



**PENGARUH PEMBERIAN CUKA APEL ANNA TERHADAP
KADAR MDA HEPAR TIKUS JANTAN GALUR WISTAR
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PARASETAMOL DOSIS TOKSIK**

SKRIPSI

Oleh

**Niki Rahmawati
NIM 122010101048**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH PEMBERIAN CUKA APEL ANNA TERHADAP
KADAR MDA HEPAR TIKUS JANTAN GALUR WISTAR
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PARASETAMOL DOSIS TOKSIK**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

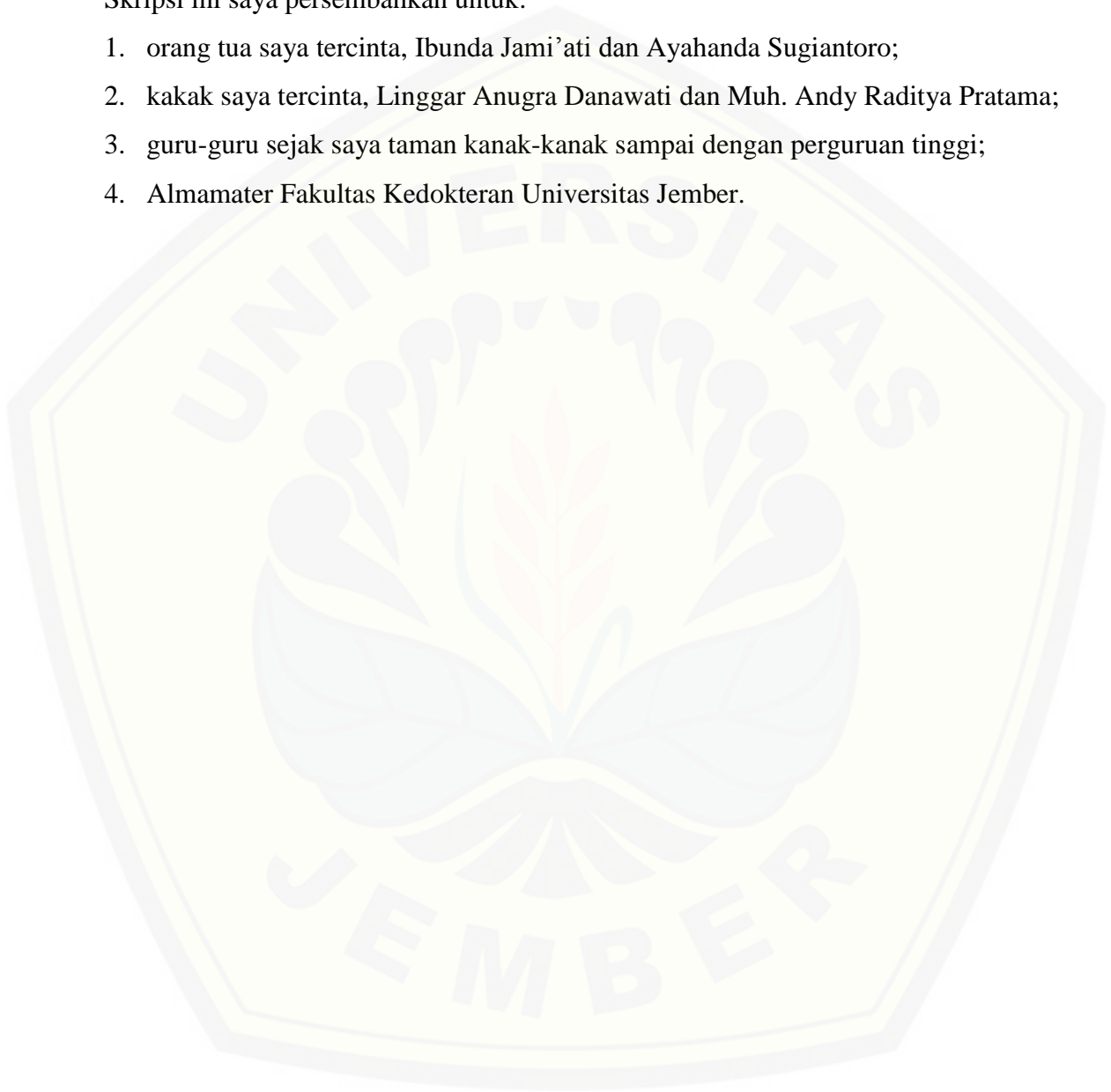
**Niki Rahmawati
NIM 122010101048**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. orang tua saya tercinta, Ibunda Jami'ati dan Ayahanda Sugiantoro;
2. kakak saya tercinta, Linggar Anugra Danawati dan Muh. Andy Raditya Pratama;
3. guru-guru sejak saya taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



MOTO

Apabila shalat telah dilaksanakan, maka bertebarlah kamu di bumi; carilah karunia Allah dan ingatlah Allah banyak-banyak agar kamu beruntung.
(terjemahan Surat *Al-Jumu'ah* ayat 10)^{*)}



^{*)}Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. *Al Quran dan Terjemahannya Al Hikmah*. Bandung: Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Niki Rahmawati

NIM : 122010101048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Cuka Apel Anna terhadap Kadar MDA Hepar Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis Toksik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 23 Desember 2015

Yang menyatakan,

Niki Rahmawati
NIM 122010101048

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN CUKA APEL ANNA TERHADAP
KADAR MDA HEPAR TIKUS JANTAN GALUR WISTAR
(*Rattus norvegicus*) YANG DIINDUKSI
PARASETAMOL DOSIS TOKSIK**

Oleh

Niki Rahmawati
NIM 122010101048

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Sugiyanta, M.Ked.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Cuka Apel Anna terhadap Kadar MDA Hepar Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis Toksik” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 23 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

dr. Hairrudin, M.Kes
NIP 197510112003121008

dr. Yudha Nurdian, M.Kes
NIP 197110191999031001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Sugiyanta, M.Ked
NIP 197902072005011001

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 198409162008012003

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP. 197002141999032001

RINGKASAN

Pengaruh Pemberian Cuka Apel Anna terhadap Kadar MDA Hepar Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis Toksik; Niki Rahmawati, 122010101048; 2015: 54 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Parasetamol merupakan obat bebas golongan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs*) yang dapat menyebabkan toksisitas hepar pada dosis tunggal 10-15 g. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2010 menyatakan 2000 kasus gagal hepar akut tiap tahun disebabkan oleh toksisitas obat sebesar 50% dengan 39% karena parasetamol. Parasetamol dimetabolisme di hepar oleh sitokrom P-450 menjadi produk radikal bebas yaitu NAPQI (*N-acetyl-p-benzoquinoneimine*). Apabila dosis toksik diberikan maka antioksidan endogen tubuh yaitu GSH (*Glutathione*) hepar tidak cukup mengendalikan NAPQI sehingga radikal bebas akan berikatan dengan asam lemak tidak jenuh membran sel dan terjadi peroksidasi lipid membentuk MDA (*Malondialdehyde*). Buah kaya akan antioksidan namun daya tahannya yang singkat sehingga diolah menjadi cuka buah yang lebih tahan lama. Cuka buah dari apel Anna dan beredar di masyarakat adalah Tahesta yang mempunyai kandungan polifenol berupa antosianin dan asam asetat sebagai antioksidan, perlu diteliti pengaruhnya pada kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik. Tujuan penelitian adalah mengetahui terdapatnya pengaruh pemberian cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik.

Penelitian merupakan *true experimental laboratories* dengan rancangan penelitian yaitu *post test only control group design*. Penelitian menggunakan sampel berjumlah 27 ekor tikus jantan galur wistar yang diambil dari populasinya dengan cara *simple random sampling*. Pada penelitian ini dilakukan adaptasi selama tujuh

hari dan perlakuan selama 15 hari, bertempat di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Tikus dikelompokkan menjadi tiga kelompok sehingga tiap kelompok berjumlah sembilan ekor. Kelompok pertama merupakan Kn (kontrol normal) diberikan Na CMC 1% 1 ml selama 14 hari. Kelompok kedua merupakan K(-) (kontrol negatif) diberikan Na CMC 1% 1 ml selama 14 hari dan diinduksi parasetamol dosis 291,6 mg/200 gBB tikus hari ke-12,13,14. Kelompok ketiga merupakan kelompok P (perlakuan) diberikan cuka apel Anna Tahesta dosis 0,4 ml/150 gBB tikus dan diinduksi parasetamol dosis 291,6 mg/200 gBB tikus hari ke-12,13,14. Pada hari ke-15 semua sampel diterminasi dengan eter dan diambil organ heparnya untuk dilakukan pemeriksaan MDA hepar dengan metode ELISA kompetitif menggunakan kit MDA merek *Elabscience*. Pengukuran MDA hepar tikus dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini untuk membandingkan kadar MDA hepar tikus antar kelompok maka dilakukan analisis statistik yaitu *One Way ANOVA* dan untuk mengetahui antar kelompok manakah yang kadar MDA heparnya berbeda maka dilakukan uji *Post Hoc* yaitu *LSD (Least Significance Different)*.

Hasil pengukuran MDA hepar didapatkan angka berupa absorbansi kemudian dihitung menggunakan kurva standar sehingga didapatkan hasil berupa kadar dalam satuan ng/ml. Pada kelompok Kn didapatkan rata-rata kadar MDA hepar sebesar 21,58476 ng/ml, K(-) sebesar 70,71218 ng/ml, dan P sebesar 37,67187 ng/ml. Hasil analisis data didapatkan distribusi normal pada uji normalitas, yaitu $p=0,212$ pada kelompok Kn, $p=0,978$ pada kelompok K(-), dan $p=0,180$ pada kelompok P. Hasil uji homogenitas juga menunjukkan varians data homogen yaitu $p=0,863$. Data terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* menunjukkan hasil signifikan dengan $p<0,001$ dan uji *LSD* juga demikian antar semua kelompok didapatkan hasil $p<0,001$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar yang diinduksi parasetamol dosis toksik.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Cuka Apel Anna terhadap Kadar MDA Hepar Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Parasetamol Dosis Toksik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Sugiyanta, M.Ked., selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah membimbing dan memberikan masukan serta semangat dalam penulisan skripsi ini;
2. dr. Hairrudin, M.Kes. dan dr. Yudha Nurdian, M.Kes., sebagai dosen penguji skripsi yang telah memberikan masukan yang bermanfaat;
3. Ibunda Jami'ati dan Ayahanda Sugiantoro, sebagai kedua orang tua yang selalu mendoakan dan memberi dukungan penuh agar penelitian skripsi ini berjalan dengan lancar;
4. Linggar Anugra Danawati, sebagai kakak kandung dan Muh. Andy Raditya Pratama, sebagai kakak ipar yang selalu memberi nasehat yang membangun semangat saya untuk terus berusaha dan berdoa;
5. Mbak Nuris, analis Laboratorium Biokmia dan Mbak Lilik, analis Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang sudah membantu dalam penelitian;
6. Fawziyah Putri dan Chandra Puspita, sebagai rekan sekelompok penelitian cuka apel Anna yang saling mendukung dan memberi semangat sehingga penelitian ini selesai dengan lancar;

7. Dear Fara Sielma, sebagai teman seperjuangan penelitian tentang MDA hepar yang sudah bekerja sama dalam hal persiapan dan pengukuran MDA;
8. teman-teman Panacea angkatan 2012 yang sudah berjuang bersama selama ini;
9. saudara dan saudariku UKM IMSAC yang saling mendoakan untuk selalu berjalan dan berjuang di jalan Allah SWT;
10. Amelia Rizki, Achmad Habibi, Laily Rahmawati dan Rizki Warda, Intan Palupi, dan Saiful Bahri sebagai sahabat yang selalu memberi semangat dan doa untuk saya;
11. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu;
12. Alamamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penulis juga menyadari terdapat kelemahan dan kekurangan pada skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran akan menjadi media bagi penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat.

