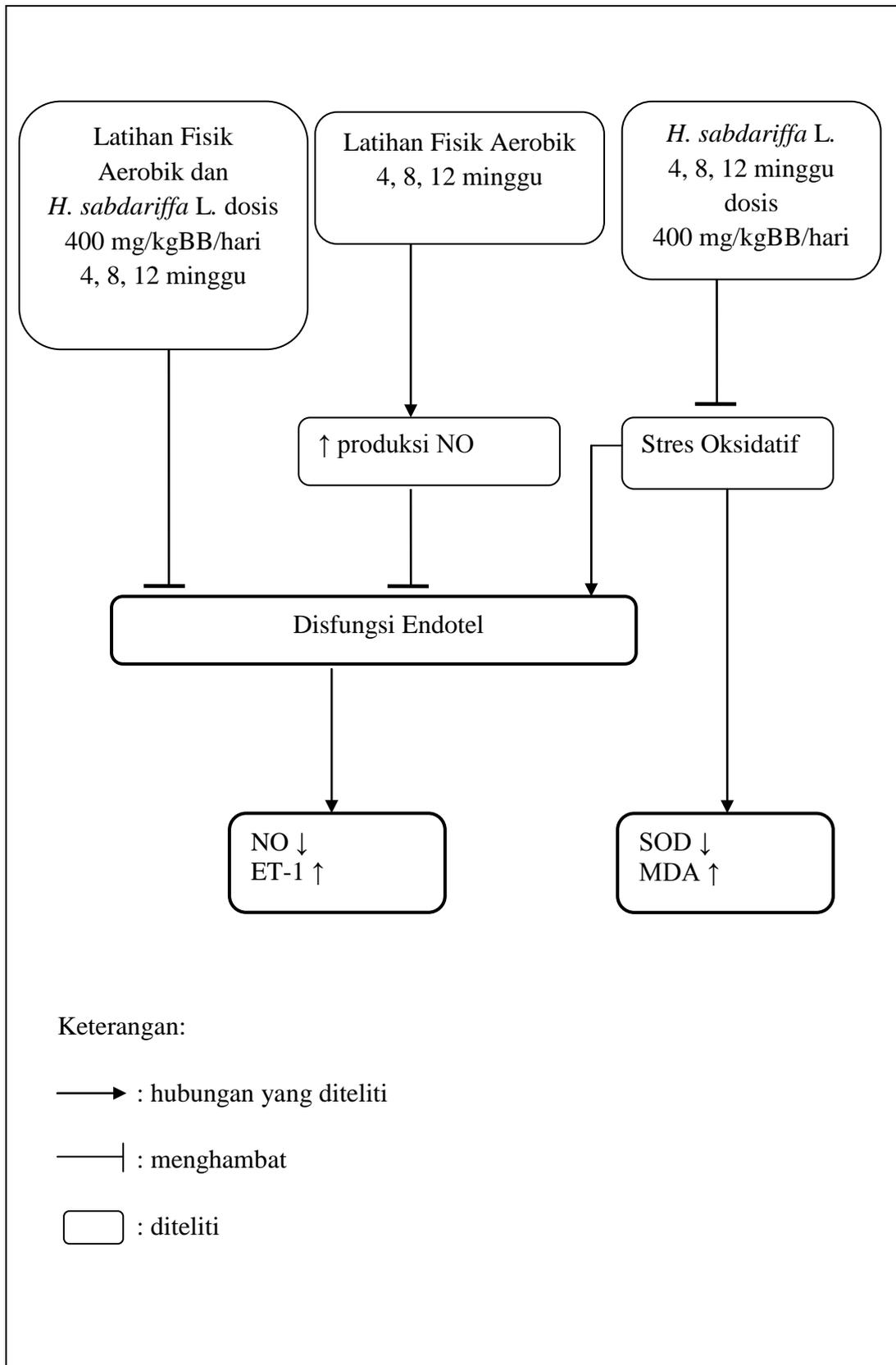
NO dan superoksida (radikal bebas) secara biologis bekerja saling berlawanan. Penambahan SOD dapat memperkuat efek NO. Penambahan SOD dapat memperlambat kehilangan NO. Penambahan SOD menghilangkan superoksida dengan mengubahnya menjadi H_2O_2 , sehingga dapat meningkatkan kadar NO.³²

Dalam keadaan hilangnya *bioavailabilty* NO karena beberapa kondisi seperti: inhibisi NOS, stres oksidatif, dan inflamasi, terjadi vasokonstriksi yang dapat menyebabkan hipertensi dan aterosklerosis. Stres oksidatif menyebabkan *bioavailability* NO menurun, sehingga produksi NO menurun. Penurunan NO menyebabkan hilangnya hambatan terhadap pengikatan ET-1 dan reseptor ET_A / ET_B , sehingga dapat berikatan, menyebabkan peningkatan kalsium intraselular, sehingga menyebabkan vasokonstriksi.^{12,13}

Kerangka Teori



Kerangka Konsep



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan coba. Tikus dibagi secara acak kedalam 12 kelompok. Pembagian kelompok tikus disajikan pada Tabel 3.1 berikut ini:

Tabel 3.1. Pembagian kelompok tikus

Kode	Kelompok
K4	Kontrol 4 minggu
K8	Kontrol 8 minggu
K12	Kontrol 12 minggu
L4	Latihan fisik aerobik 4 minggu
L8	Latihan fisik aerobik 8 minggu
L12	Latihan fisik aerobik 12 minggu
H4	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. 4 minggu
H8	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. 8 minggu
H12	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. 12 minggu
HL4	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. dan latihan fisik aerobik 4 minggu
HL8	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. dan latihan fisik aerobik 8 minggu
HL12	Pemberian <i>H. sabdariffa</i> L. dan latihan fisik aerobik 12 minggu

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI dan Laboratorium Terpadu FKUI pada bulan Juli - November 2015. Penelitian ini telah lolos kaji etik dengan surat keterangan lolos kaji etik no: 796/UN2.F1/ETIK/2015 terdapat pada Lampiran 1.

3.3 Subjek Penelitian (Hewan Coba)

Hewan coba yang digunakan adalah 36 tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) sehat, berusia 4 minggu dengan berat badan berkisar antara 60 – 70 gram. Sebelum dilakukan latihan fisik aerobik (kelompok L dan HL), tikus terlebih dahulu diaklimatisasi dengan berlari menggunakan *treadmill* selama 1 minggu. Sebelum dan selama perlakuan, kesehatan tikus dijaga agar tidak sakit. Tikus diberi makanan standar dan minuman secara *ad libitum* dengan porsi sesuai usia dan jumlah tikus di dalam kandang sebanyak 3 ekor tiap kandang. Kandang dijaga kebersihannya serta diatur 12 jam terang dan 12 jam gelap. Suhu lingkungan dijaga pada suhu 23 ± 1 °C. Diperhatikan pula hal lain sesuai dengan kode etik komisi penanganan dan penggunaan hewan coba.

3.4 Penetapan Jumlah Hewan Coba

Berdasarkan rumus Federer, apabila t merupakan jumlah kelompok perlakuan sama dengan 15, sedangkan n merupakan jumlah tikus tiap kelompok, maka n dapat dihitung dengan rumus :

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

$$(12-1)(n-1) \geq 15$$

$$11n-11 \geq 15$$

$$11n \geq 15 + 11$$

$$11n \geq 26$$

$$n \geq 26/11$$

$$n \geq 2,36$$

Sehingga pada penelitian ini jumlah hewan coba per kelompoknya adalah 3 ekor, dan total digunakan tikus Wistar 36 ekor.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah: ekstrak etanol *Hibiscus sabdariffa* Linn. yang diperoleh dan dianalisis % antioksidan dan kandungan fitokimia dari lembaga Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO) serta analisis kadar antosianin dari Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Kementerian Pertanian, aorta abdominal dari hewan coba untuk dianalisis kadar NO, ET-1, MDA, dan SOD, kit pengukuran NO, kit pengukuran ET-1, kit pengukuran SOD, TBA 0,67%, TCA 20%, TEP 1:80.000.

3.5.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan adalah treadmill tikus, *stopwatch*, kandang tikus, timbangan berat badan untuk tikus, gelas ukur, sonde, alat bedah minor, *Elisa reader*, nanodrop, *sonicator*, *incubator shaker*, waterbath, sentrifus, *cuvette reader*, tip biru, tip kuning, Eppendorf 1,5 ml dan 2 ml, tabung, *cuvette*.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Seleksi hewan coba.

Hewan coba yang menjadi subjek penelitian memenuhi kriteria sebagai berikut: tikus jantan galur Wistar, sehat, berusia 4 minggu.

3.6.2 Aklimatisasi hewan coba.

Dilakukan selama satu minggu dengan tujuan untuk mengadaptasikan hewan coba ke kondisi penelitian. Selama periode tersebut, hewan coba kelompok latihan fisik aerobik dan kelompok kombinasi latihan fisik aerobik yang disertai pemberian *H. sabdariffa* L. melakukan *treadmill* dengan kecepatan bertahap sampai mencapai kecepatan 9 m/menit selama 10 menit setiap hari, sedangkan kelompok kontrol dan pemberian *H. sabdariffa* L. diletakkan pada *treadmill* tikus yang tidak difungsikan selama 10 menit setiap hari selama 5 hari.⁴³

3.6.3 Latihan fisik aerobik dengan menggunakan *treadmill* tikus.

Latihan fisik aerobik menggunakan *treadmill* tikus dengan kecepatan yang ditingkatkan secara bertahap dan dipertahankan pada intensitas sedang sesuai protokol dari Hsu YC⁴³ dan Lontoh S⁴⁴ yang telah diadaptasi juga oleh Utami TP¹⁴. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 5 minggu dimulai dengan kecepatan 12 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 7 minggu dimulai dengan kecepatan 15 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia lebih dari 9 minggu dimulai dengan kecepatan 20 m/menit. Latihan fisik aerobik dilakukan dengan frekuensi 5x dalam seminggu, durasi latihan 20 menit dengan 90 detik istirahat setiap 5 menit berlari untuk menghindari kelelahan.

3.6.4 Pemberian ekstrak etanol *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Dilakukan pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. dan kelompok kombinasi latihan fisik aerobik yang disertai pemberian *H. sabdariffa* L. dengan dosis 400 mg/kgBB/hari selama 5 hari/minggu selama 4, 8, dan 12 minggu, secara oral dengan menggunakan sonde khusus. Pemberian dosis harian *H. sabdariffa* L. disesuaikan dengan berat badan tikus yang diukur setiap hari hingga waktu dekapitasi. Metode pembuatan ekstrak terdapat pada Lampiran 2. Kebutuhan sediaan harian terdapat pada Lampiran 3.

3.6.5 Pengambilan Aorta Abdominal

Pada akhir masa perlakuan, dilakukan dekapitasi dengan dislokasi servikal tanpa anestesi. Selanjutnya, dilakukan pembedahan untuk mendapatkan aorta abdominal. Aorta kemudian disimpan di dalam *freezer* dengan suhu -80°C sampai pembuatan homogenat.

3.6.6 Pembuatan Homogenat

Jaringan aorta abdominal dibuat menjadi 10% homogenat jaringan (100 mg/mL) dalam medium yang mengandung 10mM tris-HCL, 0,1 mM

EDTA-2Na, 10 mM sukrosa, 0,8% NaCl dengan pH 7,4. Selanjutnya, homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4° C selama 10 menit. Supernatan diambil dan digunakan untuk pengukuran kadar NO, aktivitas SOD, dan MDA.

Pembuatan homogenat aorta abdominal untuk mengukur kadar ET-1 menggunakan PBS (0,01 mol/L, pH 7,0-7,2). Selanjutnya, homogenat disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g pada suhu 4° C selama 5 menit, diambil supernatannya.

3.6.7 Pengukuran Parameter yang Diperiksa

3.6.7.1 Pengukuran Kadar Protein

Pengukuran kadar protein menggunakan metode Warburg-Christian. Protein menyerap cahaya pada daerah ultraviolet dengan panjang gelombang 280 nm.

Bahan dan pereaksi:

1. Homogenat aorta abdominal
2. BSA 1 mg/ μ L (1000 μ g/mL)

Pembuatan kurva standar:

1. Konsentrasi 50 μ g/mL: BSA 50 μ L dicampur dengan 950 μ L aquabides.
2. Konsentrasi 100 μ g/mL: BSA 100 μ L dicampur dengan 900 μ L aquabides.
3. Konsentrasi 200 μ g/mL: BSA 200 μ L dicampur dengan 800 μ L aquabides.
4. Konsentrasi 300 μ g/mL: BSA 300 μ L dicampur dengan 700 μ L aquabides.
5. Konsentrasi 400 μ g/mL: BSA 400 μ L dicampur dengan 600 μ L aquabides.
6. Konsentrasi 500 μ g/mL: BSA 500 μ L dicampur dengan 500 μ L aquabides.

7. Konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$: BSA 1000 μL .

Prosedur pelaksanaan:

1. Sampel sebanyak 10 μL dicampur dengan 90 μL aquabides.
2. Serapan dibaca pada panjang gelombang 280 nm.
3. Dari kurva standar diperoleh $a= 0,0007$, $b= 0,0007$, dan $r= 0,9998$.
(Lampiran 4)
4. Kadar protein sampel dihitung menggunakan kurva standar.

3.6.7.2 Pengukuran Kadar NO

Pengukuran kadar NO menggunakan kit yang mengukur total nitrit dalam sampel melalui 2 tahap, yaitu: mengubah nitrat menjadi nitrit menggunakan *nitrate reductase* kemudian mengubah nitrit menjadi senyawa azo berwarna ungu tua menggunakan *Griess reagent*. Pengukuran kadar NO menggunakan *Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit* dari BioVision dengan nomor katalog #K262-200.

Bahan dan pereaksi:

3. Homogenat aorta abdominal
4. Standar nitrit
5. *Assay buffer*
6. *Nitrate reductase*
7. *Enzyme cofactor*
8. *Enhancer*
9. *Griess Reagent R1*
10. *Griess Reagent R2*

Pembuatan kurva standar:

1. Larutan standar: 5 μL (100mM) standar nitrit dicampur 495 μL *assay buffer*.
2. Konsentrasi 0 nmol/sumur: 85 μL *assay buffer*.

3. Konsentrasi 2 nmol/sumur: 2 μL larutan standar dicampur dengan 83 μL *assay buffer*.
4. Konsentrasi 4 nmol/sumur: 4 μL larutan standar dicampur dengan 81 μL *assay buffer*.
5. Konsentrasi 6 nmol/sumur: 6 μL larutan standar dicampur dengan 79 μL *assay buffer*.
6. Konsentrasi 8 nmol/sumur: 8 μL larutan standar dicampur dengan 77 μL *assay buffer*.
7. Konsentrasi 10 nmol/sumur: 10 μL larutan standar dicampur dengan 75 μL *assay buffer*.

Prosedur pelaksanaan:

1. Blanko (*Assay Buffer*) sebanyak 200 μL dimasukkan pada sumur.
2. Seri standar (0, 2, 4, 6, 8, 10) sebanyak 85 μL dimasukkan pada sumur.
3. Sampel sebanyak 85 μL dimasukkan pada sumur.
4. *Assay Buffer* sebanyak 115 μL ditambahkan pada setiap sumur (standar dan sampel).
5. *Nitrate Reductase* sebanyak 5 μL ditambahkan pada setiap sumur (standar dan sampel).
6. *Enzyme Cofactor* sebanyak 5 μL ditambahkan pada setiap sumur (standar dan sampel).
7. Plat ditutup dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 1 jam untuk mengubah nitrat menjadi nitrit.
8. *Enhancer* sebanyak 5 μL ditambahkan pada setiap sumur dan diinkubasikan selama 10 menit (standar dan sampel).
9. *Griess Reagent R1* sebanyak 50 μL ditambahkan pada setiap sumur (standar dan sampel).
10. *Griess Reagent R2* sebanyak 50 μL ditambahkan pada setiap sumur (standar dan sampel).
11. Plat diinkubasikan pada suhu ruang selama 10 menit.
12. Serapan dibaca pada panjang gelombang 540 nm.

13. Kurva standar dibuat, diperoleh $a = 0,1535$, $b = -0,0004$, dan $r = 0,9998$. (Lampiran 5)
14. Kadar *nitric oxide* dihitung berdasarkan kurva standar.
15. Hasil konsentrasi NO dibagi dengan mg protein untuk mendapatkan satuan nmol/mg protein.

3.6.7.2 Pengukuran Kadar ET-1

Pengukuran kadar ET-1 menggunakan kit ELISA dari USCNK dengan nomor katalog CEA482Ra. Antibodi monoklonal yang spesifik terhadap ET-1 dilapisi di mikroplat. Reaksi inhibisi kompetitif terjadi antara ET-1 berlabel biotin (standar) dan ET-1 yang tidak berlabel (sampel) dengan antibodi spesifik terhadap ET-1 yang dilapisi pada mikroplat. Setelah periode inkubasi, konjugat yang tidak berikatan dibuang. Kemudian avidin yang berkonjugasi dengan HRP ditambahkan pada masing – masing well dan diinkubasikan. Jumlah konjugat HRP yang berikatan berbanding terbalik dengan konsentrasi ET-1 pada sampel. Setelah penambahan substrat, intensitas warna berbanding terbalik dengan konsentrasi ET-1 sampel.