Jember, Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
1.4.1 Manfaat Ilmiah	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Parasetamol	5
2.1.1 Struktur dan Sifat Kimia.....	5
2.1.2 Farmakologi.....	6
2.1.3 Dosis Toksik.....	10
2.1.4 Mekanisme Toksisitas	10

2.2 Organ Hepar	12
2.2.1 Anatomi Hepar	12
2.2.2 Fisiologi Hepar	13
2.3 Kerusakan Hepar	15
2.3.1 Kerusakan Hepar Akibat Radikal Bebas	15
2.3.2 Kerusakan Hepar Akibat Obat.....	16
2.4 MDA	17
2.5 Cuka Apel	19
2.5.1 Pengertian Cuka.....	19
2.5.2 Proses Pembuatan Cuka Apel.....	20
2.5.3 Kandungan Cuka Apel	21
2.6 Antioksidan	26
2.6.1 Polifenol	27
2.7 Kerangka Konsep	31
2.8 Hipotesis Penelitian	33
BAB 3. METODE PENELITIAN	34
3.1 Jenis Penelitian	34
3.2 Rancangan Penelitian	34
3.3 Populasi dan Sampel	35
3.3.1 Populasi	35
3.3.2 Sampel	35
3.3.3 Jumlah Sampel.....	35
3.4 Tempat dan Waktu	36
3.5 Variabel Penelitian	36
3.5.1 Variabel Bebas.....	36
3.5.2 Variabel Terikat.....	36
3.5.3 Variabel Terkendali	36
3.5.4 Variabel <i>Confounding</i>	37

3.6 Definisi Operasional	37
3.6.1 Cuka Apel Anna	37
3.6.2 MDA Hepar	37
3.6.3 Parasetamol Dosis Toksik	38
3.7 Bahan dan Alat Uji	38
3.7.1 Bahan	38
3.7.2 Alat	38
3.8 Prosedur Penelitian	39
3.8.1 Pembuatan Sediaan Parasetamol	39
3.8.2 Perhitungan Dosis Cuka Apel	39
3.8.3 Pengukuran Kadar MDA Hepar Tikus	39
3.8.4 Perlakuan terhadap Hewan Coba	40
3.8.5 Pengukuran Hasil	41
3.9 Analisis Data	42
3.10 Alur Penelitian	43
3.10.1 Skema Perlakuan terhadap Hewan Coba	43
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Hasil Penelitian	44
4.2 Analisis Data	45
4.3 Pembahasan	47
BAB 5. PENUTUP	49
5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kandungan nutrisi buah apel	22
2.2 Perbandingan kandungan buah apel Manalagi, <i>Rome Beauty</i> , dan Anna	23
2.3 Kandungan cuka apel	24
2.4 Kandungan cuka apel Tahesta.....	26
4.1 Rata-rata kadar MDA hepar.....	44
4.2 Hasil LSD kadar MDA hepar.....	46

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur kimia parasetamol	6
2.2 Struktur kimia NAPQI	7
2.3 Reaksi GSH dengan NAPQI	8
2.4 Senyawa intermediet dan senyawa dengan ikatan ireversibel hasil reaksi GSH dengan NAPQI	8
2.5 Metabolisme parasetamol	9
2.6 Metabolisme parasetamol dan kondisi yang berpotensi memicu toksisitas	12
2.7 Anatomi permukaan hepar	13
2.8 Struktur kimia MDA	17
2.9 Susunan kimia empat kelas utama polifenol	28
2.10 Enam struktur kimia jenis antosianin	29
2.11 Kerangka konsep	31
3.1 Rancangan penelitian	34
3.2 Diagram alur penelitian	43
4.1 Histogram rata-rata kadar MDA hepar	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Tabel Daftar Volume Maksimal Larutan Sediaan Uji yang Dapat Diberikan pada Berbagai Hewan	55
B. Tabel Dosis Cuka Apel Anna Tikus	56
C. Tabel Dosis Parasetamol Tikus.....	57
D. Kurva Standar Malondialdehid	58
E. Hasil Penelitian	59
F. Hasil Analisis Statistik	61
G. Dokumentasi Penelitian	63
H. Etik Penelitian.....	69

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Parasetamol atau asetaminofen merupakan salah satu obat bebas golongan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs*) yang digunakan sebagai analgesik ringan sampai sedang dan antipiretik. Dosis parasetamol untuk dewasa adalah 300 mg-1 g per kali dengan maksimum 4 g per hari (Gunawan, 2011). Berdasarkan hasil pengawasan BPOM di seluruh Indonesia, pada kurun waktu 2001-2007 didapatkan temuan OT-BKO (Obat Tradisional-Bahan Kimia Obat) menunjukkan tren ke arah obat rematik dan penghilang rasa sakit, yaitu obat tradisional yang mengandung bahan obat parasetamol (Harnowo, 2012). Parasetamol dapat menyebabkan toksisitas hepar pada pemberian dosis tunggal 10-15 g (200-250 mg/kgBB) berupa kerusakan bahkan gagal hepar (Gunawan, 2011). Menurut data RISKESDAS (Riset Kesehatan Dasar) (2010), menyatakan bahwa sekitar 2000 kasus gagal hepar akut yang terjadi setiap tahun dan 50% diantaranya disebabkan oleh toksisitas obat dengan porsi 39% karena parasetamol. Efek samping yang disebabkan oleh toksisitas akut konsumsi parasetamol adalah gangguan hepar berupa peningkatan aktivitas serum transaminase, laktat dehidrogenase, kadar bilirubin serum, dan pemanjangan masa protrombin (Gunawan, 2011). Parasetamol dosis toksik juga menimbulkan stres oksidatif pada hepar dan mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid berupa kenaikan kadar MDA (*Malondialdehyde*) hepar (Mustika *et al.*, 2012). Sedangkan penggunaan jangka panjang parasetamol menyebabkan gangguan fungsi ginjal, tekanan darah meningkat, dan menaikkan prevalensi infark hepar (Bebenista dan Nowak, 2014).

Hepar adalah organ yang berfungsi untuk metabolisme asam lemak, sintesis protein, dan detoksifikasi. Fungsi dari hepar ini akan menurun ketika terjadi akumulasi radikal bebas di tubuh, seperti konsumsi parasetamol berlebihan. Radikal

bebas yang disebabkan konsumsi parasetamol berlebihan adalah NAPQI (*N-acetyl-p-benzoquinoneimine*), yang diaktivasi oleh enzim hepar yaitu sitokrom P-450. Overdosis parasetamol menyebabkan inflamasi hepar, integritas sel hepar yang menurun sehingga enzim hepar keluar dan konsentrasinya naik dalam darah (Mohamad *et al.*, 2015). Radikal bebas ini akan dikendalikan oleh antioksidan endogen tubuh yaitu GSH (*Glutathione*) hepar dan apabila dosis parasetamol yang toksik diberikan maka GSH akan turun dan terjadi penumpukan radikal bebas (Bunchorntavakul dan Reddy, 2013). Radikal bebas tersebut mudah berikatan dengan asam lemak tidak jenuh di membran sel hepar sehingga terbentuk peroksidasi lipid dengan hasil pemecahan berupa MDA (Momuat *et al.*, 2011).

MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. MDA merupakan indikator stres oksidatif tubuh yang dapat diukur kadarnya dalam plasma dan organ yang berkaitan dengan metode spesifik maupun nonspesifik. Apabila ditemukan kadar MDA yang tinggi menunjukkan bahwa terjadi proses oksidasi asam lemak dalam membran sel dan status antioksidan tubuh menurun (Winarsi, 2007). Antioksidan banyak ditemukan pada produk alami yaitu sayuran dan buah (Dauchet *et al.*, 2008). Namun buah mempunyai kelemahan berupa daya tahannya yang singkat sehingga untuk mengatasi hal tersebut, buah diproduksi dalam bentuk produk tahan lama berupa cuka buah.

Cuka buah didapatkan dari proses fermentasi alkohol dan asam asetat. Proses pertama melibatkan aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* yang mengubah gula sederhana menjadi alkohol dalam kondisi anaerob, sedangkan proses kedua melibatkan aktivitas bakteri *Acetobacter acetii* yang mengubah alkohol menjadi asam asetat dalam kondisi aerob (Zubaidah, 2010). Buah apel mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi, salah satunya zat fenol yang berfungsi sebagai penangkal radikal bebas (Francini dan Sebastiani, 2013). Total fenol dalam apel ini tergantung dari varietasnya, yaitu apel Anna mempunyai kandungan fenol sebesar 4,22 mg/g (Aprilia dan Susanto, 2014). Apel Anna juga mempunyai kandungan total gula sebesar

11,50%, total ini lebih besar dibanding jenis apel lain seperti *Rome Beauty* dan *Manalagi* (Kurniyati dan Estiasih, 2015). Gula inilah yang nanti diubah oleh mikroorganisme menjadi alkohol dalam kondisi anaerob pada proses fermentasi saat pembuatan cuka buah (Zubaidah, 2010).

Cuka apel adalah salah satu jenis cuka dari buah yang sekarang banyak dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman kesehatan yang berkhasiat untuk menyembuhkan berbagai penyakit terutama penyakit degeneratif (Zubaidah, 2011). Kandungan fenol seperti antosianin dan asam asetat diyakini mempunyai khasiat berupa antioksidan alami yang mampu menangkal radikal bebas dalam tubuh (Mohamad *et al.*, 2015). Kandungan fenol pada cuka apel sebesar 132,55 mg/L sedangkan total asam sebesar 4,53% (Zubaidah, 2011). Fenol berfungsi sebagai antioksidan dengan menangkal radikal bebas dan menurunkan peroksidasi lipid sehingga kadar MDA hepar mengalami penurunan. Sedangkan asam asetat berperan dalam aktivitas antioksidan berupa perbaikan kadar enzim hepar dan menjaga serta memulihkan antioksidan pada hepar (Mohamad *et al.*, 2015). Cuka apel yang beredar dan sering dikonsumsi di masyarakat adalah *Tahesta* dari apel *Anna* yang berfungsi sebagai antioksidan. Cuka apel *Tahesta* mampu mengikat kolesterol, mencegah penyakit jantung koroner, stroke, diabetes, alergi, wasir, asma dan penyakit lainnya (Tahesta, 2015). Fungsi antioksidan dari cuka apel *Tahesta* sudah dibuktikan pada penelitian berupa pengaruh cuka tersebut dengan dosis 0,4 ml/hari untuk menurunkan kadar glukosa darah tikus wistar yang diberi diet tinggi gula. Pada penelitian tersebut yang berfungsi sebagai antioksidan adalah fenol (Zubaidah, 2011). Namun cuka apel *Tahesta* ini belum dibuktikan dalam penelitian ilmiah sebagai hepatoprotektor dalam mencegah peningkatan kadar MDA hepar akibat parasetamol dosis toksik.

Kandungan cuka apel berupa asam asetat dan fenol sebagai penangkal radikal bebas tersebut bisa menjadi salah satu alternatif untuk melindungi hepar dari kerusakan yang diakibatkan oleh parasetamol dosis toksik, dengan asam asetat berperan dalam memperbaiki kadar enzim hepar dan menjaga serta memulihkan

antioksidan pada hepar sedangkan fenol berperan dalam menangkal radikal bebas dan menurunkan peroksidasi lipid. Kondisi tersebut menyebabkan metabolit NAPQI yang akan berikatan dengan lipid sel hepar akan menurun dan aktivitas oksidasi radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh pada membran sel juga dapat dicegah. Sehingga mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan kenaikan kadar MDA hepar.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti bermaksud ingin mengetahui pengaruh pemberian cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi parasetamol dosis toksik.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah apakah ada pengaruh pemberian cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi parasetamol dosis toksik.

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui terdapatnya pengaruh pemberian cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi parasetamol dosis toksik.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Ilmiah

Sebagai bahan informasi penelitian lebih lanjut mengenai potensi antioksidan cuka apel Anna sebagai hepatoprotektor pada konsumsi parasetamol dosis toksik.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat cuka apel Anna sebagai antioksidan pada hepar sehingga bisa menjadikan cuka apel Anna sebagai salah satu diet dalam pemenuhan kebutuhan antioksidan tubuh.

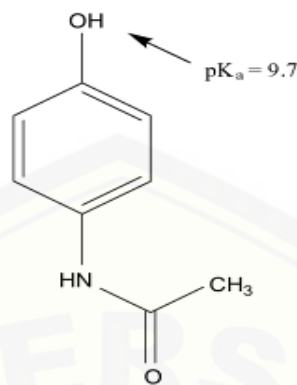
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Parasetamol

Asetaminofen atau di Indonesia lebih dikenal dengan nama parasetamol, merupakan obat golongan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs*) derivat para amino fenol (Gunawan, 2011). Parasetamol mempunyai kedua efek yang dimiliki obat NSAIDs lainnya, yaitu sebagai analgesik dan antipiretik namun tidak memperlihatkan efek anti inflamasi (Tomlin, 2010). Parasetamol merupakan golongan obat analgesik dan antipiretik yang aman serta telah digunakan oleh warga dunia sejak 1955. Parasetamol bisa ditemukan dalam berbagai sediaan langsung, seperti tablet, kapsul, penggunaan injeksi, supositoria dan sediaan kombinasi dalam OTC (*Over The Counter*) (Bunchorntavakul dan Reddy, 2013).

2.1.1 Struktur dan Sifat Kimia

Parasetamol mempunyai rumus molekul $C_8H_9NO_2$ dengan berat molekul 151,16 g/mol, berat jenis 1,293 (air=1), titik lebur 169-170°C, titik didih >500°C. Penampilmannya berupa kristal berwarna atau bubuk kristal putih, sedikit larut dalam air dingin dan cukup larut dalam air panas (BPOM RI, 2013). Parasetamol mempunyai dua struktur kimia fungsional yaitu gugus fenol dan *N-acetyl-amino*. Gugus fenol parasetamol dapat terionisasi dan $pK_a=9,7$, sedangkan gugus *N-acetyl-amino* bersifat netral (Hansen *et al.*, 2012). Struktur kimia parasetamol dapat ditunjukkan dengan Gambar 2.1 di bawah ini.