Bahan dan pereaksi:

1. Homogenat aorta abdominal
2. Larutan stok standar 500 pg/mL (standar dicampur dengan 0,5 mL *standard diluent*)
3. *Detection reagent A*
4. *Detection reagent B*
5. *Wash solution*
6. *TMB substrate*

Pembuatan kurva standar:

1. Larutan standar 0 pg/mL
2. Larutan standar 3,90625 pg/mL

3. Larutan standar 15,625 pg/mL: 300 μ L larutan konsentrasi 31,25 pg/mL dicampur dengan 0,6 mL *standard diluent*.
4. Larutan standar 31,25 pg/mL: 300 μ L larutan konsentrasi 62,5 pg/mL dicampur dengan 0,6 mL *standard diluent*.
5. Larutan standar 62,5 pg/mL: 300 μ L larutan konsentrasi 125 pg/mL dicampur dengan 0,6 mL *standard diluent*.
6. Larutan standar 125 pg/mL: 300 μ L larutan konsentrasi 250 pg/mL dicampur dengan 0,6 mL *standard diluent*.
7. Larutan standar 250 pg/mL: 300 μ L stok standar dicampur dengan 0,6 mL *standard diluent*.

Prosedur pelaksanaan:

1. Standar 0; 3,90625; 15,625; 31,25; 62,5; dan 125 pg/mL sebanyak 50 μ L dimasukkan kedalam sumur.
2. *Detection Reagent A* sebanyak 50 μ L ditambahkan ke setiap sumur dengan cepat.
3. Plat ditutup dengan *plate sealer*.
4. Plat digoyang menggunakan *microplate shaker* dan inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C.
5. Plat dicuci 3x.
6. *Detection Reagent B* sebanyak 100 μ L ditambahkan ke sumur dan diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C.
7. Plat dicuci 5x.
8. *Substrate Solution* sebanyak 90 μ L ditambahkan kedalam sumur.
9. Plat diinkubasikan selama 25-25 menit pada suhu 37°C.
10. *Stop Solution* sebanyak 50 μ L ditambahkan kedalam sumur.
11. Serapan dibaca pada panjang gelombang 450 nm secepatnya.
12. Kurva standar dibuat, diperoleh $a = -0,4334$, $b = -0,3568$, dan $r = 0,9871$. (Lampiran 6)
13. Hasil konsentrasi ET-1 dibagi dengan mg protein untuk mendapatkan satuan ng/mg protein.

3.6.7.3 Pengukuran Aktivitas Spesifik SOD

Pengukuran kadar aktivitas spesifik SOD menggunakan kit RANDOX dengan nomor katalog SD125 . Metode yang digunakan adalah dengan menggunakan *xanthine oxidase* untuk menghasilkan radikal superoksida yang akan bereaksi dengan INT menghasilkan *red formazan dye*. Aktivitas SOD dapat diukur melalui derajat reaksi tersebut. Hasil yang didapat kemudian dibagi dengan kadar protein sampel untuk mendapatkan hasil nilai aktivitas spesifik SOD.

Bahan dan pereaksi:

1. Homogenat aorta abdominal
2. PBS 0,01 mol pH 7,0
3. *Mixed substrate*
4. *Xanthine oxidase*

Pembuatan kurva standar:

1. Konsentrasi 0,24125 U/mL: 0,5 mL PBS 0,01 mol/L pH 7.0 dicampur dengan 0,3 mL larutan konsentrasi 0,7237 U/mL.
2. Konsentrasi 0,72375 U/mL: 0,5 mL PBS 0,01 mol/L pH 7.0 dicampur dengan 0,5 mL larutan konsentrasi 1,4475 U/mL.
3. Konsentrasi 1,4475 U/mL: 0,5 mL PBS 0,01 mol/L pH 7.0 dicampur dengan 0,5 mL larutan konsentrasi 2,895 U/mL.
4. Konsentrasi 2,895 U/mL: 0,5 mL PBS 0,01 mol/L pH 7.0 dicampur dengan 0,5 mL stok standar.
5. Konsentrasi 5,79 U/mL (stok standar): standar di dalam vial dicampur dengan 10 mL aquabides.

Prosedur pelaksanaan:

1. *Mixed substrate* sebanyak 850 μ L ditambahkan kedalam tabung yang telah berisi 25 μ L standar atau sampel.
2. Standar atau sampel dicampur dengan *mixed substrate* secara up down menggunakan *micropipette*.

3. *Xanthine oxidase* sebanyak 125 μL ditambahkan ke dalam setiap tabung.
4. Dilakukan pencampuran secara *up down* menggunakan *micropipette*.
5. Serapan dibaca pada 30 detik pertama (A_1) dan 3 menit selanjutnya (A_2).
6. Laju reaksi penghambatan dihitung berdasarkan rumus:

$$\Delta A/\text{menit} = (A_2 - A_1)/3$$
7. Persen inhibisi standar dan sampel dihitung.

$$\% \text{ Inhibisi standar: } \frac{(\Delta A_{\text{std/menit}} \times 100)}{100 - \frac{(\Delta A_{S1/\text{menit}})}{(\Delta A_{\text{std/menit}})}}$$

$$\% \text{ Inhibisi sampel: } \frac{(\Delta A_{\text{sampel/menit}} \times 100)}{100 - \frac{(\Delta A_{S1/\text{menit}})}{(\Delta A_{\text{sampel/menit}})}}$$
8. Kurva standar dibuat (% Inhibisi – Log 10 konsentrasi standar).
9. Dari kurva standar diperoleh $a = 0,01957$, $b = -0,92081$, $r = 1$. (Lampiran 7)
10. Hasil aktivitas SOD dibagi dengan kadar protein untuk mendapatkan satuan U/mg protein.

3.6.7.4 Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA menggunakan metode Wills. Metode ini digunakan untuk menetapkan kadar peroksida lipid yg merupakan hasil utama peroksidasi lemak oleh ROS. Asam lemak tidak jenuh jamak (PUFA) dapat mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi menjadi malondialdehid (MDA). MDA bila direaksikan dengan asam tiobarbiturat (TBA) akan membentuk senyawa berwarna merah muda yang menyerap cahaya pada panjang gelombang 530 nm.

Bahan dan pereaksi:

1. Homogenat aorta abdominal
2. TBA 0,67%
3. TCA 20%
4. TEP 1:80.000.

Pembuatan kurva standar:

1. Larutan standar MDA (TEP) dilarutkan dalam aquades. Pengenceran larutan MDA standar dengan konsentrasi yang berbeda – beda (0 nM/ml – 10 nM/ml).
2. Konsentrasi 10 nM/ml: 80 μ L larutan TEP dicampur dengan 320 μ L aquades.
3. Konsentrasi 5 nM/ml: 40 μ L larutan TEP dicampur dengan 360 μ L aquades.
4. Konsentrasi 2,5 nM/ml: 20 μ L larutan TEP dicampur dengan 380 μ L aquades.
5. Konsentrasi 1,25 nM/ml: 10 μ L larutan TEP dicampur dengan 390 μ L aquades.
6. Konsentrasi 0,625 nM/ml: 5 μ L larutan TEP dicampur dengan 395 μ L aquades.
7. Konsentrasi 0,3125 nM/ml: 2,5 μ L larutan TEP dicampur dengan 397,5 μ L aquades.

Prosedur pelaksanaan:

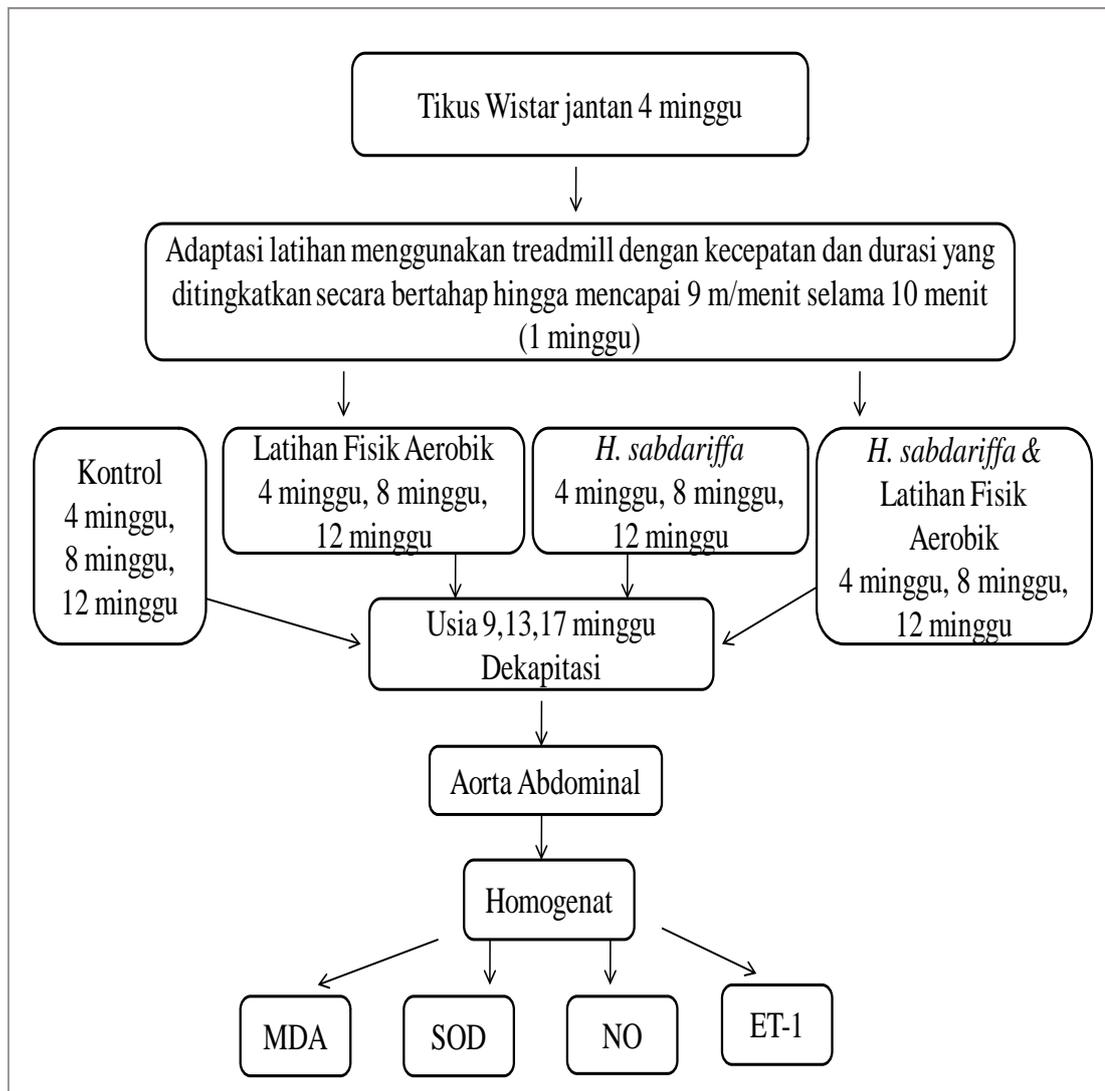
1. 200 μ L sampel ditambahkan 200 μ L TCA 20% divortex hingga homogen.
2. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit, supernatan dipisahkan dan dicampur dengan 400 μ L TBA 0,67%.
3. Sampel diinkubasikan pada penangas air 95 – 100°C selama 10 menit.
4. Sampel didinginkan pada suhu ruang.
5. Serapan dibaca pada panjang gelombang 530 nm.

6. Dari kurva standar diperoleh $a = 0,0279$, $b = 0,0009$, dan $r = 1$. (Lampiran 8)
7. Kadar MDA dihitung dengan menggunakan persamaan dari kurva standar, kemudian dikali 2 (pengenceran 2x).
8. Hasil kadar MDA dibagi dengan berat aorta dalam mg untuk mendapatkan satuan nmol/mg jaringan.

3.7 Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Variabel	Cara Pengukuran	Skala
Variabel Bebas			
1.Latihan Fisik	Berlari pada treadmill tikus selama 20 menit sesuai protokol penelitian	Hewan coba mampu mengikuti latihan fisik aerobik hingga akhir masa perlakuan, diukur melalui pengamatan oleh peneliti	Nominal
Variabel Terikat			
1.Kadar NO	Molekul yang berperan sebagai vasodilator	Diukur menggunakan kit dengan metode Griess Reaction	Numerik
2.Kadar ET-1	Molekul yang berperan sebagai vasokonstriktor	Diukur dengan metode ELISA	Numerik
3.Aktivitas SOD	Antioksidan enzimatis yang mengubah radikal oksigen superoksida menjadi H_2O_2	Diukur menggunakan kit	Numerik
4.Kadar MDA	Hasil peroksida lipid	Diukur menggunakan metode Wills	Numerik

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

Analisis data yang akan dilakukan adalah analisis deskriptif dan analisis statistik. Analisis diawali dengan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji homogenitas dengan uji Levene *statistic*. Setelah itu, dilakukan analisis uji beda dengan uji *one way* ANOVA (jika data berdistribusi normal dan homogen) atau uji Kruskal-Wallis (jika data tidak berdistribusi normal dan/atau tidak homogen). Selanjutnya, dilakukan uji lanjutan menggunakan uji Tukey.

Selanjutnya uji statistik yang bertujuan mengetahui korelasi antara data numerik dengan numerik dengan data mengikuti distribusi normal digunakan uji statistik korelasi Pearson sedangkan untuk data yang tidak normal maka menggunakan uji Spearman. Interpretasi hasil uji hipotesis berdasarkan kekuatan korelasi, arah korelasi, dan nilai p adalah sebagai berikut: kekuatan korelasi (r) berdasarkan kriteria Guilford (1956)⁴⁵ yaitu : $0,0 - < 0,2 =$ sangat lemah; $0,2 - < 0,4 =$ lemah; $0,4 - < 0,7 =$ sedang; $0,7 - < 0,9 =$ kuat; $0,9 - 1,0 =$ sangat kuat. Arah korelasi positif searah artinya semakin besar nilai satu variabel, semakin besar pula nilai variabel lainnya. Arah korelasi negatif berlawanan arah artinya semakin besar nilai satu variabel, semakin kecil nilai variabel lainnya.

Selanjutnya dilakukan analisis multivariat secara simultan dan parsial dengan regresi linier berganda untuk memperoleh gambaran menyeluruh mengenai hubungan antara variabel yang satu dengan yang lain. Analisis secara simultan dengan uji F selanjutnya analisis secara parsial melalui uji T independent. Adapun kriteria kemaknaan hasil uji statistik yang digunakan adalah nilai p apabila $p \leq 0,05$ signifikan atau bermakna secara statistik, dan $p > 0,05$ tidak signifikan atau tidak bermakna secara statistik. Data yang diperoleh diolah melalui program SPSS versi 21.

3.10 Definisi Operasional

- a. *Hibiscus sabdariffa* Linn.: tanaman semak dalam keluarga Malvaceae, ekstrak kaliks memiliki kemampuan antioksidan (antosianin), ekstrak etanol dosis 400 mg/kgBB/hari.
- b. Latihan fisik aerobik: latihan dengan berlari pada alat treadmill yang telah diatur untuk bekerja dengan kecepatan tertentu yang disesuaikan dengan usia tikus. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 5 minggu dimulai dengan kecepatan 12 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 7 minggu dimulai dengan kecepatan 15 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia lebih dari 9 minggu dimulai dengan kecepatan 20 m/menit. Latihan fisik aerobik dilakukan dengan frekuensi 5x dalam seminggu, durasi

latihan 20 menit dengan 90 detik istirahat setiap 5 menit berlari untuk menghindari kelelahan.

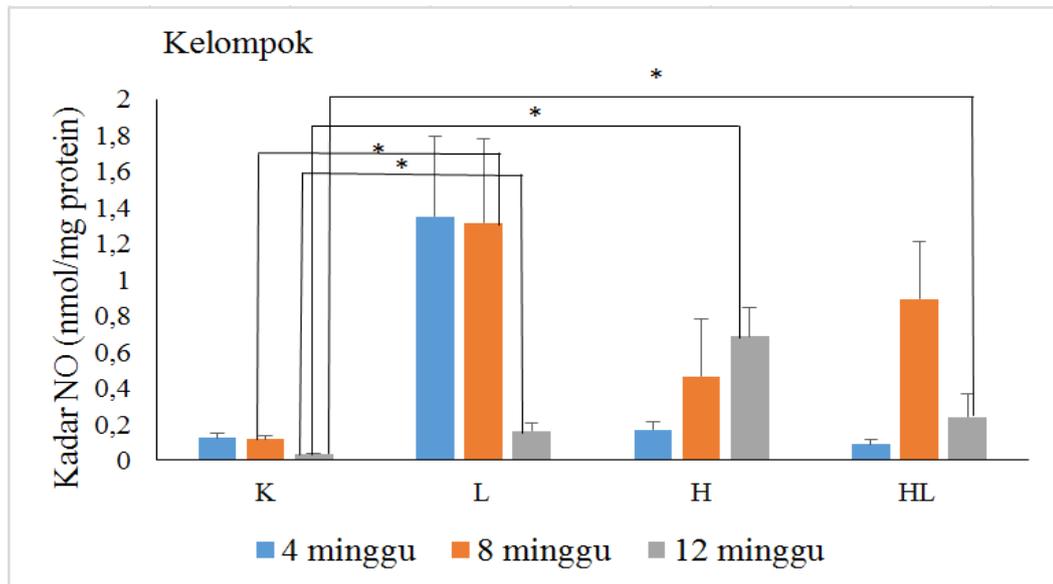
- c. Usia juvenil (prepubertas): usia 5 minggu pada tikus yang setara dengan usia anak usia 10 tahun.
- d. Usia anak: usia 9 minggu pada tikus yang setara dengan usia anak 14,5 tahun
- e. Usia remaja: usia 13 minggu pada tikus yang setara dengan usia remaja 17 tahun.
- f. Usia dewasa: usia 17 minggu pada tikus yang setara dengan usia dewasa 20 tahun.
- g. Fungsi vaskular: kadar NO dan ET-1 yang merupakan mediator vaskular penting yang dihasilkan oleh endotel yang bekerja berlawanan secara alami, berfungsi dalam regulasi tonus vaskular.
- h. MDA: peroksida lipid yang secara tidak langsung menunjukkan kadar radikal bebas.
- i. Aktivitas SOD: antioksidan endogen yang mengubah radikal superoksida menjadi H_2O_2 .