Gambar 2.1 Struktur kimia parasetamol (Sumber: Hansen, 2012)

2.1.2 Farmakologi

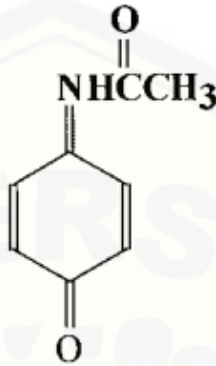
Parasetamol cocok digunakan untuk mengurangi nyeri ringan sampai sedang dan demam pada semua umur, baik anak-anak dan dewasa. Namun parasetamol tidak cocok untuk nyeri yang disebabkan oleh inflamasi karena obat ini tidak mempunyai efek anti inflamasi seperti yang dimiliki oleh golongan NSAIDs lainnya, misalnya aspirin (Thorp, 2008). Agar memperjelas bagaimana metabolisme dan mekanisme kerja dari parasetamol, di bawah ini akan dijelaskan farmakokinetik dan farmakodinamiknya.

a. Farmakokinetik

Parasetamol yang dikonsumsi akan memasuki saluran pencernaan kemudian diabsorpsi cepat dan sempurna menuju sirkulasi darah. Konsentrasi tertinggi plasma dicapai dalam waktu setengah jam dan sebesar 25% parasetamol terikat dengan protein plasma. Masa paruh dari parasetamol di dalam plasma adalah selama 1-3 jam dan obat ini bisa tersebar ke seluruh cairan tubuh. Selanjutnya, parasetamol akan memasuki hepar untuk proses konjugasi (Gunawan, 2011).

Metabolisme parasetamol di hepar melibatkan dua proses fase konjugasi. Fase yang pertama adalah sebagian kecil parasetamol akan dioksidasi oleh enzim sitokrom P-450 hepar menjadi produk radikal bebas yaitu NAPQI (*N-acetyl-p-*

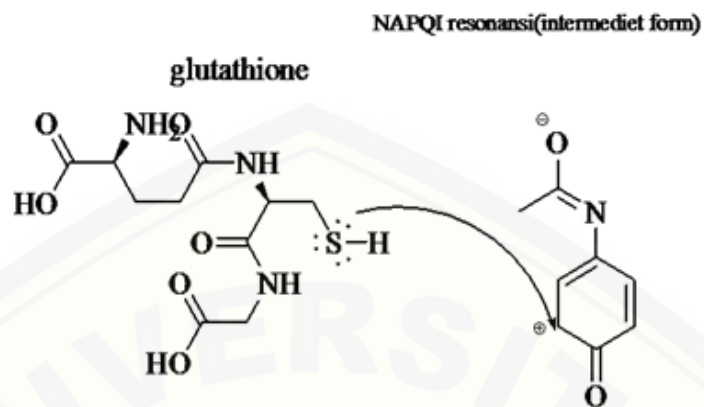
benzoquinoneimine) (Fessenden dan Fessenden, 2006). NAPQI mempunyai struktur kimia yang disajikan pada Gambar 2.2 di bawah ini.



Gambar 2.2 Struktur kimia NAPQI (Sumber: Hazai *et al.*, 2002)

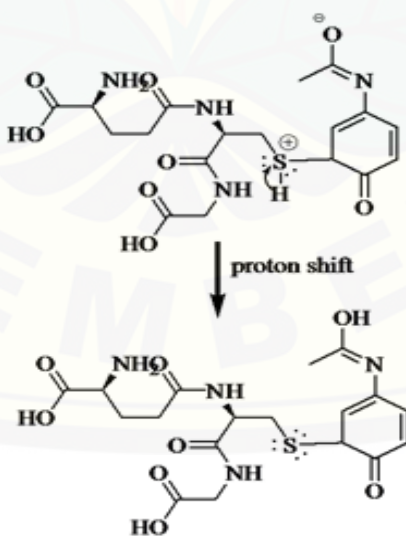
NAPQI mempunyai struktur berupa cincin benzena dan gugus imida (NCOCH_3). Atom karbon pada cincin benzena ini mempunyai sifat elektrofil yaitu istilah kimia organik berupa senyawa yang kekurangan elektron sehingga mempunyai muatan lebih positif. Senyawa elektrofil ini mudah diserang oleh nukleofil pada hepar, yaitu istilah kimia organik berupa senyawa yang mempunyai elektron lebih sehingga muatannya lebih negatif. Gabungan dari senyawa elektrofil dan nukleofil ini akan membentuk senyawa antara (intermediet). NAPQI yang sifatnya elektrofil harus dikonjugasi dengan senyawa yang nukleofil agar sifatnya menjadi non toksik. Senyawa nukleofil tersebut adalah enzim GSH pada hepar (Fessenden dan Fessenden, 2006).

GSH mempunyai susunan tiga rantai asam amino (tripeptida) yaitu sistein, asam glutamat, dan glisin, serta ketiganya terikat oleh ikatan peptida. Pada bagian asam amino sistein terdapat gugus Thiol atau disulfida. Gugus inilah yang bersifat nukleofil karena atom S pada gugus tersebut mempunyai elektron valensi (elektron terluar) sejumlah enam atau tiga pasang elektron bebas. Sehingga elektron pada gugus S cenderung membagikan elektronnya pada karbon cincin benzena NAPQI dan membentuk reaksi pada Gambar 2.3 berikut ini.



Gambar 2.3 Reaksi GSH dengan NAPQI (Sumber: Fessenden dan Fessenden, 2006)

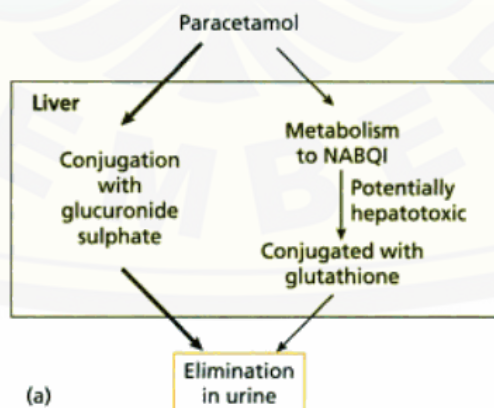
NAPQI yang juga mempunyai kemampuan beresonansi yaitu mengalami perpindahan ikatan rangkap yang dipicu oleh atom yang elektronegatif akan lebih mudah diserang oleh senyawa nukleofil. Saat NAPQI beresonansi, elektron pada gugus S milik GSH akan membagikan elektronnya pada gugus karbon cincin benzena milik NAPQI dan membentuk senyawa intermediet pada Gambar 2.4 di bawah ini.



Gambar 2.4 Senyawa intermediet dan senyawa dengan ikatan ireversibel hasil reaksi GSH dengan NAPQI (Sumber: Fressenden dan Fessenden, 2006)

Senyawa yang atas pada Gambar 2.4 adalah senyawa antara (intermediet). Pada senyawa ini gugus Thiol (-SH) menjadi kekurangan elektron karena satu pasang elektron bebasnya sudah digunakan untuk berikatan dengan NAPQI. Sehingga gugus ini mempunyai kecenderungan untuk menstabilkan dirinya dengan memutuskan ikatan antara S dengan H, dan menggunakan elektron hasil pemutusan tersebut untuk menstabilkan diri. Proton (atom H) yang dilepas tadi akan bermuatan positif (kekurangan elektron), karena pada struktur yang di atas NAPQI masih mempunyai atom O yang kaya elektron, maka elektron yang dimiliki O akan disumbangkan ke proton tersebut sehingga membentuk ikatan OH (Fessenden dan Fessenden, 2006). NAPQI ini akan dikonjugasi oleh GSH hepar menjadi 3-(glutathione-S-yl)acetaminophen (*GS-acetaminophen*) menjadi senyawa dengan ikatan ireversibel atau sulit untuk lepas kembali (Hazai *et al.*, 2002).

Fase yang kedua adalah sebagian besar parasetamol akan dikonjugasi dengan asam glukoronat dan asam sulfat (Firth dan Baker, 2008). Hasil konjugasi dari kedua fase tersebut diekskresikan melalui ginjal berupa urin dan sebagian kecil sebagai parasetamol sebesar 3% (Gunawan, 2011). Agar memudahkan memahami metabolisme parasetamol di hepar, di bawah ini disajikan skemanya pada Gambar 2.5 sebagai berikut.



Gambar 2.5 Metabolisme parasetamol (Sumber: Firth dan Baker, 2008)

b. Farmakodinamik

Parasetamol mempunyai efek analgesik serupa dengan aspirin yaitu menghilangkan atau mengurangi nyeri ringan sampai sedang. Mekanisme efek antipiretiknya diduga berdasarkan efek sentral seperti salisilat. Efek anti inflamasinya sangat lemah karena lemah dalam menghambat prostaglandin sehingga tidak digunakan sebagai antireumatik (Gunawan, 2011).

2.1.3 Dosis Toksik

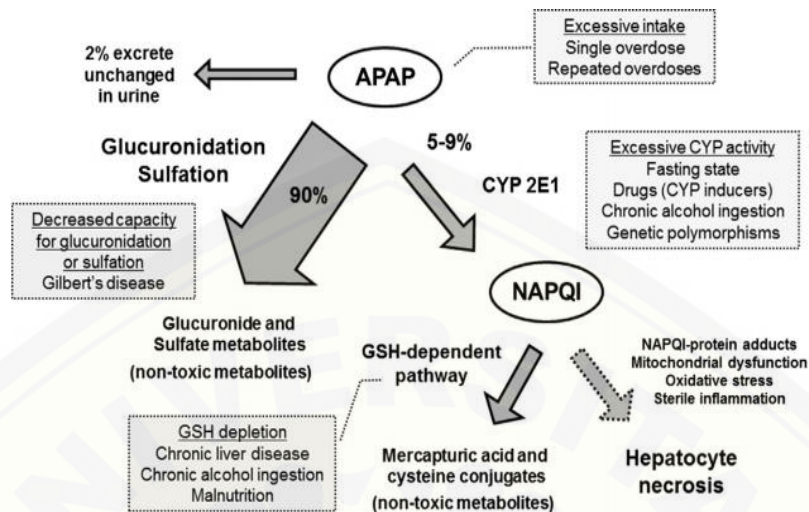
Dosis parasetamol untuk dewasa adalah 300 mg sampai 1 g per kali dengan maksimum pemberian 4 g per hari, sedangkan untuk anak 6-12 tahun adalah 150-300 mg per kali dengan maksimum pemberian 1,2 g per hari. Untuk anak 1-6 tahun adalah 60-120 mg per kali dan bayi di bawah 1 tahun adalah 60 mg per kali dengan maksimum 6 kali sehari pada keduanya. Dosis toksik adalah dosis suatu obat diberikan dan nantinya dapat menimbulkan efek toksik pada tubuh. Gejala hepatotoksisitas dapat terjadi pada pemberian dosis tunggal 10-15 g (200-250 mg/kgBB) parasetamol (Gunawan, 2011).

2.1.4 Mekanisme Toksisitas

Pengaruh yang paling serius diakibatkan oleh parasetamol dosis toksik adalah nekrosis hepar (Gunawan, 2011). Pada dosis terapi, sekitar 90% parasetamol mengalami metabolisme fase 2 di hepar berupa jalur konjugasi menjadi metabolit sulfat dan glukoronat yang sifatnya tidak toksik. Kedua metabolit non toksik ini diekskresikan melalui urin dan disertai sekitar 2% dalam bentuk parasetamol yang tidak diubah. Sedangkan sekitar 10% parasetamol melalui metabolisme fase 1 di hepar berupa jalur oksidasi oleh CYP (sitokrom P-450) menjadi bahan toksik yaitu NAPQI. Bahan toksik berupa NAPQI diproduksi dalam jumlah sedikit pada konsumsi dosis normal parasetamol dan diubah oleh GSH menjadi non toksik yaitu

sistein dan merkapturik yang nantinya diekskresikan dalam urin juga (Bunchorntavakul dan Reddy, 2013).