BAB 4

HASIL PENELITIAN

4.1. Perbandingan Kadar NO (nmol/mg protein) pada Semua Kelompok

Perbandingan kadar NO pada semua kelompok disajikan pada Gambar 4.1 berikut ini:



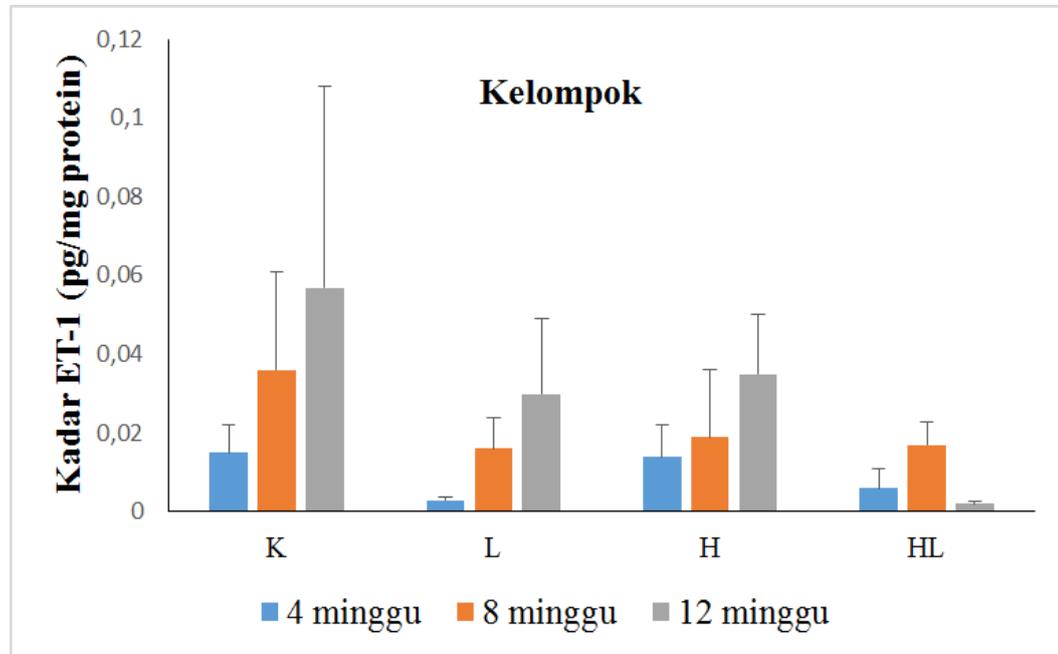
Gambar 4.1: Perbandingan kadar NO pada semua kelompok

* perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

Berdasarkan Gambar 4.1 terlihat bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p=0,021$) rerata kadar NO antara K8 dan L8. Perbandingan rerata kadar NO antara K12 dan L12 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,046$). Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok K12 dan H12. Terdapat perbedaan bermakna ($p=0,046$) antara K12 dan HL12.

4.2. Perbandingan Kadar ET-1 (pg/mg protein) pada Semua Kelompok

Perbandingan kadar ET-1 pada semua kelompok disajikan pada Gambar 4.2 berikut ini:



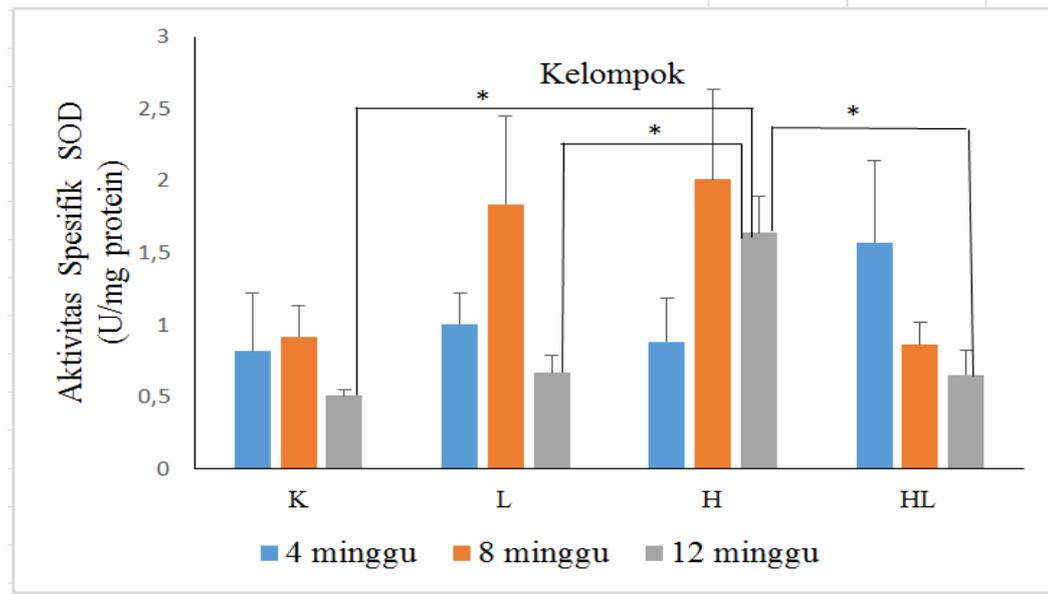
Gambar 4.2: Perbandingan kadar ET-1 pada semua kelompok

Berdasarkan gambar 4.2 terlihat bahwa perbandingan rerata kadar ET-1 pada seluruh kelompok tidak terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

4.3. Perbandingan Aktivitas Spesifik SOD (U/mg protein) pada Semua

Kelompok

Perbandingan Aktivitas Spesifik SOD pada semua kelompok disajikan pada Gambar 4.3 berikut ini:



Gambar 4.3: Perbandingan aktivitas SOD pada semua kelompok

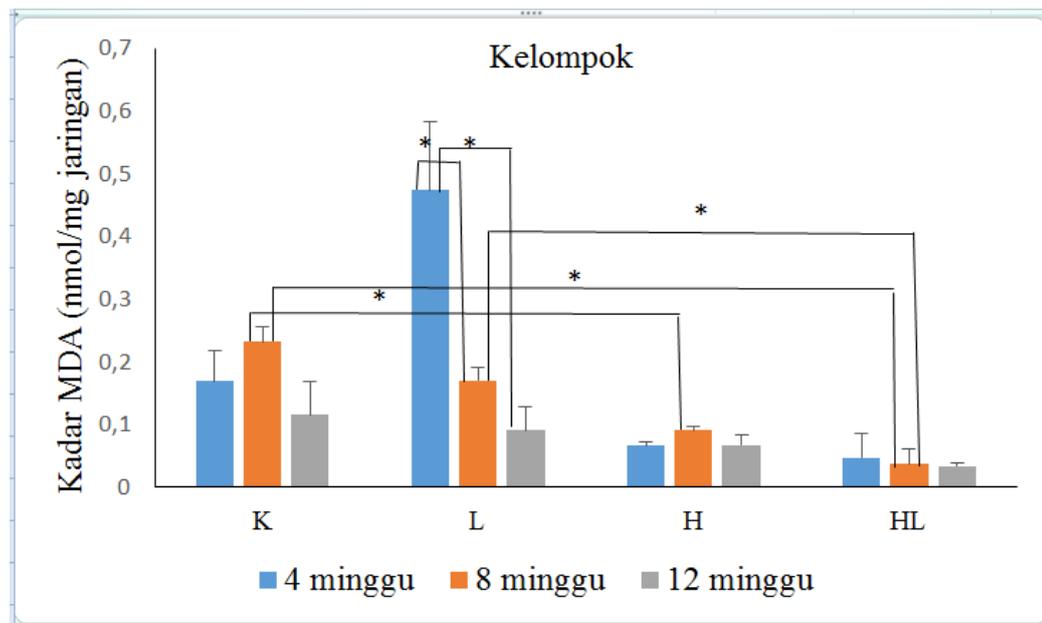
* perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

Berdasarkan gambar 4.3 terlihat bahwa perbandingan rerata aktivitas spesifik SOD antara kelompok K12 dan H12 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,006$). Perbandingan rerata aktivitas spesifik SOD antara kelompok L12 dan H12 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,014$). Perbandingan rerata aktivitas spesifik SOD antara kelompok HL12 dan H12 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,013$).

4.4. Perbandingan Kadar MDA (nmol/mg jaringan) pada Semua

Kelompok

Perbandingan rerata kadar MDA pada semua kelompok disajikan pada Gambar 4.4 berikut ini:



Gambar 4.4: Perbandingan kadar MDA pada semua kelompok

* perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

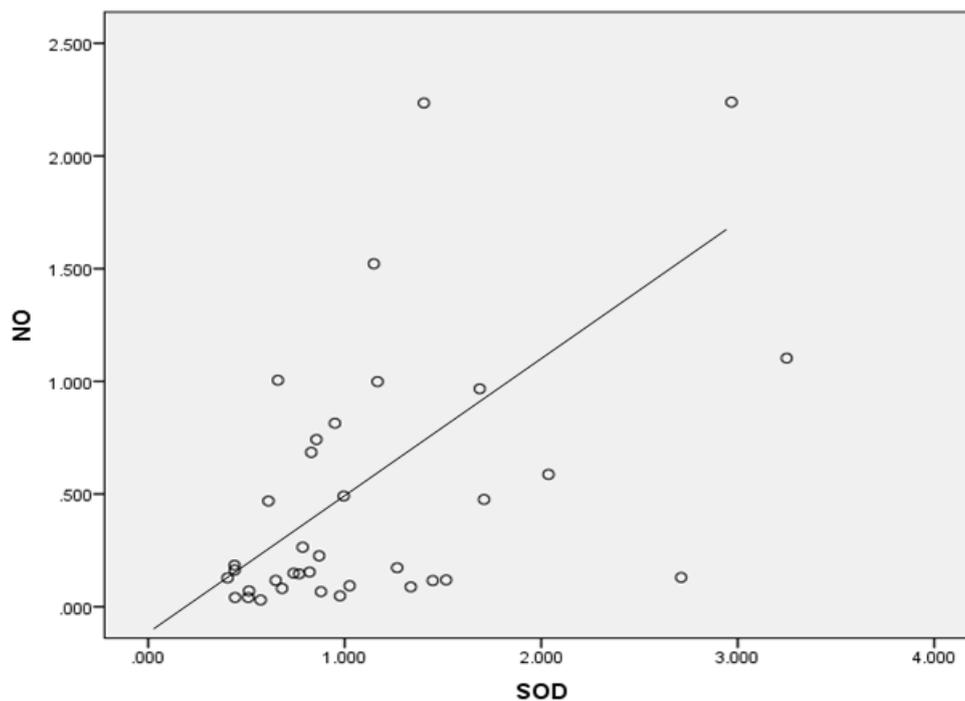
Berdasarkan Gambar 4.4 terlihat bahwa perbandingan rerata kadar MDA antara kelompok L4 dan L8 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,046$). Rerata kadar MDA antara kelompok L4 dan L12 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,017$). Perbandingan rerata kadar MDA antara K8 dan H8 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,005$). Perbandingan rerata kadar MDA antara K8 dan HL8 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,001$). Perbandingan rerata kadar MDA antara L8 dan HL8 terdapat perbedaan bermakna ($p=0,007$).

4.5 Analisis Korelasi antara NO, ET-1, Aktivitas SOD dan MDA

Tabel 4.1: Analisis korelasi antara NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD, dan MDA

Variabel	R	Nilai p
NO dengan SOD	0,493	0,002*
NO dengan MDA	0,189	0,271
NO dengan ET-1	0,005	0,975
SOD dengan MDA	0,067	0,698
SOD dengan ET-1	0,025	0,884
MDA dengan ET-1	-0,085	0,621

Keterangan: Korelasi Pearson; * perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$; R: koefisien korelasi



Gambar 4.5 *Scatter dot* antara NO dan SOD

Berdasarkan Tabel 4.5 di atas, dari hasil analisis statistik uji korelasi setiap variabel NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA didapatkan nilai p seluruhnya lebih dari 0,05 (kecuali korelasi antara NO dengan SOD). Maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat korelasi antara NO dengan MDA ($p=0,271$),

NO dengan ET-1 ($p=0,975$), SOD dengan MDA ($p=0,698$), SOD dengan ET-1 ($p=0,884$) dan MDA dengan ET-1 ($p=0,621$). Sedangkan untuk korelasi antara NO dengan SOD bermakna secara statistik ($p=0,002$). Maka dapat disimpulkan terdapat korelasi yang cukup kuat (sedang) dengan arah korelasi positif antara NO dengan SOD yang bermakna secara statistik.

4.6 Analisis Multivariat Pengaruh MDA, SOD dan ET-1 terhadap NO

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh MDA, SOD, dan ET1 terhadap NO yang bermakna secara statistik ($p=0,018$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh SOD terhadap NO yang bermakna secara statistik ($p=0,003$). Namun, tidak terdapat pengaruh ET-1 yang bermakna secara statistik terhadap NO ($p=0,966$) dan tidak terdapat pengaruh MDA yang bermakna secara statistik terhadap NO ($p=0,310$).

4.7 Analisis Multivariat Pengaruh MDA dan SOD terhadap ET-1

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh MDA dan SOD terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik ($p=0,425$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh MDA terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik dan tidak terdapat pengaruh SOD terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik.

4.8 Analisis Multivariat Pengaruh NO dan MDA terhadap SOD

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh NO dan MDA terhadap SOD yang bermakna secara statistik ($p=0,004$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh NO yang bermakna secara statistik terhadap SOD ($p=0,001$). Namun, tidak terdapat pengaruh MDA yang bermakna secara statistik terhadap SOD ($p=0,143$).

BAB 5

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) usia 5 minggu, tikus dibagi atas 12 kelompok. Jumlah total sampel hewan coba adalah tiga puluh enam ekor tikus, jumlah ini telah memenuhi kriteria penghitungan jumlah sampel sesuai dengan rumus Federer.

Adaptasi pada tikus dilakukan sejak usia 4 minggu selama satu minggu. Tikus mulai perlakuan sejak usia juvenil 5 minggu yang setara dengan usia 10 tahun pada manusia (anak) hingga waktu akhir perlakuan (dekapitasi) yang berbeda – beda. Usia tikus 9 minggu setara dengan usia manusia 14,5 tahun (anak). Usia tikus 13 minggu setara dengan usia manusia 17 tahun (remaja). Usia tikus dewasa 17 minggu, setara dengan usia manusia 20 tahun (dewasa).^{6,7}

Latihan fisik aerobik diberikan dengan menggunakan alat treadmill hewan. Protokol latihan fisik aerobik yang diberikan pada penelitian ini adalah protokol yang telah dilakukan oleh Hsu YC⁴³ dan Lontoh S⁴⁴ dan telah diadaptasi oleh Utami TP¹⁴, yaitu berupa latihan fisik aerobik dengan kecepatan yang disesuaikan dengan usia, dilakukan secara bertahap dan dipertahankan pada intensitas sedang, dengan memberikan keseimbangan antara durasi latihan dengan waktu istirahat.

Penelitian – penelitian epidemiologi telah menjelaskan bahwa latihan fisik aerobik dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas kardiovaskular pada masyarakat umum, termasuk populasi yang sehat. Latihan fisik dapat meningkatkan vasodilatasi endotel pada pasien dengan hipertensi, penyakit arteri koroner, dan gagal jantung kronik, juga pada individu yang sehat. Salah satu mekanisme latihan fisik aerobik dapat menurunkan penyakit kardiovaskular adalah melalui peningkatan fungsi endotel. Disfungsi endotel adalah tahap awal patogenesis aterosklerosis yang akan menyebabkan berbagai komplikasi kardiovaskular. Oleh karena itu, tindakan pencegahan yang efektif dapat

mencegah disfungsi endotel dan meningkatkan fungsi endotel pada individu yang sehat.¹⁰

Berdasarkan studi patologi Jarvisalo MJ (2010)¹⁸, aorta abdominal adalah tempat deposit lemak pertama pada anak-anak pada risiko aterosklerosis. Penelitian Padilla J (2013)¹⁹ juga menjelaskan bahwa aorta abdominal lebih mudah mengalami aterosklerosis dibandingkan aorta torakal pada tikus. Oleh karena itu, pada penelitian ini, akan digunakan homogenat aorta abdominal untuk mengukur penanda disfungsi endotel yakni kadar NO dan ET-1, kadar MDA dan aktivitas SOD.

5.1 Pertambahan Usia dan Disfungsi Endotel

NO dan ET-1 adalah mediator vasoaktif yang diproduksi oleh endotel. NO dan ET-1 bekerja berlawanan dalam fungsi vaskular, yaitu NO menyebabkan vasodilatasi, sedangkan ET-1 menyebabkan vasokonstriksi. Pada keadaan normal, NO dan ET-1 berfungsi mempertahankan tonus vaskular. Pada umumnya kadar ET-1 dalam jumlah sedikit, sedangkan kadar NO dipertahankan tetap. Ketidakimbangan antara NO dan ET-1 dapat menyebabkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel terjadi jika produksi NO atau *bioavailability* NO menurun, produksi ET-1 lebih tinggi dibandingkan produksi NO.^{12,13,33}

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Puzserova dkk (2014)⁴⁶ menjelaskan bahwa proses penuaan (*aging*) berhubungan erat dengan penurunan produksi NO dan penurunan *bioavailability* NO.

5.2 Pertambahan Usia dan Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang antara pro-oksidan dan antioksidan, yaitu saat pro-oksidan melebihi antioksidan, sehingga produksi ROS meningkat. Junqueira VBC dkk (2004)⁸ menjelaskan bahwa pertambahan usia dapat menyebabkan stres oksidatif. Knight dkk (2000), De La Fuente dkk (2002)

menjelaskan bahwa proses penuaan dapat disebabkan oleh efek kumulatif dari ROS (Andriollo-Sanchez M dkk, 2005).⁴⁷ Harman dkk (1998) dan Finkel dan Holbrook (2000) menjelaskan bahwa stres oksidatif meningkat pada subyek lanjut usia, hal ini diduga akibat produksi radikal bebas yang tidak terkontrol oleh mitokondria yang mengalami penuaan dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Andriollo-Sanchez M dkk, 2005).⁴⁷

5.3 Perubahan pada Kontrol

5.3.1 Kadar NO

Pola kadar NO pada kelompok kontrol (K4, K8, dan K12) terlihat cenderung menurun sesuai dengan peningkatan usia. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini sesuai dengan penelitian Chatrath dkk (2003)⁴⁸ yang menjelaskan bahwa produksi NO pada usia dewasa lebih rendah dibandingkan produksi NO pada usia anak – anak yang disebabkan oleh perubahan hormonal yang berhubungan dengan maturitas seksual dapat memengaruhi regulasi protein eNOS saat postranskripsi atau postranslasi. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Puzserova dkk (2014)⁴⁶ yang menjelaskan bahwa proses penuaan (*aging*) berhubungan erat dengan penurunan produksi NO dan penurunan *bioavailability* NO.

5.3.2 Kadar ET-1

Berdasarkan penelitian ini, terlihat pola ET-1 pada kelompok kontrol semakin meningkat. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini akibat berkurangnya *bioavailability* NO sehingga menyebabkan produksi ET-1 meningkat akibat inaktivitas fisik.^{12,13} Pada penelitian Latorre (2002)⁴⁹, menjelaskan bahwa plasma ET-1 meningkat pada hewan yang hidup sedenter.

5.3.3 Kadar MDA

Pada penelitian ini dipilih MDA sebagai penanda stres oksidatif karena ROS terutama mengoksidasi lipid, sedangkan MDA adalah hasil dari peroksidasi

lipid. Penelitian – penelitian stres oksidatif juga sering menggunakan MDA sebagai penanda stres oksidatif.

Pada penelitian ini pola kadar MDA pada usia remaja kelompok kontrol cenderung lebih tinggi dibandingkan usia anak dan dewasa. Namun, hal ini secara statistik tidak bermakna. Kadar MDA yang tinggi pada usia remaja diduga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan.³⁷

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁴ yang didapatkan hasil kadar MDA pada tikus dewasa muda lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa kadar MDA kelompok kontrol yang tinggi pada usia dewasa muda disebabkan karena pemindahan tikus dari tempat yang satu ke tempat yang baru dari masa penyapihan sampai masa perlakuan, sehingga menyebabkan stres pada tikus juvenil. Pada penelitian ini, faktor yang dapat menimbulkan stres pada tikus yang berupa pemindahan sejak masa penyapihan diminimalkan dengan melakukan penelitian pada *animal house* yang memiliki fasilitas *breeding* dan pemeliharaan dalam satu gedung.

5.3.4 Aktivitas Spesifik SOD

Superoksida Dismutase (SOD) adalah salah satu antioksidan enzimatis yang dapat menangkal pengaruh negatif oksidan dalam tubuh. Berdasarkan mekanisme kerjanya, SOD digolongkan sebagai antioksidan primer, karena dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, sehingga berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. SOD bekerja sebagai antioksidan lini pertama yang menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi stabil. SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutase dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 .

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok kontrol terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga karena kadar MDA yang lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa, yang merupakan mekanisme sistem pertahanan antioksidan terhadap kadar oksidan yang meningkat. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang

dilakukan Utami TP (2014)¹⁴ dimana didapatkan hasil aktivitas SOD pada tikus dewasa muda lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa.

5.4 Perubahan pada Latihan Fisik Aerobik

5.4.1 Kadar NO

Pola kadar NO pada kelompok latihan fisik aerobik (L4, L8, dan L12) terlihat cenderung menurun sesuai dengan peningkatan usia dan peningkatan lamanya latihan fisik. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Lantz J dkk (2015)⁵⁰ dan Trinity JD dkk (2014)⁵¹ menjelaskan bahwa peningkatan usia menyebabkan penurunan *shear stress*, akibat diameter pembuluh darah menjadi lebih lebar.

Kadar NO pada kelompok latihan fisik aerobik lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁴ yang didapatkan hasil kadar NO lebih tinggi pada kelompok latihan fisik aerobik jika dibandingkan dengan kontrol pada tikus juvenil. Hal ini diduga terjadi karena peningkatan ekspresi mRNA eNOS pada jaringan aorta pasca latihan fisik jangka panjang

Pada penelitian yang dilakukan oleh Goto dkk (2003)⁵² pada 26 laki-laki muda sehat yang melakukan latihan aerobik intensitas sedang selama 30 menit, 5 - 7 kali dalam seminggu, selama 12 minggu (jangka panjang), didapatkan hasil dapat meningkatkan vasodilatasi melalui peningkatan produksi NO.

Pada penelitian Goto dkk (2007)¹⁰ pada delapan laki – laki sehat yang melakukan latihan fisik aerobik intensitas sedang selama 30 menit didapatkan peningkatan *bioavailability* NO. Latihan fisik dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas *endothelial NO synthase* (eNOS), sehingga mengakibatkan peningkatan kadar NO. Latihan fisik meningkatkan *vascular shear stress* di seluruh tubuh, kemudian akan meningkatkan ekspresi dan aktivitas eNOS, sehingga menyebabkan peningkatan NO baik pada manusia maupun hewan percobaan.

Hal yang serupa juga didapatkan pada penelitian Yang dkk (2002)⁵³ pada tikus Wistar jantan berusia 5 minggu, yang melakukan latihan fisik selama 10 minggu. Hasil penelitian ini adalah terdapat peningkatan ekspresi mRNA eNOS pada endotel aorta tikus.

5.4.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok latihan fisik cenderung semakin meningkat. Penurunan produksi NO menyebabkan, kadar ET-1 meningkat. Kadar ET-1 kelompok L pada semua kelompok lebih rendah dibandingkan kontrol. Latorre (2002)⁴⁹ juga menjelaskan bahwa latihan fisik menghilangkan sensitivitas ET-1 pada jaringan aorta tikus Wistar jantan.

5.4.3 Kadar MDA

Pada kelompok L4 dalam penelitian ini, kadar MDA kelompok L4 lebih tinggi dibandingkan L8 dan L12. Hal ini diduga latihan fisik aerobik pada tikus juvenil yang baru memulai latihan fisik aerobik masih terlalu berat. Pola kadar MDA kelompok latihan fisik aerobik terlihat semakin meningkat usia dan semakin meningkat lama latihannya, kadar MDA nya lebih rendah. Pola kadar MDA latihan fisik aerobik cenderung menurun. Hal ini karena latihan fisik aerobik jangka panjang dapat menurunkan produksi ROS melalui peningkatan ekspresi dan aktivitas antioksidan.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁴ yang didapatkan hasil kadar MDA pada tikus dewasa muda yang dilakukan latihan fisik aerobik lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa kadar MDA yang lebih tinggi pada usia dewasa muda disebabkan karena pemindahan tikus dari tempat yang satu ke tempat yang baru dari masa penyapihan sampai masa perlakuan, sehingga menyebabkan stres pada tikus juvenil.

Berdasarkan penelitian Gu Q dkk (2012)⁵⁴ menjelaskan bahwa latihan fisik pada tikus hipertensi spontan dapat meningkatkan kandungan nitrit dan nitrat (NO_x) dan upregulasi fosforilasi NOS3. Latihan fisik juga efektif menurunkan

produksi MDA dan menekan pembentukan radikal superoksida dan peroksinitrit di aorta melalui peningkatan aktivitas SOD dan katalase, dan menekan aktivitas NADPH oxidase. Kesimpulannya, latihan fisik dapat mencegah hipertrofi aorta dan disfungsi endotel, yang diduga melalui peningkatan *bioavailability* NO pada tikus hipertensi spontan.

5.4.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok latihan fisik aerobik terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada latihan fisik aerobik lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa latihan fisik meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁴ yang didapatkan hasil aktivitas spesifik SOD lebih tinggi pada kelompok latihan fisik aerobik jika dibandingkan dengan kontrol pada tikus juvenil.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Berzosa dkk (2011)³⁹ menunjukkan bahwa ROS yang terbentuk selama aktivitas fisik dengan intensitas sedang akan mengaktifasi jalur Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) yang selanjutnya akan mengaktifasi faktor transkripsi Nuclear Factor kappa B (NF-kB). Aktivasi faktor transkripsi NF-kB akan meningkatkan ekspresi enzim - enzim penting yang berhubungan dengan pertahanan sel (MnSOD dan GPx) dan adaptasi latihan (iNOS dan eNOS). Dengan demikian latihan fisik dengan intensitas sedang dapat memiliki efek sebagai antioksidan.

Pada penelitian Ji dkk (2004)⁵⁵ menjelaskan bahwa ekspresi gen SOD pada mitokondria otot meningkat setelah latihan fisik yg diperlihatkan melalui peningkatan Nuclear Factor kappa B (NF-kB). Latihan fisik yang berulang akan meningkatkan sintesis protein enzim antioksidan secara de novo. Penelitian yang dilakukan oleh deMoraes dkk (2008)⁵⁶ menjelaskan bahwa latihan fisik meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta.

5.5 Perubahan pada Pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Hibiscus sabdariffa L. merupakan tanaman herbal yang memiliki efek farmakologi antioksidan kuat terutama karena mengandung antosianin. Efek antioksidan dari antosianin lebih tinggi jika dibandingkan dengan antioksidan lainnya, seperti vitamin E, asam askorbat, dan β -karoten.^{24-7,29}

Dilakukan pengujian fitokimia secara kualitatif dan kuantitatif pada ekstrak etanol *H. sabdariffa* L.. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak ini mengandung saponin, tanin, alkaloid, fenolik, flavonoid, dan steroid; persentase antioksidan sebesar 168,77% (Lampiran 14) dan kadar antosianin serta asam askorbat yang tinggi (Lampiran 15).

5.5.1 Kadar NO

Pola kadar NO kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. (H4, H8, dan H12) cenderung meningkat sesuai dengan peningkatan usia. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini diduga akibat pencegahan stres oksidatif yang menyebabkan peningkatan *bioavailability* NO, sehingga menyebabkan peningkatan produksi NO.

Kadar NO kelompok H lebih tinggi dibandingkan kontrol pada semua kelompok usia. Namun, kadar NO kelompok H4 lebih rendah jika dibandingkan kelompok L4 dan kelompok H8 lebih rendah jika dibandingkan kelompok L8, hal ini diduga karena pemberian dosis *H. sabdariffa* L. kurang.

5.5.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. cenderung semakin meningkat. Kadar ET-1 kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. pada semua kelompok lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga akibat peningkatan *bioavailability* NO, sehingga dapat menghambat produksi ET-1. Namun, kadar ET-1 kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. lebih tinggi dibandingkan kelompok latihan fisik aerobik diduga karena dosisnya kurang.

5.5.3 Kadar MDA

H. sabdariffa L. berperan sebagai antioksidan sekunder dengan cara menangkap radikal bebas (*radikal free scavenger*). Dalam penelitian ini pola kadar MDA pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Kadar MDA yang tinggi pada usia remaja diduga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan.³⁷ Kadar MDA pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kontrol.

5.5.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga karena kadar MDA yang lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa, yang merupakan mekanisme sistem pertahanan antioksidan terhadap kadar oksidan yang meningkat.

Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L., lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta.

5.6 Perubahan pada Kombinasi Latihan Fisik Aerobik dan Pemberian

Hibiscus sabdariffa Linn.

5.6.1 Kadar NO

Pola kadar NO kelompok kombinasi pemberian *H. sabdariffa* L. dan latihan fisik aerobik (HL4, HL8, dan HL12) tampak lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga disebabkan karena pola ET-1 yang lebih tinggi pada usia remaja. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Kadar NO pada kelompok HL4 lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga terjadi karena terdapat mekanisme kompetitif inhibitor.

5.6.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. pada usia dewasa lebih rendah jika dibandingkan usia anak dan remaja. Hal ini disebabkan karena ET-1 meningkat oleh faktor pertumbuhan.³⁰ Kadar ET-1 pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga latihan fisik jangka panjang dan pemberian *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan kadar ET-1.

5.6.3 Kadar MDA

Pola kadar MDA kelompok kombinasi latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat semakin meningkatnya usia dan semakin meningkat lama latihannya, kadar MDA nya lebih rendah. Kadar MDA kelompok kombinasi latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L.. Hal ini diduga akibat mekanisme sinergi yang terjadi.

5.6.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta

5.7 Keseimbangan antara Kadar SOD dan MDA

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang antara pro-oksidan dan antioksidan, dimana kapasitas pro-oksidan melebihi kapasitas antioksidan.³⁷ Pada penelitian ini tidak terjadi stres oksidatif pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat. Peningkatan kadar MDA diimbangi oleh aktivitas spesifik SOD yang

meningkat sebagai akibat mekanisme sistem antioksidan, sehingga tidak menimbulkan stres oksidatif.

5.8 Keseimbangan antara kadar NO dan ET-1

Disfungsi endotel terjadi ketika produksi NO menurun dan produksi ET-1 meningkat.^{12,13,33} Pada penelitian ini tidak terjadi disfungsi endotel pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat.

5.9 Korelasi antara SOD dan NO

Radikal superoksida dapat menyebabkan produksi NO dan *bioavailability* NO menurun. Peningkatan SOD dapat meningkatkan produksi NO dan *bioavailability* NO. Penambahan SOD menghilangkan superoksida dengan mengubahnya menjadi H₂O₂, sehingga dapat meningkatkan kadar NO. SOD dapat mencegah hilangnya *bioavailability* NO oleh karena radikal superoksida.^{12,13,32}

BAB 6

SIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

1. Latihan fisik aerobik meningkatkan kadar NO, menurunkan kadar ET-1, meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
2. Pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan kadar NO, menurunkan kadar ET-1, meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
3. Latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih meningkatkan kadar NO, lebih menurunkan kadar ET-1, lebih meningkatkan aktivitas spesifik SOD, dan lebih menurunkan kadar MDA dibandingkan kontrol.
4. Terdapat korelasi antara NO dan ET-1, NO dan aktivitas spesifik SOD, NO dan MDA, ET-1 dan aktivitas spesifik SOD, ET-1 dan MDA, aktivitas spesifik SOD dan MDA.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme kompetitif inhibitor pada reseptor NO, ET-1 dan SOD.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mendis S, Puska P, Norrving B. Editors. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization, Geneva 2011.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131: 4-132.
3. Soendoro T, Riset Kesehatan Dasar. Dalam: Laporan Nasional 2013. Balai Penelitian Pengembangan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2014.
4. Soendoro T. Riset Kesehatan Dasar. Dalam: Laporan Nasional 2007. Balai Penelitian Pengembangan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Desember 2008.
5. Hong YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ J*. 2010 Jan; 40(1):1-9.
6. Andreollo NA, dos Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship?. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51.
7. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: How old is it in comparison with human age?. *Biomed. Int*. 2011; 2: 81-9.
8. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud R, et al. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004; 25: 5-16.
9. Jonas S, Phillips EM. ACSM's exercise is medicineTM: A Clinician's Guide to Exercise Prescription. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009: 8-104.
10. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakaguchi A, Kawamura M, et al. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilatation through an increase in nitric oxide bioavailability in human. *AJH* 2007; 20:825-30.
11. Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems*. 7th ed. Belmont: Nelson Education, Ltd; 2010. pp. 333-82.
12. Bohm F, Pernow J. Review: The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2007; 76: 9-18.
13. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: New perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300: 1288-95.
14. Utami TP. Pengaruh latihan fisik pada tikus juvenil dan dewasa muda terhadap kadar *nitric oxide*, malondialdehid dan aktivitas spesifik enzim *superoxide dismutase* aorta abdominal (tesis). Jakarta: Universitas Indonesia; 2015.
15. Ilyas EII, Kartinah NT, Andraini T, Goenarjo RA, Kahandjak DN. Effects of *Hibiscus sabdariffa* Linn. on insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) to prevent overtraining syndrome. *Med J Indones*. 2014;23:187-91.
16. Andraini T, Yolanda S. Prevention of insulin resistance with *Hibiscus sabdariffa* Linn. extract in high-fructose fed rat. *Med J Indones*. 2014;23:192-6.