Parasetamol diketahui sebagai agen hepatotoksisitas terkait dosis yang digunakan. Ketika dosis toksik dikonsumsi, maka jalur konjugasi berupa sulfasi dan glukoronidasi menjadi jenuh dan semakin banyak parasetamol yang dioksidasi menjadi NAPQI oleh sitokrom P-450 hepar. Kenaikan produk NAPQI ini akan menurunkan GSH. Ketika GSH berkurang sampai 70-80%, NAPQI berikatan dengan sel hepar sehingga menyebabkan kerusakan sel. Ketika GSH habis, NAPQI berikatan dengan sistein di hepatosit membentuk protein yaitu NAPQI-*protein adduct* yang akan menyebabkan stres oksidatif dan nekrosis hepatoseluler. Kerusakan mitokondria, fragmentasi DNA, dan peroksidasi lipid diketahui berperan dalam kerusakan hepar yang diinduksi parasetamol (Bunchorntavakul dan Reddy, 2013). Gejala pada hari pertama akibat toksisitas parasetamol belum mencerminkan bahaya yang mengancam. Anoreksia, mual, dan muntah serta sakit perut terjadi dalam 24 jam pertama. Gangguan hepar dapat terjadi pada hari kedua dengan gejala peningkatan aktivitas serum transaminase, laktat dehidrogenase, kadar bilirubin serum serta pemanjangan masa protrombin (Gunawan, 2011). Bagan metabolisme parasetamol dan kondisi yang berpotensi memicu toksisitas dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Metabolisme parasetamol dan kondisi yang berpotensi memicu toksisitas (Sumber: Bunchorntavakul dan Reddy, 2013)

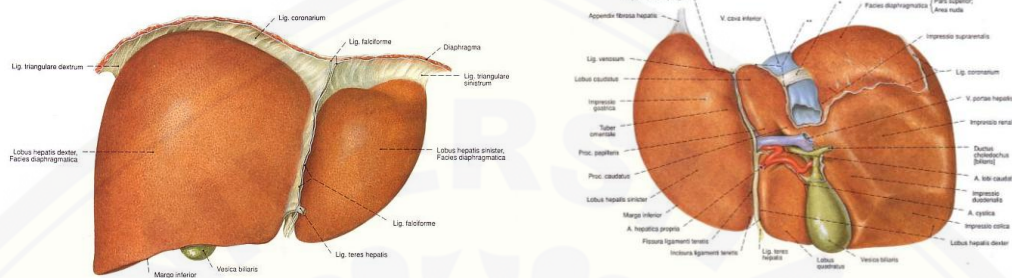
2.2 Organ Hepar

Hepar merupakan organ terbesar pada tubuh, menyumbang sekitar 2% berat tubuh total, atau sekitar 1,5 kg pada rata-rata manusia dewasa. Hepar melakukan banyak fungsi berbeda namun tetap merupakan organ tersendiri, dan berbagai fungsinya tersebut saling berhubungan satu sama lain. Hal ini terutama terbukti ada kelainan hepar karena banyak fungsi terganggu secara bersamaan (Guyton & Hall, 2007).

2.2.1 Anatomi Hepar

Hepar adalah kelenjar terbesar di dalam tubuh, yang terletak di bagian teratas dalam rongga abdomen sebelah kanan di bawah diafragma. Hepar secara luas dilindungi tulang rusuk. Hepar terbagi dalam dua belahan utama, kanan dan kiri. Permukaan atas berbentuk cembung dan terletak di bawah diafragma, permukaan bawah tidak rata dan memperlihatkan lekukan yaitu *fisura transversus*. *Fisura longitudinal* memisahkan belahan kanan dan kiri yang sama di permukaan bawah, sedangkan *ligamen falsiformis* di permukaan atas hepar. Hepar dibagi dalam empat

belahan yaitu kanan, kiri, kaudata, dan kuadrata. Dan setiap belahan atau lobus terdiri atas lobulus (Pearce, 2009). Anatomi permukaan hepar dapat disajikan pada Gambar 2.7 berikut ini.



Gambar 2.7 Anatomi permukaan hepar (Sumber: Putz dan Pabst, 2006)

Lobulus hepar merupakan unit fungsional dasar hepar, berbentuk silindris dengan panjang beberapa millimeter dan berdiameter 0,8 sampai 2 milimeter. Hepar manusia mengandung 50.000 sampai 100.000 lobulus. Lobulus hepar terbentuk mengelilingi sebuah vena sentralis yang mengalir ke vena hepatica dan kemudian ke vena kava. Lobulus sendiri dibentuk terutama dari banyak lempeng sel hepar yang menyebar dari vena sentralis seperti jeruji roda. Masing-masing lempeng hepar tebalnya dua sel, dan di antara sel yang berdekatan terdapat kanalikuli biliaris kecil yang mengalir ke duktus biliaris di dalam septum fibrosa yang memisahkan lobulus hepar yang berdekatan (Guyton & Hall, 2007).

2.2.2 Fisiologi Hepar

Hepar merupakan suatu kumpulan besar sel rekatan kimia dengan laju metabolisme yang tinggi, saling memberikan substrat dan energi dari satu sistem metabolisme ke sistem yang lain, mengolah dan menyintesis berbagai zat yang diangkut ke daerah tubuh lainnya, dan melakukan berbagai fungsi metabolisme lain

(Guyton & Hall, 2007). Beberapa fungsi metabolisme oleh hepar yang penting akan diuraikan di bawah ini.

a. Metabolisme Karbohidrat

Hepar melakukan fungsi metabolisme karbohidrat yaitu menyimpan glikogen dalam jumlah besar, mengonversi galaktosa dan fruktosa menjadi glukosa, glukoneogenesis, dan pembentukan banyak senyawa kimia dari produk antara metabolisme karbohidrat (Guyton & Hall, 2007).

b. Metabolisme Lemak

Walaupun banyak sel tubuh yang memetabolisme lemak, aspek metabolisme lemak tertentu terutama terjadi di hepar. Beberapa fungsi hepar terkait metabolisme lemak adalah oksidasi asam lemak untuk menyuplai energi bagi fungsi tubuh yang lain, sintesis kolesterol, fosfolipid, dan sebagian besar lipoprotein, serta sintesis lemak dari protein dan karbohidrat (Guyton & Hall, 2007).

c. Metabolisme Protein

Tubuh tidak dapat menggantikan kontribusi hepar pada metabolisme protein lebih dari beberapa hari tanpa terjadi kematian. Beberapa fungsi hepar yang paling penting dalam metabolisme protein adalah deaminasi asam amino, pembentukan ureum untuk mengeluarkan ammonia dari cairan tubuh, pembentukan protein plasma, interkonversi beragam asam amino dan sintesis senyawa lain dari asam amino (Guyton & Hall, 2007).

d. Metabolisme Obat

Obat sebagai salah satu senyawa golongan xenobiotik, selain zat aditif makanan, polutan, dan karsinogen kimia lainnya. Xenobiotik adalah senyawa

yang asing bagi tubuh sehingga ketika masuk dalam tubuh, senyawa ini dimetabolisme dengan hepar sebagai organ utama yang berperan (Murray *et al.*, 2009). Metabolisme obat terjadi di hepar terutama di membran retikulum endoplasma (mikrosom) dan di sitosol. Tujuan obat dimetabolisme adalah mengubah obat yang nonpolar menjadi polar sehingga larut air dalam sirkulasi darah dan bisa diekskresikan melalui ginjal atau empedu. Dengan perubahan ini obat aktif umumnya menjadi lebih inaktif. Reaksi metabolisme terdiri atas reaksi fase 1 dan reaksi fase 2. Reaksi fase 1 terdiri atas oksidasi, reduksi, dan hidrolisis, yang mengubah obat menjadi lebih polar, dengan akibat menjadi inaktif, lebih aktif atau kurang aktif. Reaksi 2 merupakan reaksi konjugasi dengan substrat endogen asam glukoronat, asam sulfat, asam asetat, atau asam amino, dan hasilnya menjadi sangat polar, dengan demikian hampir selalu tidak aktif. Reaksi metabolisme yang terpenting adalah oksidasi oleh enzim sitokrom P-450. Reaksi fase 2 yang terpenting adalah glukoronidasi melalui enzim UDP-glukuronil-transferase (Gunawan, 2011).

2.3 Kerusakan Hepar

2.3.1 Kerusakan Hepar Akibat Radikal Bebas

Radikal bebas adalah salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Radikal bebas memiliki reaktivitas yang sangat tinggi sehingga elektron yang tidak berpasangan dalam senyawa radikal memiliki kecenderungan untuk mencari pasangan dengan menarik atau menyerang elektron dari senyawa lain. Hal ini mengakibatkan terbentuknya senyawa radikal baru. Senyawa ini terbentuk di dalam tubuh dipicu oleh bermacam-macam faktor (Winarsi, 2007). Radikal bebas terbentuk akibat proses metabolisme dalam tubuh manusia seperti inflamasi, fagositosis, iskemia, dan latihan berat atau dari luar tubuh seperti paparan sinar X, ozon, asap rokok, polusi udara, dan bahan kimia industri.

Mekanisme terbentuknya radikal bebas ini bersifat kontinu dalam sel melalui proses enzimatis yang melibatkan fagositosis, sintesis prostaglandin, dan sitokrom P-450 dan nonenzimatis yang melibatkan reaksi ionisasi oksigen dengan senyawa organik (Lobo *et al.*, 2010).

Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh, karbohidrat, dan unsur DNA. Asam lemak tak jenuh menjadi target paling rentan terhadap serangan radikal bebas dibanding dengan unsur lainnya. Serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Senyawa radikal bebas di dalam tubuh dapat merusak asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel. Akibatnya dinding sel menjadi rapuh, kerusakan struktur sel, gangguan fungsi sel, yang akan memicu munculnya berbagai penyakit (Winarsi, 2007).

2.3.2 Kerusakan Hepar Akibat Obat

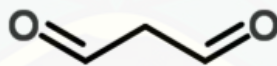
Kerusakan hepar akibat obat atau sering dinamakan DILI (*Drug-Induced Liver Injury*) menggambarkan respon yang berbeda-beda yang terjadi setelah paparan senyawa kimia alami atau sintetik. DILI sulit dideteksi karena sebagian besar kasus bersifat asimtomatis dan deteksi pada hasil laboratorium menunjukkan kenaikan yang ringan saja pada serum transaminase. Meskipun sulit dideteksi, jika sudah terlihat gejalanya bahkan bisa sampai gagal hepar akut atau fulminan (Fisher *et al.*, 2015). DILI dapat dibagi menjadi dua tipe yaitu intrinsik dan idiosinkratis. DILI intrinsik adalah hepatotoksitas yang berpotensi bisa menyerang semua individu dengan derajat keparahan yang berbeda. Reaksi pada DILI intrinsik ini sangat bergantung pada dosis (*dose-dependent*). Asetaminofen atau parasetamol adalah obat yang terkenal menyebabkan DILI jenis intrinsik ini. Sedangkan DILI idiosinkratis adalah efek hepatotoksitas yang mengenai individu tertentu, tidak tergantung dosis, mempunyai masa laten, gejala yang bervariasi (Chalasan *et al.*, 2014). Sehingga dapat disimpulkan bahwa DILI intrinsik bersifat bisa diprediksi, *dose-dependent* dan

DILI idiosinkratis bersifat tidak bisa diprediksi, *non-dose-dependent* (Fisher *et al.*, 2015).

Obat merupakan penyebab penting terjadinya kerusakan hepar, daripada penyebab lain seperti toksin. Lebih dari 900 obat penyebab kerusakan hepar, dengan presentasi terbesar penyebabnya adalah asetaminofen sebesar 37% dari kasus kerusakan hepar akut. Penggunaan jangka panjang dan overdosis asetaminofen ini menyebabkan nekrosis hepatosit sentrilobular yang ditandai dengan inti sel piknosis dan sitoplasma eosinofil diikuti dengan lesi besar pada hepar. Radikal bebas yaitu NAPQI sebagai hasil oksidasi asetaminofen bisa menyebabkan peroksidasi lipid ditandai dengan kenaikan kadar MDA hepar, menurunnya kadar GSH hepar, sampai terjadinya nekrosis sel hepar (Pandit *et al.*, 2012).

2.4 MDA

Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dialdehid yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid di dalam tubuh. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon, dengan rumus molekul $C_3H_4O_2$ (Winarsi, 2007). Struktur MDA disajikan pada Gambar 2.8 bawah ini.



Gambar 2.8 Struktur kimia MDA (Royal Society of Chemistry, 2015)

MDA merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas sehingga secara luas banyak digunakan sebagai indikator stres oksidatif yang dapat ditentukan secara spesifik maupun non-spesifik dalam suatu pengukuran menggunakan asam tiobarbiturat. MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Status antioksidan yang tinggi biasanya diikuti oleh penurunan kadar MDA. MDA merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Efek negatif senyawa radikal dapat diredam oleh antioksidan, baik

berupa zat gizi seperti vitamin A,C,E, dan albumin, ataupun antioksidan non gizi seperti flavonoid dan gingerol. Oleh sebab itu, tinggi rendahnya kadar MDA sangat bergantung pada status antioksidan dalam tubuh seseorang (Winarsi, 2007).

Malondialdehid (MDA) sebagai produk oksidan dari reaksi radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh ganda pada membran sel dapat diukur dengan metode pengukuran TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) menggunakan spektrofotometri atau spektrofluorometri. Metode pengukuran TBARS ini mempunyai spesifisitas rendah namun efisiensi tinggi dengan cara pengukuran yang sederhana dan bermanfaat (Repetto *et al.*, 2012). Metode tersebut merupakan metode pengukuran kolorimetrik yang banyak digunakan untuk mendeteksi peroksidasi lipid pada sampel biologi. Prinsipnya adalah MDA sebagai hasil peroksidasi lipid bereaksi dengan asam tiobarbiturat dalam kondisi suhu tinggi dan suasana asam. Reaksi tersebut menghasilkan warna merah muda dan dihitung absorbansinya menggunakan fluorometer atau spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm (Jetawattana, 2005).

Metode pengukuran MDA lainnya dengan ELISA kompetitif seperti kit ELISA yang siap pakai. Prinsipnya adalah pada alat yaitu *microtiter plate* atau sumuran sudah dilapisi dengan MDA. Ketika diberi sampel dan reagen antibodi dalam jumlah yang sama, maka MDA sampel akan berikatan secara spesifik dengan antibodi. Sedangkan yang tidak berikatan akan terbuang saat pencucian. Setelah itu diberikan reagen HRP (*Horseradish Peroxidase*) dan reagen substrat yaitu TMB (*Tetramethylbenzidine*) sehingga berubah warna menjadi biru. Warna biru ini akan berubah menjadi kuning dengan diberikan reagen stop yaitu larutan asam sulfur yang fungsinya menghentikan reaksi. Hasil absorbansinya dibaca dengan *ELISA plate reader* pada panjang gelombang 450 nm (Thompson, 2010).

Keunggulan pemeriksaan MDA dibandingkan produk peroksidasi lipid yang lain adalah signifikan akurat, stabil daripada senyawa lainnya dan sangat cocok sebagai biomarker untuk stres oksidatif karena beberapa alasan yaitu pembentukan

MDA meningkat sesuai dengan stres oksidatif, kadarnya dapat diukur secara akurat dengan berbagai metode yang telah tersedia, bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, pengukurannya tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan kandungan lemak dalam diet, merupakan produk spesifik dari peroksidasi lemak, dan terdapat dalam jumlah yang dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval (Swastika, 2013).

2.5 Cuka Apel

Cuka apel merupakan hasil fermentasi alkohol dan asam asetat dari buah apel. Kandungan cuka apel tidak jauh berbeda dengan kandungan buah apel segar. Kandungan cuka apel tergantung dari varietas apel yang digunakan sebagai bahan utamanya (Pranowo, 2005).

2.5.1 Pengertian Cuka

Cuka atau dikenal dengan asam asetat adalah cairan masam yang didapatkan dari proses fermentasi alkohol dan fermentasi asetat. Cuka dapat diproduksi dari berbagai bahan yang mengandung gula atau pati, yaitu apel, *wine*, gandum, dan sebagainya. Proses fermentasi yang dimaksud adalah suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme yang digunakan adalah bakteri, khamir, dan kapang (Suprihatin, 2010).

Khamir berperan dalam fermentasi yang bersifat alkohol dengan produk utama dari metabolismenya adalah etanol. *Saccharomyces cerevisiae* adalah jenis utama yang berperan dalam produksi minuman beralkohol seperti bir dan anggur. Bakteri untuk fermentasi dibedakan menjadi bakteri asam laktat, asam propionat, dan asam asetat. Bakteri asam asetat berbentuk batang, gram negatif dan ditemukan dalam golongan *Acetobacter* sebagai contohnya adalah *Acetobacter acetii*. Metabolismenya lebih bersifat aerobik dan peranannya yang utama dalam fermentasi

bahan pangan adalah kemampuannya dalam mengoksidasi alkohol dan karbohidrat lainnya menjadi asam asetat dan dipergunakan dalam pabrik cuka (Suprihatin, 2010).

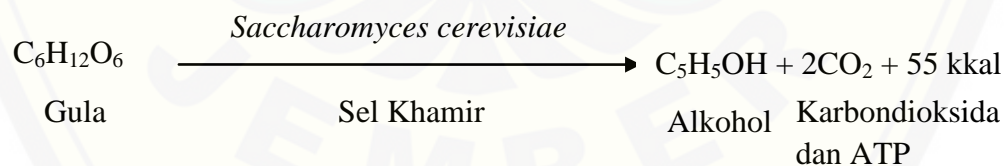
2.5.2 Proses Pembuatan Cuka Apel

Pembuatan cuka apel meliputi dua tahap yaitu fermentasi alkohol dan fermentasi asetat (proses asetatisasi). Kedua tahap tersebut mempunyai reaksi kimia yang berbeda dan membutuhkan peran mikroorganisme yang berbeda juga.

a. Fermentasi Alkohol

Sel khamir yang digunakan dalam fermentasi alkohol adalah galur dari spesies *Saccharomyces cerevisiae*. Sel khamir ini didapat dari permukaan bir yang difermentasi oleh gelembung-gelembung karbondioksida. Sel khamir dalam suasana aerobik akan memfermentasi glukosa menjadi etanol (alkohol) terutama melalui lintasan embolen Meyorhof. Proses fermentasi alkohol ini membutuhkan waktu 5 – 7 hari. Hasil akhir proses fermentasi alkohol melalui jalur embolen Meyorhof adalah dalam setiap 180 g glukosa akan diproduksi 92 g etanol, 80 g CO₂ dan energy (ATP) sehingga seara teoritis setiap 1 g glukosa akan menghasilkan 0,51 etanol dan 0,49 g CO₂.

Jalur embolden Meyorhof ini bida dinyatakan dalam persamaan di bawah ini.



Sel khamir mampu menggunakan berbagai jenis substrat tergantung pada spesiesnya. Pada umumnya sel khamir dapat memproduksi etanol secara efisien pada pH 3,3-6,0 dan pada suhu 28-35°C. Tahap fermentasi alkohol untuk memproduksi cuka apel dapat dilakukan tanpa pengaturan suhu, terutama jika dilakukan dalam skala kecil dan suhu lingkungan sesuai untuk pertumbuhan dan

aktivitas sel khamir. Jadinya proses fermentasi dapat dimonitor dengan cara mengamati kecepatan pengeluaran CO₂ atau dengan pengukuran berat jenis dan kandungan alkohol dalam masa selama fermentasi berlangsung (Pranowo, 2006).

Proses fermentasi tidak pernah bebas dari kontaminasi, kecuali bila dilakukan sanitasi yang memadai baik terhadap lingkungan, alat maupun peralatan yang digunakan. Tindakan pencegahan untuk menghindari kontaminasi oleh bakteri asam asetat pada saat fermentasi alkohol adalah dengan melakukan proses fermentasi asam asetat pada ruangan yang terpisah (Pranowo, 2006).

b. Fermentasi Asetat

Pembuatan asam asetat dihasilkan dari oksidasi alkohol oleh bakteri asam cuka dengan adanya oksigen dari udara. Berbeda dengan khamir penghasil alkohol, bakteri ini memerlukan sediaan oksigen yang banyak untuk pertumbuhan dan aktivitasnya. Persamaan dalam fermentasi asetat adalah sebagai berikut.



Jumlah bakteri asam cuka yang terdapat dalam sari buah yang difermentasikan relatif kecil dan sering kali dari jenis bakteri yang tidak difermentasikan atau tidak aktif (Pranowo, 2006). Bakteri asam cuka yang bisa digunakan adalah *Acetobacter* dan *Aspergillus acetii* (Pranowo, 2005).

2.5.3 Kandungan Cuka Apel

Cuka apel didapatkan dari hasil fermentasi alkohol dan asam asetat dari buah apel. Kandungan cuka apel tidak jauh berbeda dengan kandungan apel segar (Pranowo, 2005). Menurut United State Department of Agricultural (USDA), kandungan buah apel secara umum tercantum pada Tabel 2.1 berikut ini.

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi buah apel

Energi		218 kJ (52 kkal)	
Karbohidrat	13.81 g	Asam Pantotenat (B ₅)	0.061 mg (1%)
Gula	10.39 g	Vitamin B ₆	0.041 mg (3%)
Serat pangan	2.4 g	Folat (Vit. B ₉)	3 µg (1%)
Lemak	0.17 g	Vitamin C	4.6 mg (8%)
Protein	0.26 g	Kalsium	6 mg (1%)
Air	85.56 g	Besi	0.12 mg (1%)
Vitamin A equiv.	3 µg (0%)	Magnesium	5 mg (1%)
Tiamina (Vit. B ₁)	0.017 mg (1%)	Fosfor	11 mg (2%)
Riboflavin (Vit. B ₂)	0.026 mg (2%)	Kalium	107 mg (2%)
Niasin (Vit. B ₃)	0.091 mg (1%)	Zink	0.04 mg (0%)

Nilai nutrisi di atas per 100 g (3.5 oz).

Sumber: USDA National Nutrient Database (2015).

Kandungan apel juga bervariasi tergantung dari varietasnya. Sebagai contoh adalah apel Manalagi, *Rome Beauty*, dan Anna yang mempunyai perbedaan kandungan di dalamnya. Perbedaan kandungan ketiga apel ini dapat dilihat pada Tabel 2.2 berikut ini.

Tabel 2.2 Perbandingan kandungan buah apel Manalagi, *Rome Beauty*, dan Anna

Komponen	Manalagi	<i>Rome Beauty</i>	Anna
Total asam (%)	0,31	0,36	0,39
Gula reduksi (%)	7,11	7,64	8,63
Total fenol (mg/g)	5,44	5,03	4,22
Vitamin C (mg/100 g)	6,37	10,45	7,10
Aktivitas antioksidan (%)	5,62	9,81	5,01

Sumber: Aprilia dan Susanto (2014).

Total asam pada suatu bahan dilakukan dengan menghitung kadar asam dengan metode titrasi dengan menggunakan NaOH sampai terlihat warna merah muda konstan, yang nantinya kadar asam dihitung dalam rumus yang sudah ada dan dinyatakan dalam persen (Harjiyanti *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan pada tabel di atas dinyatakan dalam persen dan metode pengukuran yang digunakan adalah DPPH (Aprilia dan Susanto, 2014). Metode DPPH adalah pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif yaitu dengan melakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil*) oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri (Ridho, 2013). Hasil pengukuran dimasukkan dalam rumus yang ada dan dinyatakan dalam EC_{50} (*Efficient Concentration 50*) yaitu konsentrasi larutan uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%. Semakin besar persennya semakin tinggi peredaman terhadap radikal bebas (Umayah dan Amrun, 2007). Sedangkan komposisi cuka apel disajikan pada Tabel 2.3 berikut ini.

Tabel 2.3 Kandungan cuka apel

Komposisi	Jumlah
Total Asam (%)	4,53
Alkohol (%)	0,13
Ph	3,21
TPT (Brix)	3,67
Aktivitas Antioksidan (%)	58,93
Fenol (mg/L)	132,55
Pektin (%)	0,75

Sumber: Zubaidah (2011).

Total asam di tabel tersebut maksudnya adalah asam asetat, dimana sebesar 4,53%. Berdasarkan SNI 01-371-1995, angka tersebut sudah memenuhi syarat mutu kadar asam asetat cuka makanan, yaitu 4%. Asam asetat dalam cuka apel berperan sebagai antioksidan dengan memperbaiki enzim pada hepar seperti GSH (Mohamad *et al.*, 2015). A.P John Institute for Cancer Research, pada April 2005 memberikan pernyataan bahwa asam asetat dalam cuka apel memiliki dampak mematikan pada sel kanker, karena menghambat suplai energi yang dibutuhkan sel kanker. Kandungan fenol sebesar 132,55 mg/L inilah yang berfungsi sebagai antioksidan alami dalam membantu menetralkan radikal bebas hasil proses oksidasi dalam tubuh (Zubaidah, 2011).

Cuka apel yang beredar di masyarakat salah satunya adalah merek Tahesta. Fermentasi dari apel yang berfungsi menyempurnakan kandungan nutrisi, serta mengoptimalkan manfaatnya bagi kesehatan. Dosis Tahesta dalam sekali minum adalah dua sendok makan dalam 200 ml air pada penderita yang tidak mempunyai maag. Sedangkan bagi penderita maag, dimulai dari satu sendok teh dan jika tidak ada keluhan dapat ditingkatkan sampai dua sendok makan. Komposisi yang dikandung Tahesta adalah sari buah apel Anna, gula, air, dan ragi. Apabila ditinjau

dari segi komposisi dan manfaat, Tahesta kaya mineral dan vitamin, berfungsi mengikat kolesterol, mencegah penyakit jantung koroner, stroke, diabetes, alergi, wasir, asma, dan penyakit lainnya (Tahesta, 2015).

Kandungan yang ditunjukkan pada informasi gizi cuka apel Tahesta diantaranya adalah vitamin C, total karoten, dan antosianin. Vitamin C atau asam askorbat diketahui mempunyai fungsi sintesis kolagen pada jaringan ikat yang sangat dibutuhkan untuk penyembuhan luka. Peran asam askorbat dalam metabolisme sel adalah melindungi komponen sel dari kerusakan oksidatif. Asam askorbat berperan sebagai penangkal oksidasi radikal bebas, ROS (*Reactive Oxygen Spesies*), seperti hidroksil radikal, hidrogen peroksida, dan oksigen singlet (Aysun, 2009).

Karoten termasuk golongan karotenoid dimana merupakan pigmen berwarna oranye yang penting untuk fotosintesis. Zat ini membentuk warna oranye pada wortel serta banyak buah dan sayuran lainnya. Karoten dapat disimpan dalam hepar dan diubah menjadi vitamin A sesuai kebutuhan tubuh, itu sebabnya karoten disebut pro-vitamin A (Sandjaja dan Atmarita, 2009). Jenis karoten adalah α -karoten, β -karoten, γ -karoten, dan ζ -karoten yang mempunyai fungsi sebagai antioksidan (Fiedor dan Burda, 2014). Sedangkan antosianin atau bisa disebut antosianidin adalah pigmen berwarna merah dan termasuk golongan flavonoid yang bekerja sebagai antioksidan untuk melindungi jaringan kolagen dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas, dengan mengikat logam berat yang berperan mendukung pembentukan radikal bebas tersebut (Radovanovic, 2010). Sedangkan nilai gizi lainnya yang terdapat pada cuka apel Tahesta dapat disajikan pada Tabel 2.4 berikut ini.