17. Kahanjak D. Efek *Hibiscus sabdariffa* Linn. dalam mencegah stres oksidatif pada tikus yang diberi latihan fisik aerobik *overtraining*: Pengamatan terhadap kadar MDA dan aktivitas glutathion peroksidase (tesis). Jakarta: Universitas Indonesia; 2014.
18. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, Irjala K, Ronnema T, Hartiala JJ, et al. Increased aortic intima-media thickness: A marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation*. 2001; 104:2943-7.
19. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 304: 543-52.
20. Sutarina N, Sudarsono NC, Hidayat RW, Tobing A, Nilawati S, Kurniarobbi J. *Indonesia Sehat, Indonesia Bugar: Seri Latihan Jasmani untuk Perempuan dan Anak – Anak*. Balai Penerbit FKUI. Jakarta, 2008.
21. Strauss RH. *Sports Medicine*. Michigan: Saunders; 1984.
22. Plowman SA, Smith DL. *Exercise Physiology: For Health, Fitness, and Performance*. 3rded. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
23. ACSM. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. 7th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 3-18.
24. Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat Rosella *Hibiscus sabdariffa* Linn. Jakarta: Direktorat OAI, Badan POM RI, 2010.
25. Kurniasih. *Budidaya Mahkota Dewa dan Rosella*. Yogyakarta: Penerbit Pustaka Baru Press; 2012.
26. Rahmawati R. *Budidaya Rosella*. Yogyakarta: Penerbit Pustaka Baru Press; 2012.
27. Mahadevan N, Shivali, Kamboj P. *Hibiscus sabdariffa* Linn-an overview. *Natural Product Radiance*. 2008; 8(1): 77-83.
28. Ananga A, Georgiev V, Ochieng J, Phills B, Tsoolova V. Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *InTech*. 2013: 247-87.
29. Clarkson and Thompson. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(suppl): 637-46.
30. Ganong WF. *Review of Medical Physiology*. 23rd ed. New York: McGraw Hill; 2010. p. 616-9.
31. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *JRAAS* 2002; 3: 1-15.
32. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007.
33. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: 27-32.
34. Silverthorn DU. *Human Physiology: An integrated approach*. 5th ed. San Fransisco: Pearson Education; 2010. p. 534-7.
35. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29-38.
36. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006; 36(4): 327-58.
37. Peternelj T, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training beneficial or detrimental?. *Sports Med*. 2011; 41(12) 1043-69.

38. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: Current concepts, *Curr Hypertens Rep.* 2010; 12(2):135-42.
39. Berzosa C, Cebrián I, Fuentes-Broto L, Gómez-Trullén E, Piedrafita E, Martínez-Ballarín E, et al. Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011; 2011: 540-58.
40. Taylor CA, Cheng CP, Espinosa LA, Tang BT, Parker D, Herfkens RJ. In vivo quantification of blood flow and wall shear stress in the human abdominal aorta during lower limb exercise. *Annals of Biomedical Engineering.* 2002; 30: 4020-408.
41. Padilla J, Harris RA, Rink LD, Wallace JP. Characterization of the brachial artery shear stress following walking exercise. *Vascular Medicine.* 2008; 13: 105-11.
42. Li YJ, Haga JH, Chien S. Review: Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech.* 2005; 38: 1949-71.
43. Hsu YC, Chen HI, Kuo YM, Yu L, Huang TY, Chen SJ, et al. Chronic treadmill running in normotensive rats resets the resting blood pressure to lower levels by upregulating the hypothalamic GABAergic system. *J Hypertens.* 2011; 29: 2339-48.
44. Lontoh SO. Pengaruh latihan fisik anaerobik dan detraining terhadap morfologi miokardium ventrikel kiri tikus Wistar jantan [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2013.
45. Guilford JP. *Psychometric Methods.* McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1979.
46. Puzserova A, Ilovska V, Balis P, Slezak P, Bernatova I. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. *Biomed Research International.* 2014: 12.
47. Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Venneria E, O'Connor JM, Maiani G, Coudray C, et al. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: The ZENITH study. 2005; 2: 558-62.
48. Chatrath R, Ronninggen KL, Severson SR, LaBreche P, Jayachandran M, Bracamonte MP, et al. Endothelium-dependent responses in coronary arteries are changed with puberty in male pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1168-76.
49. Latorre E, Morán M, Aragonés D, Saborido A, Fernández I, Delgado J, et al. Exercise training-induced changes in sensitivity to endothelin-1 and aortic and cerebellum lipid profile in rats. *Lipids.* 2002; 37: 49-53.
50. Lantz J, Renner J, Länne T, Karlsson M. Is aortic wall shear stress affected by aging? An image-based numerical study with two age groups. *Med Eng Phys.* 2015; 37(3): 265-71.
51. Trinity JD, Groot HJ, Layec G, Rossman MJ, Ives SJ, Richardson RS. Impact of age and body position on the contribution of nitric oxide to femoral artery shear rate. *Hypertension.* 2014; 63: 1019-25.
52. Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, et al. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilatation in humans role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 2003; 108:530-5.

53. Yang AI, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen H. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of aorta. *J Biomed Sci.* 2002; 9: 149-55.
54. Gu Q, Wang B, Zhang X, Ma Y, Liu J, Wang X. Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2008; 375: 199-206.
55. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina AJ: Acute exercise activate nuclear factor kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J* 2004;18:1499-505.
56. DeMoraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* 2008; 8: 1-12.

Lampiran 1: Keterangan Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Gedung Fakultas Kedokteran I
Jl. Salemba Raya No.6, Jakarta 1043
PO.Box 136
T. 62.21.3912477, 31930371, 3193037
3922977, 3927360, 315323
F 62 21 3912477, 31930372, 315728
E. humas@fk.ui.ac.id, office@fk.ui.ac.
fk.ui.ac.

Nomor : 796 /UN2.F1/ETIK/2015

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the research protocol entitled:

"Potensi Latihan Fisik Aerobik dan Pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn. dalam Mencegah Terjadinya Disfungsi Endotel Akibat Stres Oksidatif".

Peneliti Utama : dr. Donna Adriani K. M
Principal Investigator

Nama Institusi : Magister Ilmu Biomedik FKUI
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut di atas.
and approved the above mentioned protocol.



- * *Ethical approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan.
** Peneliti berkewajiban
1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.
 2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical approval* harus diperpanjang.
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan.
 3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*).
 4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*.

Semua prosedur persetujuan dilakukan sesuai dengan standar ICH-GCP.
All procedures of Ethical Approval are performed in accordance with ICH-GCP standard procedure.

Lampiran 2: Metode Pembuatan Ekstrak

Metode Pembuatan Ekstrak:

1. Kelopak bunga rosella dikeringkan.
2. Di *greender* dengan kehalusan 3-4 mm.
3. Sampel yang sudah diserbuk direndam dengan etanol 96% (1:5).
4. Kocok 2 – 3 jam, biarkan 24 jam atau satu malam.
5. Saring dengan kertas saring, lalu filtratnya dievaporasi dengan suhu 50° – 60°C.
6. Didapat ekstrak kental.

Lampiran 3: Kebutuhan Sediaan Harian

Kebutuhan Sediaan Harian *H. sabdariffa* L. dosis 400 mg/kgBB/hari

$$\begin{aligned} \text{Dosis rosella yang diberikan ke tikus} &= 400 \text{ mg/kgBB/hari} \\ &= 400 \text{ mg/1000grBB/hari} \end{aligned}$$

Berat tikus (juvenil – dewasa) antara 60 – 250 gram.

$$\begin{aligned} \text{Asupan untuk BB tikus 60 gr} &= \text{dosis} \times \text{BB tikus} \\ &= 40 \text{ mg/100gr/hari} \times 60 \text{ gr} \\ &= 24 \text{ mg} \\ &\text{(dalam maksimal 1 ml larutan)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Asupan untuk BB tikus 250 gr} &= \text{dosis} \times \text{BB tikus} \\ &= 40 \text{ mg/100gr/hari} \times 250 \text{ gr} \\ &= 100 \text{ mg} \\ &\text{(dalam maksimal 1 ml larutan)} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok yang cocok adalah 100 mg/ml.

Untuk mengetahui berapa ml larutan yang diberikan pada tikus dari larutan stok konsentrasi 100 mg/ml sesuai BB tikus, melalui persamaan:

$$X = \frac{\text{Dosis sesuai BB tikus} \times 1 \text{ ml}}{\text{Konsentrasi larutan stok}}$$

Konsentrasi larutan stok

$$\begin{aligned} X \text{ untuk tikus BB 60 gr} &= \frac{24 \text{ mg} \times 1}{100 \text{ mg/ml}} \\ &= 0,24 \text{ ml} \end{aligned}$$

(Lanjutan)

Tabel Kebutuhan Sediaan Harian Dosis 400 mg/kgBB/hari

BB (gr)	Pemberian (mg)	Pemberian sesuai konsentrasi 100mg/ml
60	24	0,24
65	26	0,26
70	28	0,28
75	30	0,30
80	32	0,32
85	34	0,34
90	36	0,36
95	38	0,38
100	40	0,40
105	42	0,42
110	44	0,44
115	46	0,46
120	48	0,48
125	50	0,50
130	52	0,52
135	54	0,52
140	56	0,56
145	58	0,58
150	60	0,60
155	62	0,62
160	64	0,64
165	66	0,66
170	68	0,68
175	70	0,70

(Lanjutan)

Tabel Kebutuhan Sediaan Harian Dosis 400 mg/kgBB/hari

BB (gr)	Pemberian (mg)	Pemberian sesuai konsentrasi 100mg/ml
180	72	0,72
185	74	0,74
190	76	0,76
195	78	0,78
200	80	0,80
205	82	0,82
210	84	0,84
215	86	0,86
220	88	0,88
225	90	0,90
230	92	0,92
235	94	0,94
240	96	0,96
245	98	0,98
250	100	1,00
255	102	1,02
260	104	1,04
265	106	1,06
270	108	1,08
275	110	1,10
280	112	1,12
290	114	1,14
295	116	1,16
300	118	1,18

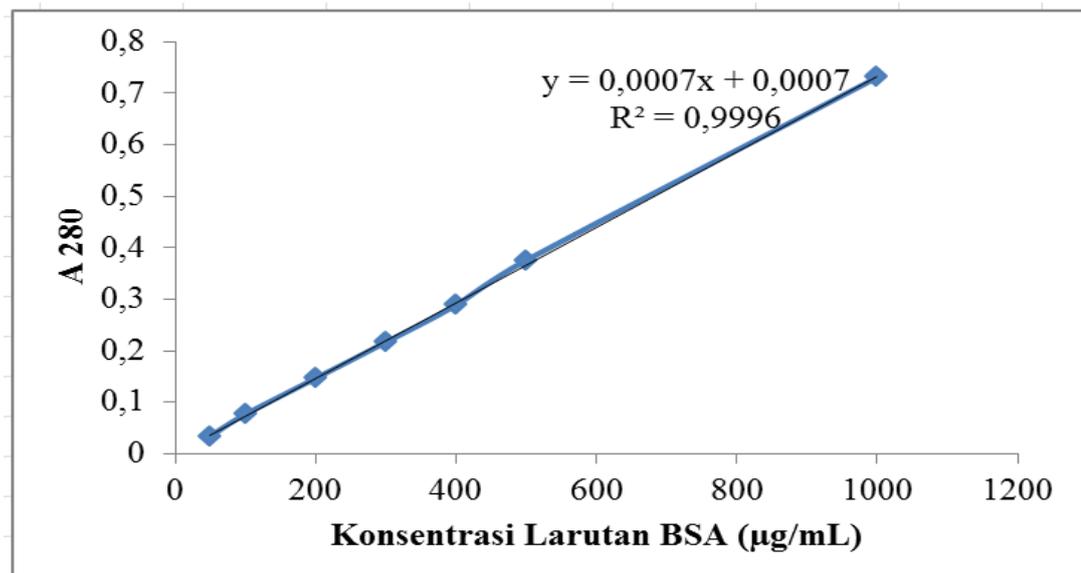
Lampiran 4: Kurva Standar ProteinKurva standar protein λ : 280nm

Konsentrasi standar ($\mu\text{g/mL}$)	A rata – rata
50	0,035
100	0,077
200	0,147
300	0,217
400	0,289
500	0,376
1000	0,731

a= 0,0007

b= 0,0007

r= 0,9998



Lampiran 5: Rerata Kadar Protein

Kelompok	Kadar Protein Total (mg/mL) rerata \pm SEM
K4	6,120 \pm 0,556
K8	3,389 \pm 0,181
K12	8,738 \pm 0,818
L4	5,506 \pm 1,619
L8	3,002 \pm 0,963
L12	7,258 \pm 1,738
H4	6,326 \pm 1,535
H8	2,775 \pm 0,730
H12	2,798 \pm 0,358
HL4	5,866 \pm 1,506
HL8	3,094 \pm 0,544
HL12	7,213 \pm 1,614

Keterangan:

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata \pm SEM

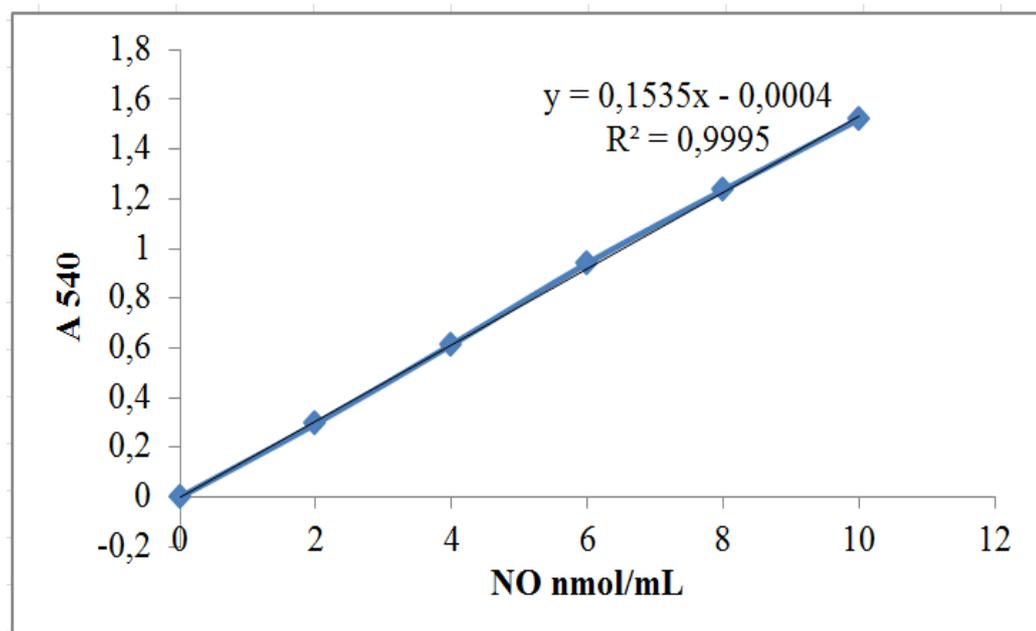
Lampiran 6: Kurva Standar NOKurva standar NO λ : 540nm

Konsentrasi standar (nmol/mL)	A rata - rata
0	0
2	0,295
4	0,613
6	0,941
8	1,235
10	1,52

a= 0,1535

b= -0,0004

r= 0,9998



Lampiran 7: Rerata Kadar NO

Kelompok	NO (nmol/ mg protein) rerata \pm SEM
K4	0,123 \pm 0,028
K8	0,117 \pm 0,017
K12	0,037 \pm 0,004
L4	1,351 \pm 0,445
L8	1,316 \pm 0,466
L12	0,163 \pm 0,043
H4	0,169 \pm 0,047
H8	0,465 \pm 0,319
H12	0,687 \pm 0,159
HL4	0,090 \pm 0,024
HL8	0,892 \pm 0,321
HL12	0,241 \pm 0,128

Keterangan:

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata \pm SEM

Lampiran 8: Kurva Standar Endotelin-1

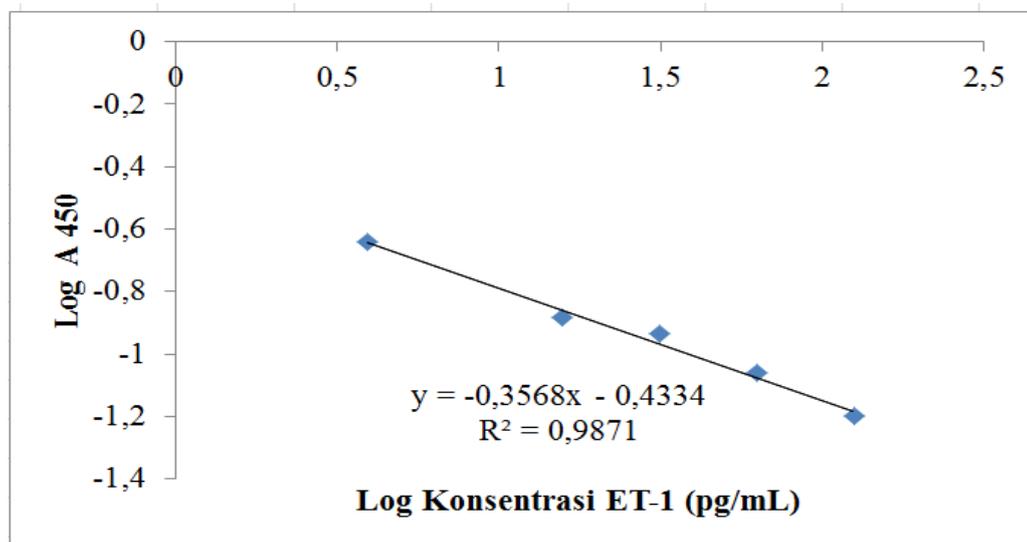
Kurva standar ET-1 λ : 450nm

Konsentrasi standar (pg/mL)	Log Konsentrasi	A rata - rata	Log A rata - rata
3,910	0,592	0,227	-0,644
15,630	1,194	0,130	-0,886
31,250	1,495	0,116	-0,936
62,500	1,796	0,087	-1,060
125	2,097	0,063	-1,201

a= -0,3568

b= -0,4334

r= 0,9871



Lampiran 9: Rerata Kadar ET-1

Kelompok	ET-1 (pg/mg protein) rerata \pm SEM
K4	0,015 \pm 0,007
K8	0,036 \pm 0,025
K12	0,057 \pm 0,051
L4	0,003 \pm 0,0009
L8	0,016 \pm 0,008
L12	0,030 \pm 0,019
H4	0,014 \pm 0,008
H8	0,019 \pm 0,017
H12	0,035 \pm 0,015
HL4	0,006 \pm 0,005
HL8	0,017 \pm 0,006
HL12	0,002 \pm 0,0006