Tabel 2.4 Kandungan cuka apel Tahesta

Takaran Saji	300 MI	
Kalori	22,389 kalori	
	%AKG	
Protein	0 g	0
Lemak	0 g	0
Karbohidrat	5,597 g	1,869
Serat Kasar	1,139 g	-
Kalium	16,843 mg	0,479
Kalsium	4,346 mg	0,617
Magnesium	0,0086 mg	0,0034
Besi	0,257 mg	0,899
Boron	0,891 mg	-
Total Karoten	0,599 μ g	-
Vitamin C	13,706 mg	22,851
Antosianin	14,399 ppm	-
Total Asam	18,746 g	-

Persen AKG (Angka Kecukupan Gizi) berdasarkan pada diet 2000 kalori.
Sumber: Tahesta (2015).

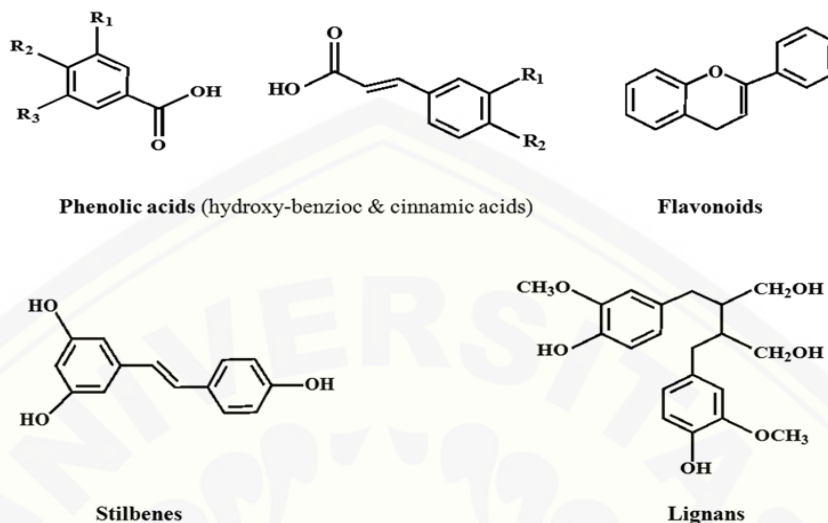
2.6 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang cukup stabil untuk mendonorkan elektron kepada radikal bebas dan menetralkannya sehingga mengurangi kemampuan radikal bebas sebagai perusak. Antioksidan ini mempunyai sifat penangkal yaitu menunda atau menghambat kerusakan sel akibat radikal bebas. Beberapa antioksidan diproduksi selama metabolisme tubuh berlangsung sedangkan antioksidan lainnya bisa ditemukan dalam makanan, yaitu mikronutrien berupa vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (asam askorbat), dan β -karoten. Mekanisme utama antioksidan dalam menangkal radikal bebas adalah menghancurkan reaksi radikal bebas dengan donor

elektron dan menghilangkan ROS dan nitrogen reaktif dengan katalisator. Antioksidan dibagi menjadi jenis enzim, yaitu SOD (Superoksida dismutase), katalase, glutathion, glutathion reduktase, glutathion peroksidase, dan glutathion S-transferase. Sedangkan jenis nonenzimatis adalah asam askorbat, glutathion, melatonin, tokoferol, dan asam urat (Lobo, *et al.*, 2010). Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa terdapat berbagai sumber antioksidan yang terdapat di sekeliling kita yaitu senyawa fenol, misalnya berupa asam fenol, flavonoid, dan tannin (Rohmatussolihat, 2009). Berikut ini akan diuraikan jenis antioksidan yaitu polifenol berupa antosianin yang terdapat pada cuka apel Anna merek Tahesta.

2.6.1 Polifenol

Polifenol merupakan hasil metabolit sekunder tanaman dan secara umum berkaitan dengan pertahanan diri terhadap radiasi ultraviolet atau serangan patogen. Polifenol merupakan kandungan alami dalam jumlah besar yang ditemukan pada buah, sayur, tanaman berbiji, dan minuman. Pada dekade 20, studi epidemiologi menunjukkan bahwa konsumsi jangka panjang makanan kaya polifenol bisa memberikan proteksi terhadap perkembangan kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, osteoporosis, dan penyakit neurodegeneratif. Polifenol diklasifikasikan berdasarkan jumlah cincin fenol yang dipunyai dan struktur dasar yang mengikat cincin satu dengan cincin fenol lainnya. Klasifikasi tersebut adalah asam fenol, flavonoid, *stilbenes*, dan *lignans* (Pandey dan Rizvi, 2009). Susunan kimia dari keempat kelas utama polifenol ditunjukkan pada Gambar 2.9 di bawah ini.

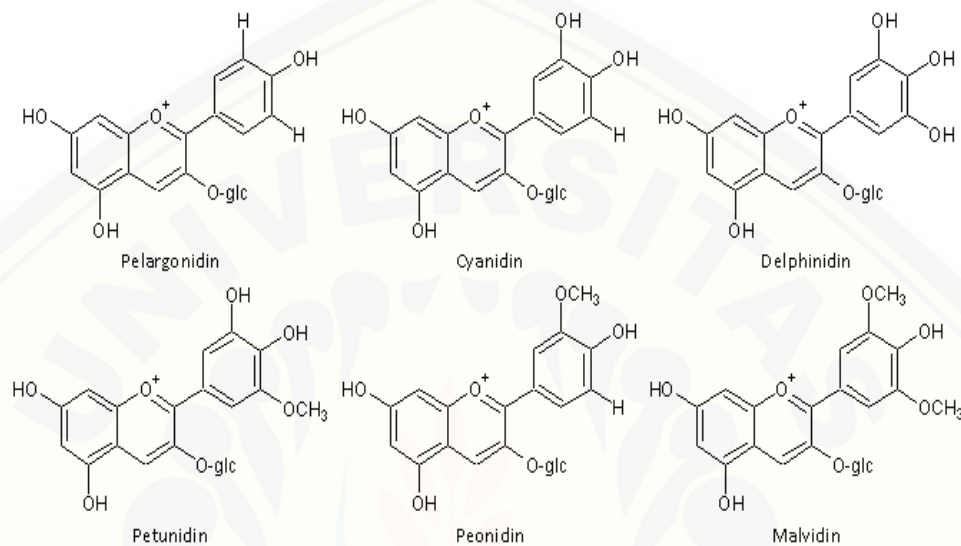


Gambar 2.9 Susunan kimia empat kelas utama polifenol (Pandey dan Rizvi, 2009)

Asam fenolik atau asam fenol ditemukan melimpah pada makanan dan dibagi menjadi dua kelas yaitu derivat asam benzoat dan derivat asam sinamik. Flavonoid menjadi golongan polifenol yang paling sering dipelajari dalam penelitian. Flavonoid mempunyai dua cincin aromatik dan terikat bersama oleh tiga atom karbon. Flavonoid dibagi menjadi enam kelas yaitu flavonol, flavon, flavanon, flavanol, antosianin, dan isoflavon (Pandey dan Rizvi, 2009).

Antosianin adalah komponen utama dari pigmen merah, biru, dan ungu pada sebagian besar daun bunga, buah, sayuran, tanaman berbiji seperti beras hitam (Tsao, 2010). Antosianin merupakan pigmen yang larut air dan disimpan dalam vakuola serta warna dari molekul antosianin ini dipengaruhi oleh pH pada vakuola tersebut. Saat kondisi asam akan berwarna merah, saat pH pertengahan berwarna ungu sampai biru, dan saat kondisi basa berwarna kuning sampai hijau. Struktur kimia dasar antosianin adalah *flavylium cation (2-phenylbenzopyrilium)* dimana terhubung dengan gugus hidroksil (-OH) dan atau metoksil (-OCH₃) dan satu atau lebih gula (antosianidin). Berdasarkan struktur kimia tersebut antosianin dibagi menjadi enam

jenis yang sering ditemukan pada sayur dan buah, yaitu pelargonidin, sianidin, delpidin, petunidin, peonidin, dan malvidin (Tazzini, 2014). Keenam struktur kimia jenis antosianin tersebut disajikan pada Gambar 2.10 berikut.



Gambar 2.10 Enam struktur kimia jenis antosianin (Tazzini, 2014)

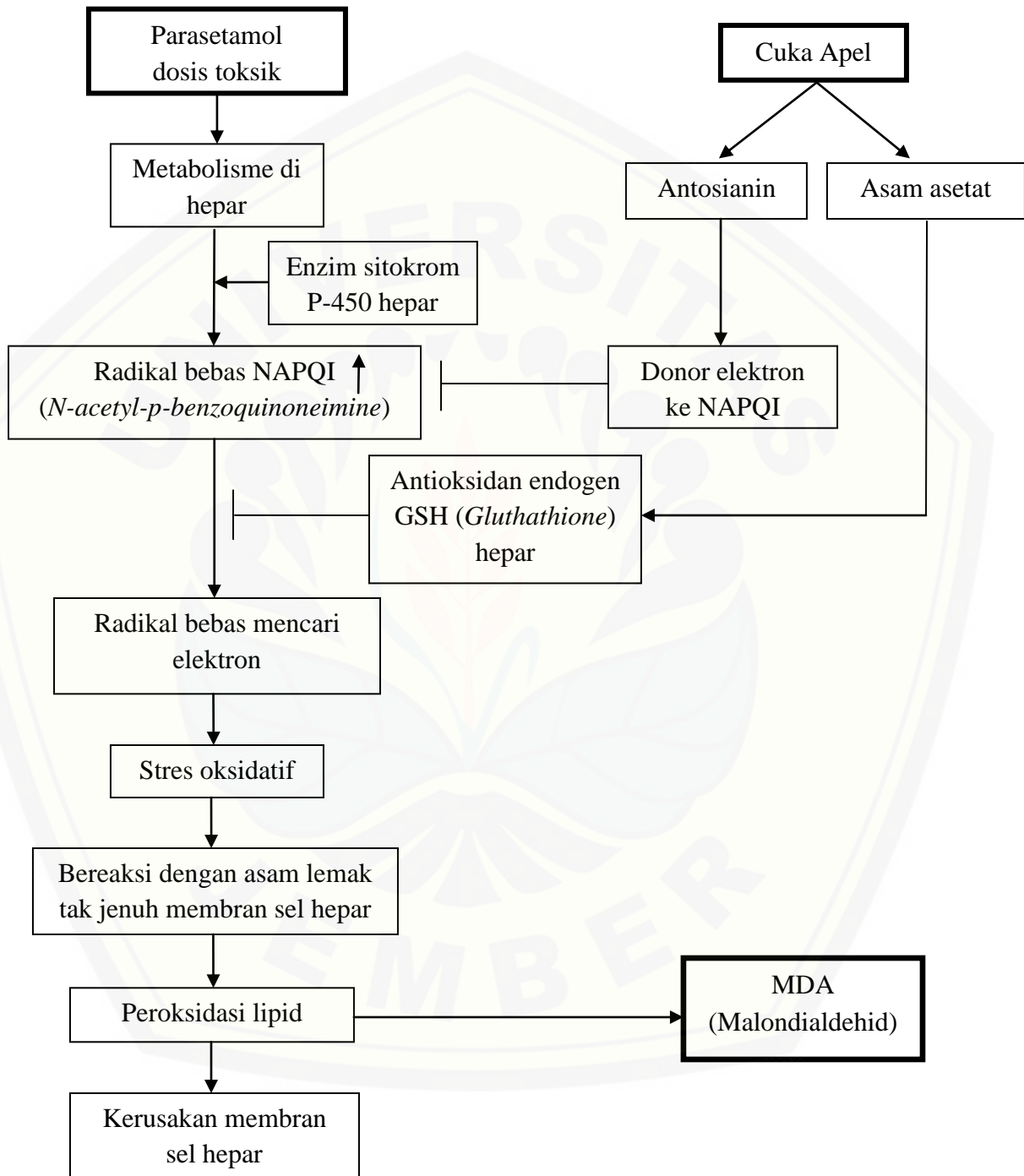
Antosianin sebagian besar ditemukan pada buah bluberi, ceri, rasberi, stroberi, *black currant*, anggur ungu, dan apel merah. Antosianin termasuk ke dalam bahan alami yang diketahui sebagai antioksidan sangat kuat (Lucioli, 2012). Antosianin sebagai pigmen alami merupakan antioksidan yang bernilai karena kemampuannya menangkal radikal bebas. Antosianin merupakan donor elektron yang baik (Martinez, 2009).