Keterangan:

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata \pm SEM

Lampiran 10: Kurva Standar Aktivitas SOD

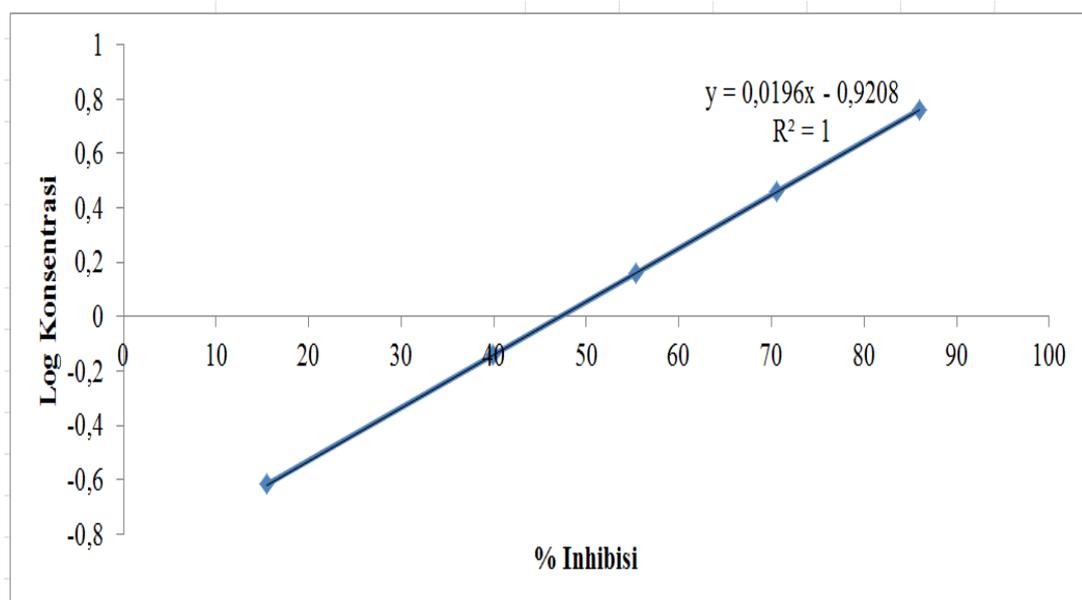
Kurva standar SOD λ : 505nm

Kode Standar	$\Delta A/\text{mnt}$	% Inhibisi	Konsentrasi Standar (U/mL)	Log Konsentrasi
S1	0,0298	100	0	0
S2	0,0252	84,5638	0,24125	-0,617532678
S3	0,0179	60,0671	0,72375	-0,140411423
S4	0,0133	44,6309	1,4475	0,160618572
S5	0,00876	29,396	2,895	0,461648568
S6	0,00417	13,9933	5,79	0,762678564

$$a = 0,01957$$

$$b = -0,92081$$

$$r = 1$$



Lampiran 11: Rerata Kadar Aktivitas SOD

Kelompok	Aktivitas Spesifik SOD (U/mg protein)
	rerata \pm SEM
K4	0,813 \pm 0,403
K8	0,917 \pm 0,212
K12	0,507 \pm 0,038
L4	1,004 \pm 0,216
L8	1,837 \pm 0,614
L12	0,663 \pm 0,125
H4	0,879 \pm 0,305
H8	2,010 \pm 0,623
H12	1,637 \pm 0,254
HL4	1,571 \pm 0,571
HL8	0,863 \pm 0,156
HL12	0,649 \pm 0,174

Keterangan:

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata \pm SEM

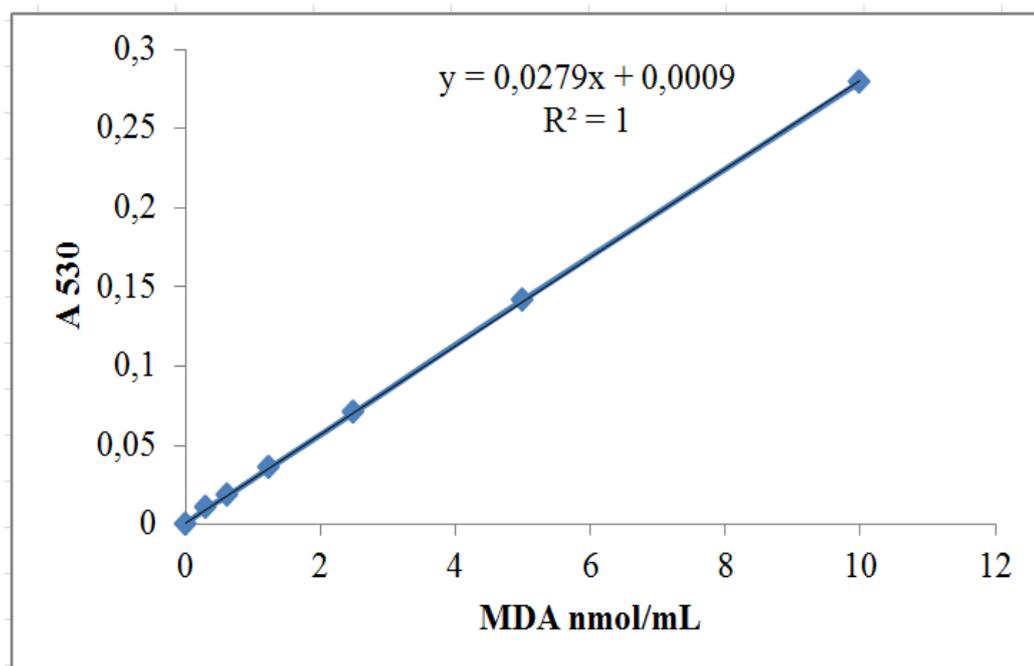
Lampiran 12: Kurva Standar MDAKurva standar MDA λ : 530nm

Konsentrasi standar (nmol/mL)	A rata - rata
0	0
0,3125	0,01035
0,625	0,01815
1,25	0,03575
2,5	0,0707
5	0,1417
10	0,2797

$$a = 0,0279$$

$$b = 0,0009$$

$$r = 1$$



Lampiran 13: Rerata Kadar MDA

Kelompok	MDA (nmol/mg jaringan)
	rerata \pm SEM
K4	0,169 \pm 0,049
K8	0,231 \pm 0,025
K12	0,115 \pm 0,053
L4	0,473 \pm 0,109
L8	0,170 \pm 0,020
L12	0,090 \pm 0,039
H4	0,066 \pm 0,007
H8	0,090 \pm 0,006
H12	0,067 \pm 0,016
HL4	0,047 \pm 0,039
HL8	0,037 \pm 0,024
HL12	0,033 \pm 0,005

Keterangan:

Data disajikan dalam bentuk nilai rerata \pm SEM

Lampiran 14: Sertifikat Pengujian Antioksidan dan Fitokimia



Kementerian Pertanian
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
 Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111
 Telepon : (0251) 8321879 Faximile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@telkom.net

SERTIFIKAT PENGUJIAN
CERTIFICATE OF ANALYSIS
 No. Adm. : 165/17/LAB/IV/15

DF 5.10.1.2.

Kepada Yth
 Dr. Donna Adriani, K.M
 FKUI

Kondisi / Identifikasi Contoh : Ekstrak
 Tanggal Penerimaan : 7 April 2015
 Tanggal Pengujian : 20 – 27 April 2015

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Ekstrak Etanol 96% Rosela	- Antioksidan (%) Uji Fitokimia : - Saponin - Tanin - Alkaloid - Fenolik - Flavonoid - Triterpenoid - Steroid - Glikosida	168,77 + + + + + - + -	Kualitatif

Bogor, 29 April 2015

Manajer Teknis


 Ma'mun, S.Si

- Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar mencantumkan nomor administrasi.
 - Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian Balitro.

Lembar kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi

Lampiran 15: Sertifikat Pengujian Antosianin



KEMENTERIAN PERTANIAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PERTANIAN

F.05

BALAI BESAR PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN PASCAPANEN PERTANIAN
LABORATORIUM PENGUJIAN

Jalan Tentara Pelajar 12
Bogor 16114
Jalan Surotokuntho No. 56
Rawagabus Karawang 41313

Telp.0251-8321762, 0251-8346367
Fax. 0251-8346367
Telp.0267-401294
Fax. 0267-402357

LAPORAN PENGUJIAN LABORATORIUM

No. Administrasi / <i>Number</i>	:	13/LBBPSC/IV/PL/15
Nama/Instansi Pengirim/ <i>Name</i>	:	Dr. Donna Adriani K.M
No. Surat Permohonan <i>Number of letter</i>	:	-
Alamat Pengirim/ <i>Address</i>	:	Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
Tanggal Penerimaan Sampel/ <i>Date of receive</i>	:	07 April 2015
Jenis Produk/ <i>Type of product</i>	:	Ekstrak Etanol 96% Rosella
Unit Kemasan/ <i>Packaging unit</i>	:	Plastik
Berat bersih/ <i>Netto</i>	:	-

No.	Nama Sampel <i>Sample name</i>	Jenis Analisis <i>Type of Analysis</i>	Metode <i>Method</i>	Hasil <i>Result</i>	Satuan <i>Unit</i>
1.	Ekstrak Etanol 96% Rosella	Antosianin	Spektro	601,25	ppm
		Vitamin C (Asam Askorbat)	Titiasi	76,90	mg/100g

Bogor, 27 April 2015
Manajer Teknis Kimia,

Dr. Ir. Endang Yuli Purwani

Laporan ini dilarang diperbanyak tanpa persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian BBPP Pascapanen Pertanian
Laporan ini hanya berlaku pada contoh yang diuji
Laporan ini merupakan hasil pengujian bukan penelitian
Sisa contoh akan kami simpan selama tiga bulan dari tanggal terbit laporan

PENGARUH *Hibiscus sabdariffa* Linn. PADA TIKUS YANG DIBERI LATIHAN FISIK AEROBIK TERHADAP DISFUNGSI ENDOTEL DAN STRES OKSIDATIF AKIBAT PERTAMBAHAN USIA

Donna AKM¹, Minarma Siagian², Dewi Irawati SS²

¹Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

²Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Abstrak

Latar Belakang: Berdasarkan data dari WHO, penderita penyakit kardiovaskular diduga akan terus meningkat. Salah satu proses patologis yang mendasari penyakit kardiovaskular adalah aterosklerosis. Disfungsi endotel yang mengawali aterosklerosis dimulai sejak anak-anak. Stres oksidatif dapat disebabkan oleh pertambahan usia. Salah satu herba yang memiliki efek antioksidan kuat dan dapat mencegah stres oksidatif adalah *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Metode: Penelitian eksperimental dilakukan pada 36 ekor tikus jantan galur Wistar usia 5 minggu selama 4 minggu, 8 minggu, dan 12 minggu. Hewan coba secara acak terbagi atas 12 kelompok, yaitu: kontrol (K4, K8, K12), latihan fisik aerobik (L4, L8, L12), pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari (H4, H8, H12) dan kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari (HL4, HL8, HL12). Pengukuran kadar NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA menggunakan supernatan dari homogenat aorta abdominal.

Hasil: Pola kadar NO kelompok K dan L menurun sesuai peningkatan usia. Terdapat perbedaan bermakna antara kadar NO kelompok K dan L, K dan H, dan K dan HL. Kadar ET-1 pada semua kelompok tidak bermakna secara statistik. Terdapat peningkatan aktivitas spesifik SOD pada kelompok L, H, dan HL dibandingkan K. Terdapat perbedaan bermakna Kadar MDA antara K dan H, L dan HL. Terdapat korelasi sedang antara NO dan aktivitas spesifik SOD.

Kesimpulan: latihan fisik aerobik, pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari dan kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari menurunkan kadar MDA dan ET-1, sebaliknya meningkatkan aktivitas spesifik SOD dan NO. Penurunan kadar MDA lebih jelas terlihat pada kelompok HL. Peningkatan aktivitas spesifik SOD meningkatkan produksi NO. Tidak terjadi disfungsi endotel dan stres oksidatif pada seluruh kelompok.

Kata kunci:

Latihan fisik aerobik, *Hibiscus sabdariffa* Linn., NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD, MDA.

1.Latar Belakang

Berdasarkan data dari WHO, penderita penyakit kardiovaskular diduga akan terus meningkat. Diperkirakan 17,3 juta orang meninggal akibat penyakit

kardiovaskular pada tahun 2008 yang merepresentasikan 30% dari seluruh kematian di dunia.^{1,2} Pada tahun 2030 diperkirakan 23,6 juta orang meninggal akibat penyakit kardiovaskular. Berdasarkan data dari *American Heart Association* (AHA 2011) penyebab kematian akibat penyakit kardiovaskular sebesar 229,6 per 100.000 penduduk Amerika. Penyakit kardiovaskular merupakan salah satu penyebab dari tiga penyebab kematian utama di Amerika.²

Salah satu proses patologis yang mendasari penyakit kardiovaskular adalah aterosklerosis. Aterosklerosis diawali oleh disfungsi endotel yang terjadi pada masa anak – anak karena berbagai faktor risiko. Berdasarkan penelitian Hong YM (2010)³ pada 50% anak – anak di Amerika usia 10 – 14 tahun terdapat tanda awal aterosklerosis yang didasari oleh adanya stres oksidatif. Demikian pula penelitian Junqueira VBC dkk (2004)⁴, dijelaskan bahwa penambahan usia dapat menyebabkan stres oksidatif. Untuk mencegah disfungsi endotel pada penelitian ini dilakukan latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. pada tikus usia juvenil (5 minggu) yang setara dengan anak usia 10 tahun pada manusia.^{5,6}

Latihan fisik yang dilakukan secara teratur dapat memperbaiki disfungsi endotel melalui mekanisme peningkatan *vascular shear stress* akibat peningkatan aliran darah. Peningkatan *vascular shear stress* akan meningkatkan fosforilasi *endothelial NO synthase* (eNOS), sehingga menyebabkan peningkatan aktivitas eNOS. Dengan demikian *bioavailability Nitric Oxide* (NO) akan meningkat, sehingga produksi NO akan meningkat. Hal ini akan menghambat produksi *Endothelin-1* (ET-1), sehingga fungsi vaskular akan meningkat.^{7,8,9}

Stres oksidatif dapat menyebabkan *bioavailability* NO berkurang sehingga menyebabkan hipertensi dan aterosklerosis. Berkurangnya produksi NO menyebabkan pengikatan ET-1 terhadap reseptornya (ET_A/ET_B) bertambah sehingga kadar kalsium di sel otot polos vaskular meningkat, menyebabkan vasokonstriksi, dan akan mengakibatkan hipertensi.^{8,9}

Berdasarkan penelitian Utami TP (2014)¹⁰ kadar malondialdehid (MDA) pada tikus Wistar jantan juvenil usia 5 minggu kelompok latihan fisik aerobik selama 8 minggu lebih tinggi dibandingkan kontrol. Salah satu herba yang memiliki efek antioksidan kuat dan dapat mencegah stres oksidatif adalah *Hibiscus sabdariffa* Linn.^{11,12} Antioksidan berperan dalam mendonorkan elektronnya sehingga mencegah oksidasi. *Hibiscus sabdariffa* Linn. mengandung antosianin yang berperan sebagai antioksidan. Pada penelitian Kahanjak DN (2014)¹³ menjelaskan bahwa ekstrak air *Hibiscus sabdariffa* Linn. 400 mg/kgBB/hari dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas GPx pada sindrom *overtraining*.

Berdasarkan studi patologi Jarvisalo MJ dkk (2010)¹⁴ dijelaskan bahwa aorta abdominal adalah tempat deposit lemak pertama pada anak-anak pada risiko aterosklerosis. Penelitian Padilla J dkk (2013)¹⁵ juga menjelaskan bahwa aorta abdominal lebih mudah mengalami aterosklerosis dibandingkan aorta toraks pada tikus.

2. Subjek dan Metode Penelitian

2.1 Subjek Penelitian

Studi eksperimental, 36 ekor tikus jantan galur Wistar usia 5 minggu dengan perlakuan selama 4 minggu, 8 minggu, dan 12 minggu. Hewan coba secara acak terbagi atas 12 kelompok, yaitu: kontrol (K4, K8, dan K12), latihan fisik aerobik (L4, L8, dan L12), pemberian *H. sabdariffa* Linn 400 mg/kgBB/hari (H4, H8, dan H12), dan kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* Linn 400 mg/kgBB/hari (HL4, HL8, HL12).

2.2 Latihan Fisik

Latihan fisik aerobik menggunakan *treadmill* tikus dengan kecepatan yang ditingkatkan secara bertahap dan dipertahankan pada intensitas sedang sesuai protokol dari Hsu YC¹⁶ dan Lontoh S¹⁷ yang telah diadaptasi juga oleh Utami TP¹⁰. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 5 minggu dimulai dengan kecepatan 12 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia 7 minggu dimulai dengan kecepatan 15 m/menit selama dua minggu. Latihan fisik aerobik pada kelompok tikus usia lebih dari 9 minggu dimulai dengan kecepatan 20 m/menit. Latihan fisik aerobik dilakukan dengan frekuensi 5x dalam seminggu, durasi latihan 20 menit dengan 90 detik istirahat setiap 5 menit berlari untuk menghindari kelelahan.