Jenis polifenol yang ketiga yaitu *stilbenes*, terdiri atas dua fenil terhubung oleh dua jembatan metilen karbon. Sedangkan yang terakhir yaitu *lignans* adalah bahan difenolik terdiri atas struktur *2,3-dibenzylbutane* yang terbentuk oleh dimerisasi dua asam sinamik (Pandey dan Rizvi, 2009). Beberapa penelitian membuktikan bagaimana efek dan bioavailabilitas polifenol bagi kesehatan manusia, terutama menetralkan radikal bebas dan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Polifenol mendukung aktivitas penting dari antioksidan selular tubuh seperti glutation, asam

askorbat, alfa tokoferol dan enzim seperti superoksida dismutase dan peroksidase (Francini dan Sebastiani, 2013). Polifenol sudah dibuktikan sebagai antioksidan kuat yang dapat menangkal radikal bebas dengan mekanisme yaitu mendonorkan elektron atau atom hidrogen misalnya pada proses hidrosilasi oleh flavonoid. Polifenol menekan terbentuknya radikal bebas sehingga menurunkan proses oksidasi dengan mencegah atau menonaktifkan prekursor radikal bebas. Penelitian lebih lanjut menyatakan bahwa polifenol mempunyai pengaruh sebagai penghancur rantai peroksidasi lipid dengan mendonasikan elektron kepada radikal bebas, menetralkannya sehingga menjadi lebih stabil dan tidak reaktif (Tsao, 2010).

Kekuatan senyawa fenol sebagai antioksidan tergantung dari beberapa faktor seperti ikatan gugus hidroksil pada cincin aromatik, posisi ikatan, posisi hidroksil atau elektron serta kemampuannya dalam menangkal radikal bebas (*free radical scavenger*). Semua polifenol mampu menangkal oksigen reaktif dan radikal alkil dengan memberikan donor elektron sehingga terbentuk radikal fenoksil yang relatif stabil. Ada hubungan antara kemampuan senyawa fenol sebagai antioksidan dan struktur kimianya. Konfigurasi dan total gugus hidroksil merupakan dasar yang sangat mempengaruhi mekanisme aktivitasnya sebagai antioksidan (Puspitasari *et al.*, 2016).

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.11 Kerangka konsep

Keterangan:

- | : Menghambat
- : Memicu
- ▭ : Variabel diteliti
- ▭ : Variabel tidak diteliti

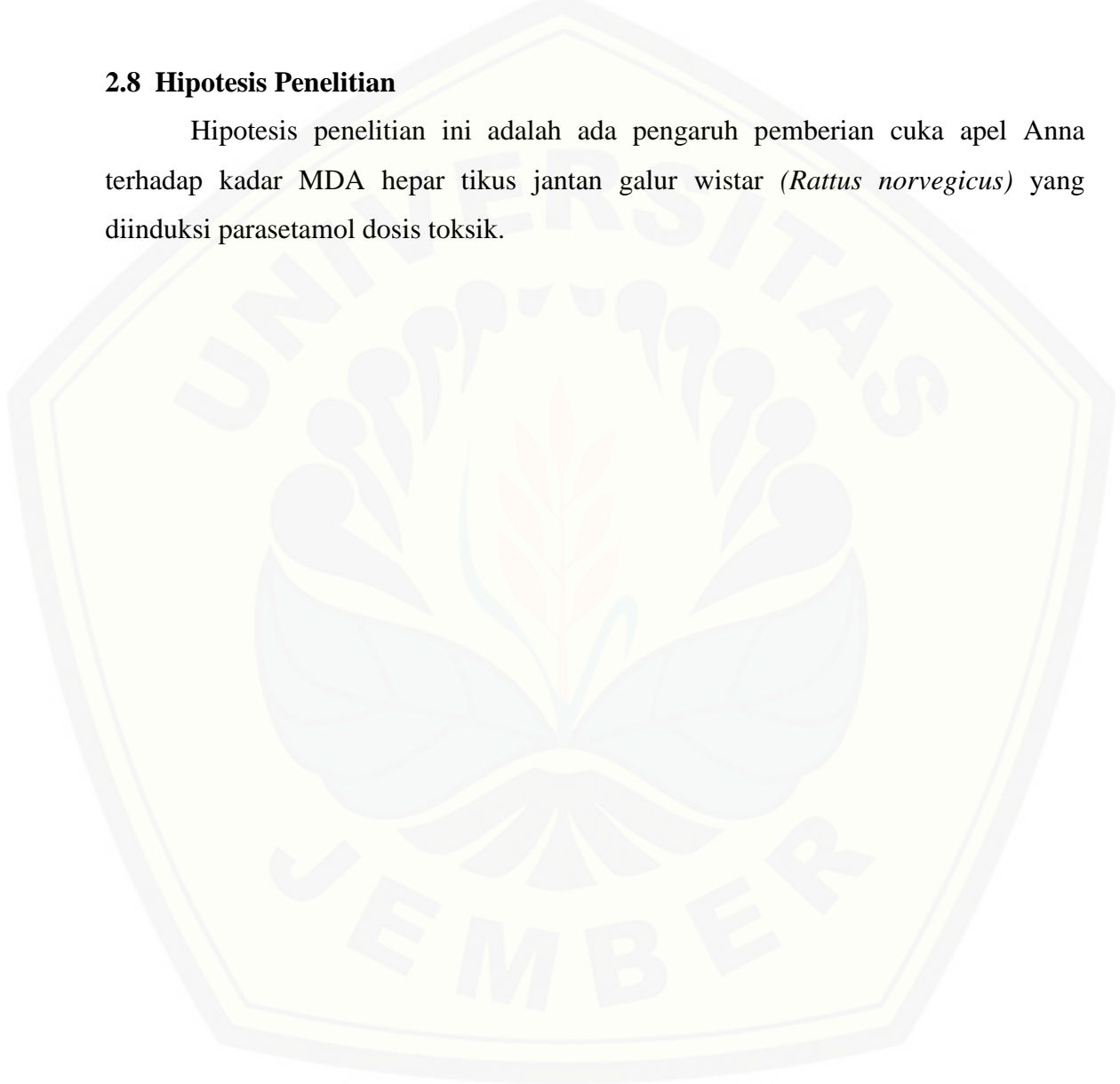
Pada dosis terapi, parasetamol mengalami glukuronidasi dan sulfasi dimana 90% dikonjugasi dengan asam glukoronat dan sebagian kecil lainnya dengan asam sulfat. Sedangkan sisanya dalam jumlah kecil, parasetamol diubah oleh enzim sitokrom P-450 menjadi NAPQI (*N-acetyl-p-benzoquinoneimine*) yang sifatnya radikal bebas. Radikal bebas tersebut kemudian didetoksifikasi oleh GSH hepar menjadi non toksik. Pada dosis toksik, jalur konjugasi parasetamol oleh asam glukoronat dan asam sulfat menjadi jenuh sehingga banyak parasetamol yang diubah menjadi NAPQI, sebagai akibatnya terjadi penurunan GSH hepar karena tidak cukup untuk mengubah semua NAPQI yang jumlahnya meningkat. Radikal bebas NAPQI bisa mencari elektron untuk berpasangan dengannya dan membentuk radikal bebas yang lebih aktif. Akibat adanya radikal bebas yang meningkat berupa NAPQI dan penurunan antioksidan endogen tubuh berupa GSH hepar, maka terjadi kondisi stres oksidatif. Radikal bebas NAPQI yang bersifat reaktif akan bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh sel hepar secara ireversibel sehingga akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid dan kerusakan membran sel hepar. Hasil peroksidasi lipid ini adalah MDA (*Malondialdehyde*).

Cuka apel mempunyai antioksidan berupa polifenol yaitu antosianin yang dapat mencegah penumpukan radikal bebas NAPQI yang sifatnya reaktif dengan mendonorkan elektron pada NAPQI sehingga menjadi non reaktif sedangkan asam asetat juga dapat memperbaiki kadar GSH yang akan membantu proses konjugasi NAPQI menjadi senyawa non reaktif dan lebih stabil. Apabila kadar GSH meningkat,

maka metabolit NAPQI yang sifatnya cenderung mencari elektron akan dapat dicegah, dan reaksi radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh membran sel hepar akan menurun sehingga diharapkan mampu mencegah kenaikan kadar MDA hepar.

2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah ada pengaruh pemberian cuka apel Anna terhadap kadar MDA hepar tikus jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi parasetamol dosis toksik.



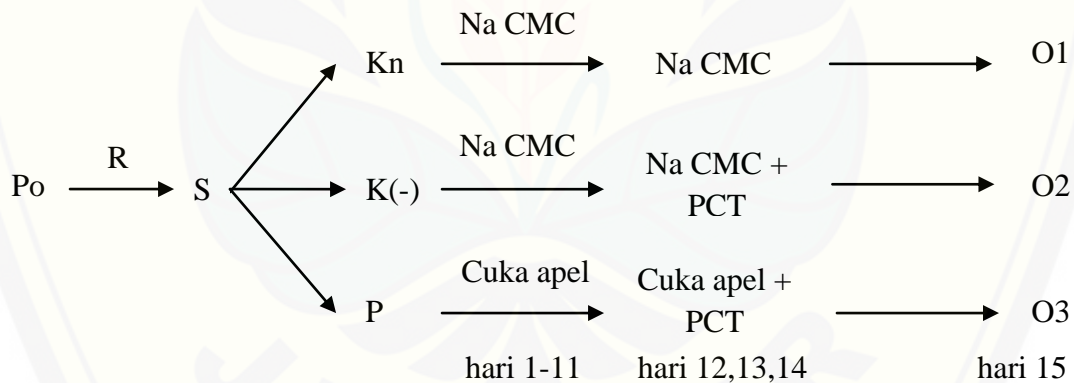
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui suatu pengaruh yang timbul akibat dari adanya perlakuan tertentu.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design*. Rancangan penelitian tersebut dilakukan tanpa pengukuran kadar MDA hepar sebelum perlakuan. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

Po : Populasi

R : Randomisasi sampel

S : Sampel

Kn : Kelompok kontrol dengan pemberian Na CMC 1% 1 ml selama 14 hari

K(-) : Kelompok kontrol negatif dengan pemberian Na CMC 1% 1 ml selama

- 14 hari dan parasetamol dosis toksik 291,6 mg/200 gBB tikus/hari pada hari ke-12, 13, dan 14
- P : Kelompok perlakuan dengan pemberian cuka apel Anna 0,4 ml/150g BB tikus/ hari per oral selama 14 hari dan parasetamol dosis toksik 291,6 mg/200 gBB tikus/hari satu jam setelahnya pada hari ke-12, 13, dan 14
- PCT : Pemberian parasetamol dosis toksik 291,6 mg/200 gBB tikus/hari
- O : Observasi kadar MDA hepar tikus pada hari ke-15

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus jantan *Rattus norvegicus* galur Wistar. Tikus galur tersebut diperoleh dari peternakan tikus yang ada di Malang. Peternakan tikus tersebut sering digunakan sebagai pengambilan sampel dalam penelitian.

3.3.2 Sampel

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan untuk membuat homogen sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah sebagai berikut:

- a. *Rattus norvegicus* galur wistar jantan.
- b. Tikus bulu putih dan sehat (bergerak aktif).
- c. Umur 2-3 bulan.
- d. Berat 150-200 gram.

Sedangkan kriteria eksklusi sampel penelitian adalah tikus yang sakit, yang mati sebelum proses randomisasi.

3.3.3 Jumlah Sampel

Sampel dipilih dengan menggunakan teknik *simple random sampling* yang kemudian dibagi menjadi 3 kelompok. Penelitian eksperimen dengan rancangan acak

lengkap, acak kelompok, atau faktorial sederhana untuk estimasi jumlah pengulangan atau besar sampel dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus *Federer* sebagai berikut.

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

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

$$2r \geq 15 + 2$$

$$r \geq 8 \sim 9$$

Keterangan:

r = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

t = jumlah kelompok perlakuan

Besar sampel yang dibutuhkan berdasarkan perhitungan dengan rumus di atas minimal sebanyak 9 ekor tikus masing-masing kelompok. Jadi dalam penelitian ini jumlah sampel yang digunakan untuk 3 kelompok adalah 27 ekor tikus.

3.4 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di dua tempat yaitu Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pemeliharaan sampel tikus dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk pengukuran kadar MDA hepar. Penelitian ini dilakukan pada Bulan Oktober-November 2015.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah cuka apel Anna.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA hepar tikus.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

- a. usia tikus yaitu 2-3 bulan;
- b. hewan coba yaitu *Rattus novergicus* galur wistar jenis kelamin jantan;
- c. berat badan tikus 150-200 gram;
- d. pemeliharaan dan perlakuan hewan coba;
- e. lama perlakuan hewan coba;
- f. dosis dan frekuensi pemberian parasetamol;
- g. frekuensi pemberian cuka apel.

3.5.4 Variabel *Confounding*

Variabel *confounding* dalam penelitian ini adalah:

- a. imunitas hewan coba;
- b. psikologis hewan coba;
- c. fisiologis hewan coba.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Cuka Apel Anna

Cuka apel Anna pada penelitian ini adalah cuka apel Tahesta yang pembuatannya berasal dari apel Anna Malang yang melalui proses fermentasi alkohol (anaerob) dan fermentasi asetat (aerob). Dosis cuka apel Tahesta adalah 0,4 ml/150 gBB tikus/hari diberikan per oral selama 14 hari.

3.6.2 MDA Hepar

Malondialdehid (MDA) hepar adalah produk akhir dari peroksidasi lipid terutama asam lemak tidak jenuh pada membran sel hepar yang dihasilkan melalui oksidasi oleh radikal bebas yaitu NAPQI akibat induksi parasetamol dosis toksik. Kadar MDA hepar diukur dengan menggunakan kit MDA ELISA merek *Elabscience* yang diukur menggunakan ELISA *plate reader* dan dinyatakan kadarnya dalam ng/ml.

3.6.3 Parasetamol Dosis Toksik

Parasetamol dosis toksik adalah dosis parasetamol yang dapat menimbulkan efek kerusakan hepar berupa nekrosis sel hepar tanpa menyebabkan kematian tikus yaitu $\frac{3}{4}$ LD₅₀ parasetamol pada tikus wistar. Dosis tersebut adalah 291,6 mg/200 gBB tikus dalam Na CMC 1% per hari diberikan per oral pada hari ke-12, 13, 14 satu jam setelah pemberian cuka apel Tahesta.

3.7 Bahan dan Alat Uji

3.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- bahan untuk pemeliharaan tikus adalah makanan standar, minuman, dan sekam;
- bahan untuk kelompok perlakuan adalah cuka apel Tahesta;
- bahan untuk induksi adalah parasetamol kaplet 500 mg dalam larutan Na CMC 1%;
- bahan untuk kontrol normal adalah Na CMC 1%;
- bahan untuk terminasi dan pengambilan organ hepar adalah eter, kapas, toples, hepar tikus;
- bahan pemeriksaan kadar MDA hepar tikus adalah hepar tikus dan kit MDA ELISA merek *Elabscience*.

3.7.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- alat untuk pemeliharaan tikus adalah bak plastik ukuran 40cm x 15cm x 10cm, penutup kawat ukuran 40cm x 15cm x 10cm, botol air, tempat makan dan label;
- alat untuk membuat parasetamol dalam Na CMC 1% adalah mortar dan penggerus, *heater*, *beaker glass*, dan pengaduk;
- alat untuk menyonde tikus adalah *hand scoon*, masker, *beaker glass*, pengaduk, dan spuit sonde;

- d. alat yang digunakan untuk terminasi dan pengambilan organ hepar adalah toples, kapas, *minor set*, *hand scoon*, timbangan dan kotak plastik;
- e. alat untuk pemeriksaan kadar MDA hepar tikus adalah *microplate reader* dengan gelombang 450 nm, inkubator, vortex, tabung *eppendorf*, *pipet tip*.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pembuatan Sediaan Parasetamol

LD50 untuk tikus wistar secara per oral yang telah diketahui adalah 1944 mg/kgBB atau 388,8 mg/200 gBB tikus. Dosis parasetamol yang dapat menimbulkan efek kerusakan hepar berupa nekrosis sel hepar tanpa menyebabkan kematian adalah dosis $\frac{3}{4}$ LD50 per hari (Shiddiqi, 2008). Dosis yang digunakan adalah 388,8 mg/200 gBB x 0,75 = 291,6 mg/200 gBB tikus. Dosis diberikan berupa parasetamol larut dalam Na CMC 1% dan disesuaikan dengan berat badan tikus. Agar memudahkan perhitungan maka parasetamol 500 mg dilarutkan dalam Na CMC 1% hingga 4 ml, sehingga dalam 2 ml larutan parasetamol mengandung 250 mg parasetamol.

3.8.2 Perhitungan Dosis Cuka Apel

Pada penelitian menggunakan cuka apel Tahesta sebagai antioksidan mempunyai efek dalam menurunkan kadar glukosa, digunakan dosis 0,4 ml/150 gBB tikus (Zubaidah, 2011). Sehingga dosis cuka apel Anna dalam penelitian ini juga mengacu pada penelitian tersebut sebagai antioksidan berupa 0,4 ml/150 gBB tikus/hari. Dosis cuka apel Anna juga menyesuaikan berat badan tikus.

3.8.3 Pengukuran Kadar MDA Hepar Tikus

Pengukuran kadar MDA menggunakan prosedur pada kit MDA ELISA merek *Elabscience* adalah :

- a. organ hepar dibersihkan, ditimbang sebesar 0,5 gram, dipotong kecil-kecil, dan dicuci dengan phosphate buffer saline (PBS) dingin 0,01 M pH=7,4 berulang-ulang hingga bersih dari darah;

- b. hepar dimasukkan ke dalam *ependorf* dan dihomogenkan dengan PBS dimana volume PBS menyesuaikan dengan berat hepar;
- c. hasil homogenitas disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 5000 rpm untuk mendapat supernatan;
- d. supernatan dimasukkan ke dalam *ependorf* baru;
- e. lakukan preparasi reagen yang dibutuhkan dari kit ELISA;
- f. tambahkan 50 µl Standar, Blanko, dan supernatan sampel pada setiap sumuran, pada blanko tambahkan larutan Reference Standard & Sample Diluent;
- g. tambahkan 50 µl *Biotinylated Detection Ab* pada setiap sumuran;
- h. inkubasi selama 45 menit dengan suhu 37°C;
- i. aspirasi dan cuci dengan *buffer wash* sebanyak tiga kali;
- j. tambahkan 100 µl HRP *Conjugate* pada setiap sumuran;
- k. inkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C;
- l. aspirasi dan cuci dengan *buffer wash* sebanyak lima kali;
- m. tambahkan 90 µl *substract reagen*;
- n. inkubasi selama 15 menit dengan suhu 37°C;
- o. tambahkan 50 µl *Stop Solution*
- p. baca pada gelombang 450 nm;
- q. baca hasil absorbansinya dan hitung kadarnya menggunakan kurva standar.

3.8.4 Perlakuan terhadap Hewan Coba

Sejumlah 27 ekor tikus jantan wistar dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang dipilih secara acak. Tikus ditempatkan dalam kandang dengan diberi makan dan minum standar secara *ad libitum* dan diadaptasikan selama satu minggu. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 9 ekor tikus yang dipilih secara acak. Kelompok pertama adalah kontrol normal dengan pemberian Na CMC 1% selama 14 hari. Kelompok kedua adalah kontrol negatif dengan pemberian Na CMC 1% selama 14 hari dan parasetamol dosis toksik selama 3 hari pada hari ke-12, 13, dan 14.

Kelompok ketiga adalah perlakuan dengan pemberian cuka apel Tahesta selama 14 hari dan parasetamol dosis toksik hari ke-12, 13, dan 14. Pada hari ke-15 dilakukan terminasi seluruh tikus dengan cara pembiusan menggunakan larutan eter, dimana tikus dimasukkan ke dalam toples yang di dalamnya terdapat kapas yang sudah dibasahi eter. Beberapa detik kemudian tikus akan pingsan. Setelah tikus pingsan, tikus difiksasi di atas tempat pembedahan dengan menggunakan jarum kecil pada kedua tangan serta kedua kakinya. Setelah tikus terfiksasi dengan baik, dilakukan pembedahan dengan menggunakan gunting bedah tajam dari arah perut bawah menuju ke bagian dada dengan hati-hati sehingga tidak mengenai organ dan pembuluh darah besar dan tidak terjadi *bleeding*. Pengambilan organ hepar secara hati-hati dan diambil 1 gram untuk MDA dan sisanya untuk kebutuhan penelitian lain. Organ hepar dicuci dengan PBS dingin untuk menghilangkan apabila terdapat darah yang menempel. Selanjutnya dihaluskan dan dihomogenisasi dengan PBS sampai homogen dalam tabung *eppendorf*. Kemudian disentrifus untuk diambil supernatannya dan dilakukan pengukuran kadarnya. Setelah pengambilan sampel selesai, sisa sampel atau bagian yang tidak terpakai dikremasi.

3.8.5 Pengukuran Hasil

Pada hari ke-15 setelah perlakuan pertama diberikan, semua hewan percobaan dieuthanasia dengan cara anastesi eter, kemudian organ hepar diambil untuk selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar MDA dengan menggunakan kit MDA ELISA. Setelah dilakukan pemeriksaan kadar MDA hepar dan dibaca dengan ELISA *plate reader*, akan didapatkan angka hasil absorbansinya. Angka absorbansi dari 27 sampel diukur kadarnya dengan menggunakan rumus pada kurva standar. Dalam percobaan ini menggunakan 9 hewan percobaan dalam tiap kelompoknya sehingga akan diperoleh 9 data kuantitatif kadar MDA hepar untuk tiap kelompok percobaan. Selanjutnya rata-rata skor dari masing-masing kelompok dibandingkan dengan uji *One Way ANOVA*.

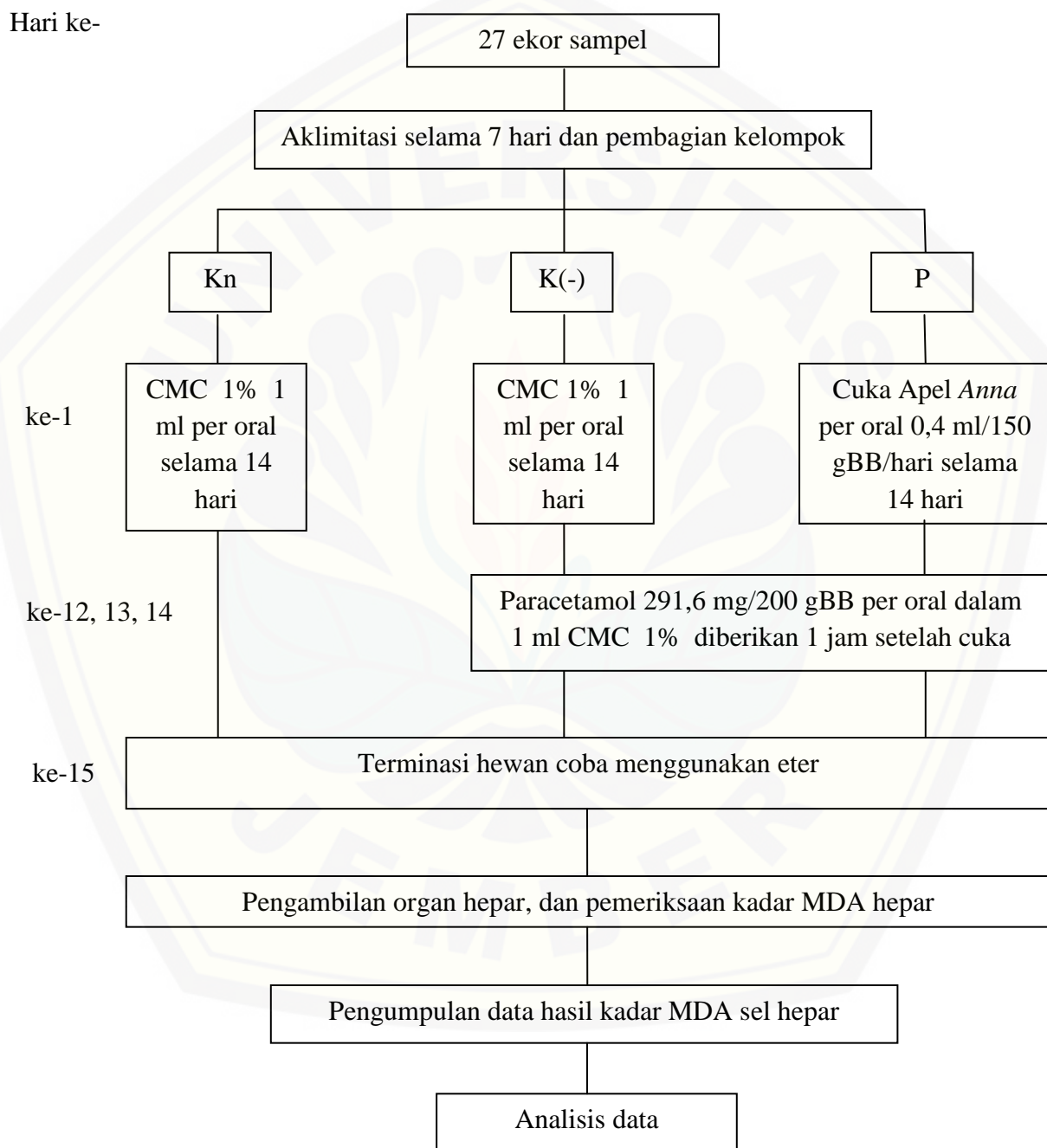
3.9 Analisis Data

Seluruh data dianalisis secara komputersasi dan dibantu dengan perangkat lunak berupa program statistik. Tahapan uji yang dilaksanakan terhadap kadar MDA sel hepar yaitu uji normalitas dengan menggunakan Shapiro Wilk karena jumlah sampel <50 dan uji Levene untuk mengetahui data homogen atau tidak. Jika sebaran data normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA*.

Apabila pada uji normalitas dan homogenitas data, didapatkan sebaran data yang tidak normal dan tidak homogen, maka menggunakan uji non parametrik yaitu uji Kruskal Wallis. Apabila didapatkan hasil signifikan yaitu $p < 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* yaitu LSD untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang berbeda signifikan.

3.10 Alur Penelitian

3.10.1 Skema Perlakuan terhadap Hewan Coba



Gambar 3.2 Diagram alur penelitian