2.3 Ekstrak etanol *Hibiscus sabdariffa* Linn.

Diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO). Pemberian dilakukan selama 5 hari/minggu berdasarkan kelompok dengan dosis 400 mg/kgBB/hari secara oral menggunakan spuit injeksi berkanul (sonde).

2.4 Parameter yang Diperiksa

2.4.1 Kadar NO

Menggunakan kit *Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit* dari BioVision dengan nomor katalog #K262-200.

2.4.2 Kadar ET-1

Menggunakan ELISA kit dari USCNK dengan no katalog CEA482Ra.

2.4.3 Kadar SOD

Menggunakan RANSOD kit dari Randox.

2.4.4 Kadar MDA

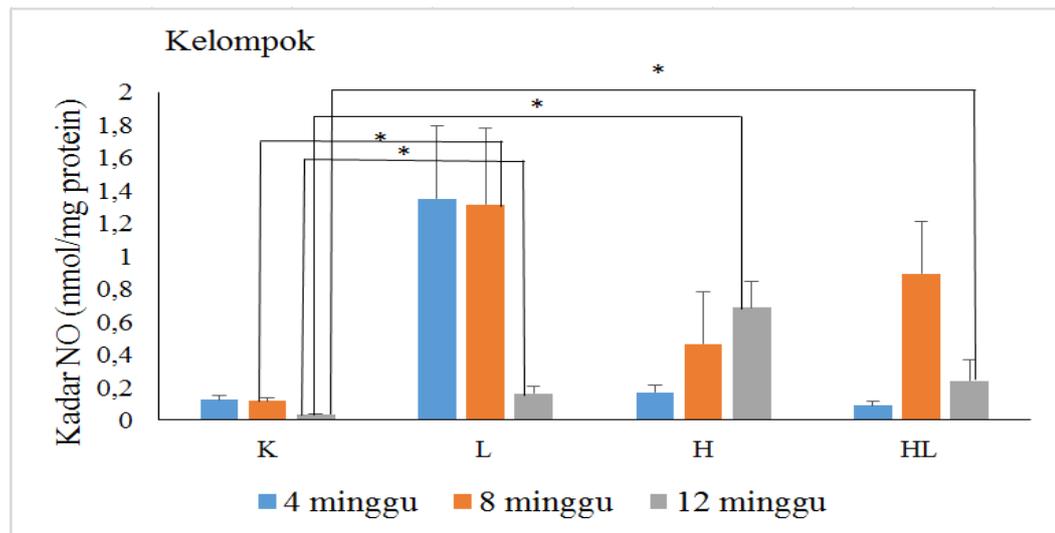
Menggunakan metode Wills.

2.6 Analisis Data

Analisis data yang akan dilakukan dengan uji *one way* ANOVA, uji Tukey multivariat dan uji korelasi Pearson dengan menggunakan program SPSS versi 21 dan $\alpha=0,05$.

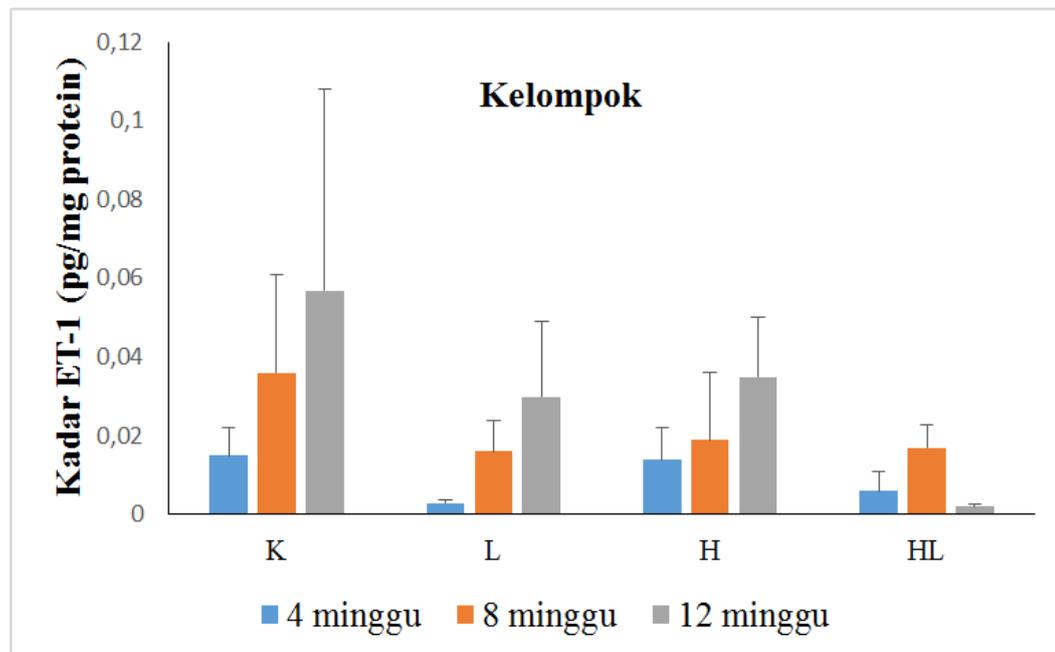
3. Hasil

3.1 Hasil Pengukuran Kadar Nitric Oxide



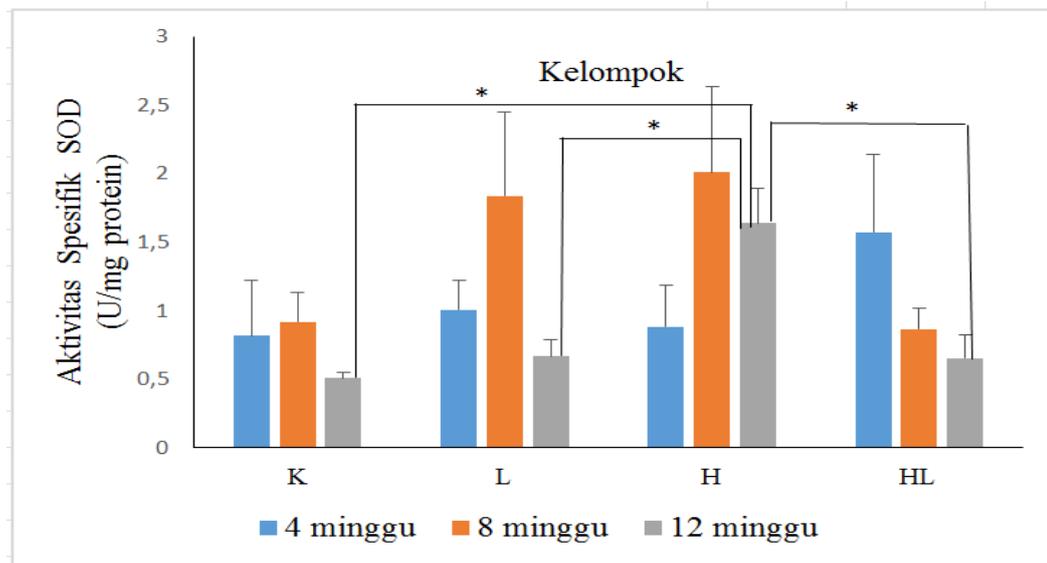
Gambar 4.1: Perbandingan kadar NO pada semua kelompok. * perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

3.2 Hasil Pengukuran Kadar ET-1



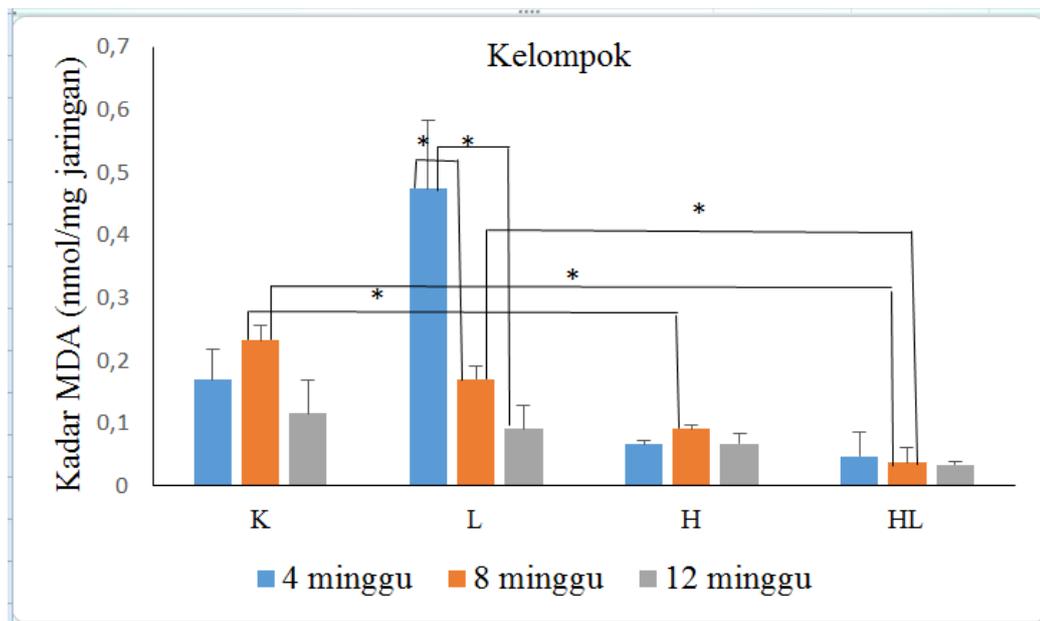
Gambar 4.2: Perbandingan kadar ET-1 pada semua kelompok

3.3 Hasil Pengukuran Aktivitas SOD



Gambar 4.3: Perbandingan aktivitas SOD pada semua kelompok. * perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

3.4 Hasil Pengukuran Kadar MDA



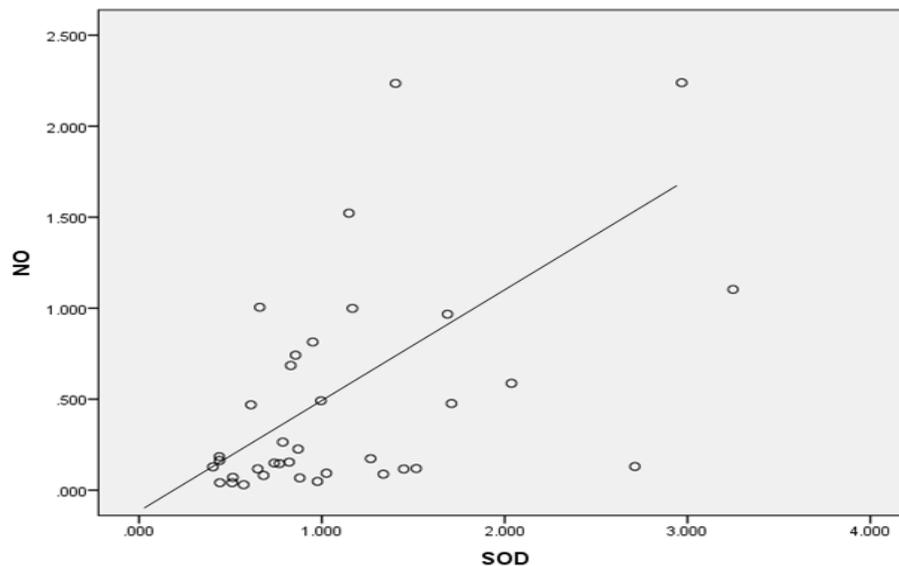
Gambar 4.4: Perbandingan kadar MDA pada semua kelompok * perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$

3.5 Korelasi antara NO, ET-1, aktivitas spesifik SOD dan MDA

Tabel 3.1: Analisis korelasi antara NO, ET-1, Aktivitas SOD, dan MDA

Variabel	R	Nilai p
NO dengan SOD	0,493	0,002*
NO dengan MDA	0,189	0,271
NO dengan ET-1	0,005	0,975
SOD dengan MDA	0,067	0,698
SOD dengan ET-1	0,025	0,884
MDA dengan ET-1	-0,085	0,621

Keterangan: Korelasi Pearson; nilai kemaknaan $p < 0,05$. Tanda * menunjukkan signifikan atau bermakna secara statistika, R: koefisien korelasi



Gambar 4.5 *Scatter dot* antara NO dan SOD

4.6 Analisis Multivariat Pengaruh MDA, SOD dan ET-1 terhadap NO

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh MDA, SOD, dan ET1 terhadap NO yang bermakna secara statistik ($p=0,018$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh SOD terhadap NO yang bermakna secara statistik ($p=0,003$). Namun, tidak terdapat pengaruh ET-1 yang bermakna secara statistik terhadap NO ($p=0,966$) dan tidak terdapat pengaruh MDA yang bermakna secara statistik terhadap NO ($p=0,310$).

4.7 Analisis Multivariat Pengaruh MDA dan SOD terhadap ET-1

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh MDA dan SOD terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik ($p=0,425$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh MDA terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik dan tidak terdapat pengaruh SOD terhadap ET-1 yang bermakna secara statistik.

4.8 Analisis Multivariat Pengaruh NO dan MDA terhadap SOD

Berdasarkan analisis secara simultan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh NO dan MDA terhadap SOD yang bermakna secara statistik ($p=0,004$). Berdasarkan analisis secara parsial dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh NO yang bermakna secara statistik terhadap SOD ($p=0,001$). Namun, tidak terdapat pengaruh MDA yang bermakna secara statistik terhadap SOD ($p=0,143$).

4. Pembahasan

4.1. Hasil Pengukuran Kadar Nitric Oxide

5.1 Pertambahan Usia dan Disfungsi Endotel

Pada keadaan normal, NO dan ET-1 berfungsi mempertahankan tonus vaskular. Pada umumnya kadar ET-1 dalam jumlah sedikit, sedangkan kadar NO dipertahankan tetap. Ketidak-imbangan antara NO dan ET-1 dapat menyebabkan disfungsi endotel. Disfungsi endotel terjadi jika produksi NO atau *bioavailability* NO menurun, produksi ET-1 lebih tinggi dibandingkan produksi NO.^{18,19,20}

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Puzserova dkk (2014)²¹ menjelaskan bahwa proses penuaan (*aging*) berhubungan erat dengan penurunan produksi NO dan penurunan *bioavailability* NO.

5.2 Pertambahan Usia dan Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang antara pro-oksidan dan antioksidan, yaitu saat pro-oksidan melebihi antioksidan, sehingga produksi ROS meningkat. Junqueira VBC dkk (2004)⁴ menjelaskan bahwa pertambahan usia dapat menyebabkan stres oksidatif. Knight dkk (2000), De La Fuente dkk (2002) menjelaskan bahwa proses penuaan dapat disebabkan oleh efek kumulatif dari ROS (Andriollo-Sanchez M dkk, 2005).²² Harman dkk (1998) dan Finkel dan Holbrook (2000) menjelaskan bahwa stres oksidatif meningkat pada subyek lanjut usia, hal ini diduga akibat produksi radikal bebas yang tidak terkontrol oleh mitokondria yang mengalami penuaan dan penurunan sistem pertahanan antioksidan (Andriollo-Sanchez M dkk, 2005).²²

5.3 Perubahan pada Kontrol

5.3.1 Kadar NO

Pola kadar NO pada kelompok kontrol (K4, K8, dan K12) terlihat cenderung menurun sesuai dengan peningkatan usia. Namun, hal ini tidak

bermakna secara statistik. Hal ini sesuai dengan penelitian Chatrath dkk (2003)²³ yang menjelaskan bahwa produksi NO pada usia dewasa lebih rendah dibandingkan produksi NO pada usia anak – anak yang disebabkan oleh perubahan hormonal yang berhubungan dengan maturitas seksual dapat memengaruhi regulasi protein eNOS saat postranskripsi atau postranslasi. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Puzserova dkk (2014)²¹ yang menjelaskan bahwa proses penuaan (*aging*) berhubungan erat dengan penurunan produksi NO dan penurunan *bioavailability* NO.

5.3.2 Kadar ET-1

Berdasarkan penelitian ini, terlihat pola ET-1 pada kelompok kontrol semakin meningkat. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini akibat berkurangnya *bioavailability* NO sehingga menyebabkan produksi ET-1 meningkat akibat inaktivitas fisik.^{8,9} Pada penelitian Latorre (2002)²⁴, menjelaskan bahwa plasma ET-1 meningkat pada hewan yang hidup sedenter.

5.3.3 Kadar MDA

Pada penelitian ini dipilih MDA sebagai penanda stres oksidatif karena ROS terutama mengoksidasi lipid, sedangkan MDA adalah hasil dari peroksidasi lipid. Penelitian – penelitian stres oksidatif juga sering menggunakan MDA sebagai penanda stres oksidatif.

Pada penelitian ini pola kadar MDA pada usia remaja kelompok kontrol cenderung lebih tinggi dibandingkan usia anak dan dewasa. Namun, hal ini secara statistik tidak bermakna. Kadar MDA yang tinggi pada usia remaja diduga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan.²⁵

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁰ yang didapatkan hasil kadar MDA pada tikus dewasa muda lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa kadar MDA kelompok kontrol yang tinggi pada usia dewasa muda disebabkan karena pemindahan tikus dari tempat yang satu ke tempat yang baru dari masa penyapihan sampai masa perlakuan, sehingga menyebabkan stres pada tikus juvenil. Pada penelitian ini, faktor yang dapat menimbulkan stres pada tikus yang berupa pemindahan sejak masa penyapihan diminimalkan dengan melakukan penelitian pada *animal house* yang memiliki fasilitas *breeding* dan pemeliharaan dalam satu gedung.

5.3.4 Aktivitas Spesifik SOD

Superoksida Dismutase (SOD) adalah salah satu antioksidan enzimatis yang dapat menangkal pengaruh negatif oksidan dalam tubuh. Berdasarkan mekanisme kerjanya, SOD digolongkan sebagai antioksidan primer, karena dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, sehingga berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. SOD bekerja sebagai antioksidan lini pertama yang menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi stabil. SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutase dari radikal anion superoksida menjadi H₂O₂.

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok kontrol terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga karena kadar MDA yang lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa, yang merupakan mekanisme sistem pertahanan antioksidan terhadap kadar oksidan yang meningkat. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁰ dimana didapatkan hasil aktivitas SOD pada tikus dewasa muda lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa.

5.4 Perubahan pada Latihan Fisik Aerobik

5.4.1 Kadar NO

Pola kadar NO pada kelompok latihan fisik aerobik (L4, L8, dan L12) terlihat cenderung menurun sesuai dengan peningkatan usia dan peningkatan lamanya latihan fisik. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Lantz J dkk (2015)²⁶ dan Trinity JD dkk (2014)²⁷ menjelaskan bahwa peningkatan usia menyebabkan penurunan *shear stress*, akibat diameter pembuluh darah menjadi lebih lebar.

Kadar NO pada kelompok latihan fisik aerobik lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁰ yang didapatkan hasil kadar NO lebih tinggi pada kelompok latihan fisik aerobik jika dibandingkan dengan kontrol pada tikus juvenil. Hal ini diduga terjadi karena peningkatan ekspresi mRNA eNOS pada jaringan aorta pasca latihan fisik jangka panjang

Hal yang serupa juga didapatkan pada penelitian Yang dkk (2002)²⁸ pada tikus Wistar jantan berusia 5 minggu, yang melakukan latihan fisik selama 10 minggu. Hasil penelitian ini adalah terdapat peningkatan ekspresi mRNA eNOS pada endotel aorta tikus.

5.4.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok latihan fisik cenderung semakin meningkat. Penurunan produksi NO menyebabkan, kadar ET-1 meningkat. Kadar ET-1 kelompok L pada semua kelompok lebih rendah dibandingkan kontrol. Latorre (2002)²⁴ juga menjelaskan bahwa latihan fisik menghilangkan sensitivitas ET-1 pada jaringan aorta tikus Wistar jantan.

5.4.3 Kadar MDA

Pada kelompok L4 dalam penelitian ini, kadar MDA kelompok L4 lebih tinggi dibandingkan L8 dan L12. Hal ini diduga latihan fisik aerobik pada tikus juvenil yang baru memulai latihan fisik aerobik masih terlalu berat. Pola kadar MDA kelompok latihan fisik aerobik terlihat semakin meningkat usia dan semakin meningkat lama latihannya, kadar MDA nya lebih rendah. Pola kadar MDA latihan fisik aerobik cenderung menurun. Hal ini karena latihan fisik aerobik jangka panjang dapat menurunkan produksi ROS melalui peningkatan ekspresi dan aktivitas antioksidan.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁰ yang didapatkan hasil kadar MDA pada tikus dewasa muda yang dilakukan latihan fisik aerobik lebih tinggi jika dibandingkan usia dewasa. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa kadar MDA yang lebih tinggi pada usia dewasa muda disebabkan karena pemindahan tikus dari tempat yang satu ke tempat yang baru sehingga menyebabkan stres pada tikus juvenil.

Berdasarkan penelitian Gu Q dkk (2012)²⁹ menjelaskan bahwa latihan fisik pada tikus hipertensi spontan dapat meningkatkan kandungan nitrit dan nitrat (NO_x) dan upregulasi fosforilasi NOS3. Latihan fisik juga efektif menurunkan produksi MDA dan menekan pembentukan radikal superoksida dan peroksinitrit di aorta melalui peningkatan aktivitas SOD dan katalase, dan menekan aktivitas NADPH oksidase. Kesimpulannya, latihan fisik dapat mencegah hipertrofi aorta dan disfungsi endotel, yang diduga melalui peningkatan *bioavailability* NO pada tikus hipertensi spontan.

5.4.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok latihan fisik aerobik terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada latihan fisik aerobik lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa latihan fisik meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Utami TP (2014)¹⁰ yang didapatkan hasil aktivitas spesifik SOD lebih tinggi pada kelompok latihan fisik aerobik jika dibandingkan dengan kontrol pada tikus juvenil.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Berzosa dkk (2011)³⁰ menunjukkan bahwa ROS yang terbentuk selama aktivitas fisik dengan intensitas sedang akan mengaktifkan jalur Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs) yang selanjutnya akan mengaktifkan faktor transkripsi Nuclear Factor kappa B (NF-κB). Aktivasi faktor transkripsi NF-κB akan meningkatkan ekspresi enzim - enzim penting yang berhubungan dengan pertahanan sel (MnSOD dan GPx) dan adaptasi latihan (iNOS dan eNOS). Dengan demikian latihan fisik dengan intensitas sedang dapat memiliki efek sebagai antioksidan.

Pada penelitian Ji dkk (2004)³¹ menjelaskan bahwa ekspresi gen SOD pada mitokondria otot meningkat setelah latihan fisik yg diperlihatkan melalui peningkatan Nuclear Factor kappa B (NF-κB). Latihan fisik yang berulang akan meningkatkan sintesis protein enzim antioksidan secara *de novo*. Penelitian yang dilakukan oleh deMoraes dkk (2008)³² menjelaskan bahwa latihan fisik meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta.

5.5 Perubahan pada Pemberian *Hibiscus sabdariffa* Linn.

5.5.1 Kadar NO

Pola kadar NO kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. (H4, H8, dan H12) cenderung meningkat sesuai dengan peningkatan usia. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Hal ini diduga akibat pencegahan stres oksidatif yang

menyebabkan peningkatan *bioavailability* NO, sehingga menyebabkan peningkatan produksi NO.

Kadar NO kelompok H lebih tinggi dibandingkan kontrol pada semua kelompok usia. Namun, kadar NO kelompok H4 lebih rendah jika dibandingkan kelompok L4 dan kelompok H8 lebih rendah jika dibandingkan kelompok L8, hal ini diduga karena pemberian dosis *H. sabdariffa* L. kurang.

5.5.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. cenderung semakin meningkat. Kadar ET-1 kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. pada semua kelompok lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga akibat peningkatan *bioavailability* NO, sehingga dapat menghambat produksi ET-1. Namun, kadar ET-1 kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. lebih tinggi dibandingkan kelompok latihan fisik aerobik diduga karena dosisnya kurang.

5.5.3 Kadar MDA

H. sabdariffa L. berperan sebagai antioksidan sekunder dengan cara menangkap radikal bebas (*radikal free scavenger*). Dalam penelitian ini pola kadar MDA pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Kadar MDA yang tinggi pada usia remaja diduga dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan.²⁵ Kadar MDA pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kontrol.

5.5.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pola aktivitas spesifik SOD pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga karena kadar MDA yang lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa, yang merupakan mekanisme sistem pertahanan antioksidan terhadap kadar oksidan yang meningkat.

Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada kelompok pemberian *H. sabdariffa* L., lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta.

5.6 Perubahan pada Kombinasi Latihan Fisik Aerobik dan Pemberian

***Hibiscus sabdariffa* Linn.**

5.6.1 Kadar NO

Pola kadar NO kelompok kombinasi pemberian *H. sabdariffa* L. dan latihan fisik aerobik (HL4, HL8, dan HL12) tampak lebih tinggi pada usia remaja dibandingkan usia anak dan dewasa. Hal ini diduga disebabkan karena pola ET-1 yang lebih tinggi pada usia remaja. Namun, hal ini tidak bermakna secara statistik. Kadar NO pada kelompok HL4 lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga terjadi karena terdapat mekanisme kompetitif inhibitor.

5.6.2 Kadar ET-1

Pola kadar ET-1 pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. pada usia dewasa lebih rendah jika dibandingkan usia anak dan remaja. Hal ini disebabkan karena ET-1 meningkat oleh faktor pertumbuhan.³³ Kadar ET-1 pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal ini diduga latihan fisik jangka panjang dan pemberian *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan kadar ET-1.

5.6.3 Kadar MDA

Pola kadar MDA kelompok kombinasi latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. terlihat semakin meningkatnya usia dan semakin meningkat lama latihannya, kadar MDA nya lebih rendah. Kadar MDA kelompok kombinasi latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L.. Hal ini diduga akibat mekanisme sinergi yang terjadi.

5.6.4 Aktivitas Spesifik SOD

Pada penelitian ini, aktivitas spesifik SOD pada kelompok kombinasi latihan fisik aerobik dan pemberian *H. sabdariffa* L. lebih tinggi jika dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa latihan fisik dan pemberian *H. sabdariffa* L. meningkatkan ekspresi SOD pada jaringan aorta

5.7 Keseimbangan antara Kadar SOD dan MDA

Stres oksidatif adalah keadaan tidak seimbang antara pro-oksidan dan antioksidan, dimana kapasitas pro-oksidan melebihi kapasitas antioksidan.²⁵ Pada penelitian ini tidak terjadi stres oksidatif pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat. Peningkatan kadar MDA diimbangi oleh aktivitas spesifik SOD yang meningkat sebagai akibat mekanisme sistem antioksidan, sehingga tidak menimbulkan stres oksidatif.

5.8 Keseimbangan antara kadar NO dan ET-1

Disfungsi endotel terjadi ketika produksi NO menurun dan produksi ET-1 meningkat.^{8,9,20} Pada penelitian ini tidak terjadi disfungsi endotel pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat.

5.9 Korelasi antara SOD dan NO

Radikal superoksida dapat menyebabkan produksi NO dan *bioavailability* NO menurun. Peningkatan SOD dapat meningkatkan produksi NO dan *bioavailability* NO. Penambahan SOD menghilangkan superoksida dengan mengubahnya menjadi H₂O₂, sehingga dapat meningkatkan kadar NO. SOD dapat mencegah hilangnya *bioavailability* NO oleh karena radikal superoksida.^{8,9,34}

Kesimpulan

Kadar NO dan aktivitas spesifik SOD lebih tinggi pada kelompok L, H, dan HL dibandingkan K. Kadar ET-1 dan MDA lebih rendah pada kelompok L, H dan HL dibandingkan K. Kadar MDA kelompok HL lebih rendah dibandingkan kelompok K, L dan H. Pada penelitian ini tidak terjadi disfungsi endotel pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat. Pada penelitian ini tidak terjadi stres oksidatif pada semua kelompok, ditandai dengan tidak adanya korelasi yang bermakna pada uji korelasi Pearson dan analisis multivariat. Terdapat hubungan korelasi sedang antara NO dan aktivitas spesifik SOD. Peningkatan aktivitas spesifik SOD dapat meningkatkan produksi NO dan *bioavailability* NO. Penambahan SOD menghilangkan superoksida dengan mengubahnya menjadi H₂O₂, sehingga dapat meningkatkan kadar NO. SOD dapat mencegah hilangnya *bioavailability* NO oleh karena radikal superoksida.^{8,9,34}

Daftar Pustaka

1. Mendis S, Puska P, Norrving B. Editors. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization, Geneva 2011.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015; 131: 4-132.
3. Hong YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ J*. 2010 Jan; 40(1):1-9.
4. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud R, et al. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004; 25: 5-16.
5. Andreollo NA, dos Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: What is the relationship?. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51.
6. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: How old is it in comparison with human age?. *Biomed. Int*. 2011; 2: 81-9.
7. Sherwood L. *Human Physiology: From Cells to Systems*. 7th ed. Belmont: Nelson Education, Ltd; 2010. pp. 333-82.
8. Bohm F, Pernow J. Review: The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2007; 76: 9-18.
9. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: New perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300: 1288-95.
10. Utami TP. Pengaruh latihan fisik pada tikus juvenil dan dewasa muda terhadap kadar *nitric oxide*, malondialdehid dan aktivitas spesifik enzim *superoxide dismutase* aorta abdominal (tesis). Jakarta: Universitas Indonesia; 2015.

11. Ilyas EIL, Kartinah NT, Andraini T, Goenarjo RA, Kahandjak DN. Effects of *Hibiscus sabdariffa* Linn. on insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) to prevent overtraining syndrome. *Med J Indones.* 2014;23:187-91.
12. Andraini T, Yolanda S. Prevention of insulin resistance with *Hibiscus sabdariffa* Linn. extract in high-fructose fed rat. *Med J Indones.* 2014;23:192-6.
13. Kahanjak D. Efek *Hibiscus sabdariffa* Linn. dalam mencegah stres oksidatif pada tikus yang diberi latihan fisik aerobik *overtraining*: Pengamatan terhadap kadar MDA dan aktivitas glutathione peroksidase (tesis). Jakarta: Universitas Indonesia; 2014.
14. Jarvisalo MJ, Jartti L, Nanto-Salonen K, Irjala K, Ronnema T, Hartiala JJ, et al. Increased aortic intima-media thickness: A marker of preclinical atherosclerosis in high-risk children. *Circulation.* 2001; 104:2943-7.
15. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013; 304: 543-52.
16. Hsu YC, Chen HI, Kuo YM, Yu L, Huang TY, Chen SJ, et al. Chronic treadmill running in normotensive rats resets the resting blood pressure to lower levels by upregulating the hypothalamic GABAergic system. *J Hypertens.* 2011; 29: 2339-48.
17. Lontoh SO. Pengaruh latihan fisik anaerobik dan detraining terhadap morfologi miokardium ventrikel kiri tikus Wistar jantan [tesis]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2013.
18. Bohm F, Pernow J. Review: The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research.* 2007; 76: 9-18.
19. Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: New perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 300: 1288-95.
20. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 109: 27-32.
21. Puzserova A, Ilovska V, Balis P, Slezak P, Bernatova I. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. *Biomed Research International.* 2014: 12.
22. Andriollo-Sanchez M, Hininger-Favier I, Meunier N, Venneria E, O'Connor JM, Maiani G, Coudray C, et al. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: The ZENITH study. 2005; 2: 558-62.
23. Chatrath R, Ronninggen KL, Severson SR, LaBrecche P, Jayachandran M, Bracamonte MP, et al. Endothelium-dependent responses in coronary arteries are changed with puberty in male pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1168-76.
24. Latorre E, Morán M, Aragonés D, Saborido A, Fernández I, Delgado J, et al. Exercise training-induced changes in sensitivity to endothelin-1 and aortic and cerebellum lipid profile in rats. *Lipids.* 2002; 37: 49-53.
25. Peternelj T, Coombes JS. Antioxidant supplementation during exercise training beneficial or detrimental?. *Sports Med.* 2011; 41(12) 1043-69.

26. Lantz J, Renner J, Länne T, Karlsson M. Is aortic wall shear stress affected by aging? An image-based numerical study with two age groups. *Med Eng Phys.* 2015; 37(3): 265-71.
27. Trinity JD, Groot HJ, Layec G, Rossman MJ, Ives SJ, Richardson RS. Impact of age and body position on the contribution of nitric oxide to femoral artery shear rate. *Hypertension.* 2014; 63: 1019-25.
28. Yang AI, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen H. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of aorta. *J Biomed Sci.* 2002; 9: 149-55.
29. Gu Q, Wang B, Zhang X, Ma Y, Liu J, Wang X. Contribution of hydrogen sulfide and nitric oxide to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2008; 375: 199-206.
30. Berzosa C, Cebrián I, Fuentes-Broto L, Gómez-Trullén E, Piedrafita E, Martínez-Ballarín E, et al. Acute exercise increases plasma total antioxidant status and antioxidant enzyme activities in untrained men. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011; 2011: 540-58.
31. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina AJ: Acute exercise activate nuclear factor kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *FASEB J* 2004;18:1499-505.
32. DeMoraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* 2008; 8: 1-12.
33. Ganong WF. *Review of Medical Physiology.* 23rd ed. New York: McGraw Hill; 2010. p. 616-9.
34. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine,* 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007.

RIWAYAT HIDUP

BIODATA DIRI

Nama Lengkap : Donna Adriani Kusumadewi Muhammad
Tempat, Tanggal Lahir : Jakarta, 25 Oktober 1983
Jenis Kelamin : Perempuan
Agama : Islam
Status : Menikah
Kewarganegaraan : Indonesia
Alamat : Jl. Boulevard i1 no: 18-19, Raffles Hills, Cibubur
HP : 08129991514
Email : adriani.donna@yahoo.com



RIWAYAT PEKERJAAN

Instansi	Jabatan	Tahun
FK Universitas Trisakti	DLB	2008 – 2012
Klinik Budhi Mulya	Dokter praktek	2008 – 2012
Apotik Naratu Farma	Dokter praktek	2009 – 2013
FK Universitas Trisakti	Dosen tetap	2013 - sekarang

RIWAYAT PENDIDIKAN

Universitas/Sekolah	Fakultas	Jurusan	Jenjang	Tahun
SDN 03 pagi	-	-	SD	1989-1995
SLTPN 182 Jakarta	-	-	SLTP	1995-1998
SLTAN 28 Jakarta	-	-	SLTA	1998-2001
Universitas Trisakti	Kedokteran	Kedokteran	S1	2001-2008
Universitas Indonesia	Kedokteran	Ilmu Biomedik	S2	2014-2015

SUMBER DANA PENELITIAN**Sumber Dana**

(Institusi) Universitas Trisakti

Pribadi