



REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201810534, 30 April 2018

Pencipta

Nama : **Mardiah**
Alamat : Jl.Kampung Jati Rt13/03 No.1 Jakarta Timur, Jakarta, Dki Jakarta, 13830
Kewarganegaraan : Indonesia

Pemegang Hak Cipta

Nama : **Mardiah**
Alamat : Jl.Kampung Jati Rt13/03 No.1 Jakarta Timur, Jakarta, Dki Jakarta, 13830
Kewarganegaraan : Indonesia
Jenis Ciptaan : **Karya Tulis (Disertasi)**
Judul Ciptaan : **Pengaruh Sari Rosela Ungu (Hibiscus Sabdariffa Linn) Terhadap Beberapa Penanda Diabetes Melitus Pada Tikus Spraque Dawley**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 22 Agustus 201, di Bogor

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.

Nomor pencatatan : 000106951

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL



Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.
NIP. 196611181994031001

**PENGARUH SARI ROSELA UNGU (*Hibiscus sabdariffa* Linn)
TERHADAP BEBERAPA PENANDA DIABETES MELITUS
PADA TIKUS SPRAQUE DAWLEY**

MARDIAH



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2014**

**PENGARUH SARI ROSELA UNGU (*Hibiscus sabdariffa* Linn)
TERHADAP BEBERAPA PENANDA DIABETES MELITUS
PADA TIKUS *SPRAQUE DAWLEY***

MARDIAH



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2014**

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul ” Pengaruh Sari Rosela Ungu (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap beberapa Penanda Diabetes Melitus pada Tikus *Sprague Dawley* ” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2014

Mardiah
F 261090051

RINGKASAN

MARDIAH. Pengaruh Sari Rosela Ungu (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap beberapa Penanda Diabetes Melitus pada Tikus *Sprague Dawley*. Dibimbing oleh FRANSISKA RUNGKAT ZAKARIA, ENDANG PRANGDIMURTI, dan MUHAMMAD RIZAL MARTUA DAMANIK.

Penyakit diabetes melitus (DM) adalah penyakit akibat kesalahan metabolisme yang melibatkan serangkaian patogenesis seperti stres oksidatif dan inflamasi. Stres oksidatif terjadi ketika adanya ketidakseimbangan antara jumlah ROS (*Reactive Oxygen Species*) dengan pertahanan antioksidan seluler. Peningkatan produksi ROS dan penurunan antioksidan sel menyebabkan terjadinya kerusakan sel atau kematian sel melalui proses nekrosis atau apoptosis. Radikal bebas dapat menyerang lemak dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak seperti peningkatan kadar malonaldehid. Radikal bebas dapat menyerang DNA terutama pada sel pankreas dan menyebabkan terjadinya *DNA adduct*. Jika terjadi dalam sel pankreas bentuk ikatan ini membuat DNA rusak dan tidak mampu lagi menghasilkan insulin dan menyebabkan hiperglikemia. Kondisi hiperglikemia membuat sel imun mengeluarkan sitokin (*TNF- α* dan *IL-6*) dan menyebabkan inflamasi yang memperparah kondisi penyakit DM. Pemberian sari rosela yang mengandung antioksidan diyakini mampu menurunkan patogenesis yang terjadi pada penyakit diabetes melitus.

Penelitian terbagi dalam beberapa tahap, dimana tahap I adalah pemilihan kelopak bunga rosela (ungu dan merah) dengan alat pengering *fluidized bed dryer* dan *cabinet dryer*. Setelah itu dilakukan uji secara *in vivo* menggunakan tikus jantan *Sprague Dawley* selama 21 hari untuk mengetahui pengaruh sari rosela terhadap kapasitas antioksidan, kadar MDA (malonaldehid) dalam hati dan ginjal, *DNA adduct* pada sel pankreas serta kadar *TNF- α* dan *IL-6* pada limfa. Kondisi tikus diabetes dilakukan melalui induksi *streptozotosin* (STZ) dosis 30-35 mg/Kg BB tikus dalam 0.1M buffer sitrat dingin. Ada 6 kelompok tikus yaitu kelompok tikus normal (TN), kelompok tikus diabetes dan diberi aquades (TNEG), kelompok tikus diabetes dan diberi obat *glibenklamid* (TG), kelompok tikus diabetes diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB (TROS1), kelompok tikus diabetes diberi rosela 288 mg/hari/200 g BB (TROS2) dan kelompok tikus preventif (TPREV) yaitu tikus diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB selama 11 hari dan disuntik STZ, lalu diteruskan pemberian rosela sampai hari ke 21.

Hasil penelitian menunjukkan kelopak rosela ungu dengan pengeringan *cabinet dryer* terpilih menjadi bahan yang akan digunakan pada pengujian secara *in vivo* karena kandungan antosianin rosela ungu lebih tinggi dibanding rosela merah sehingga diharapkan dapat memberi pengaruh terhadap peningkatan antioksidan dalam tubuh tikus. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan rosela mengandung flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, tanin dan fenol hidrokuinon. Kelopak rosela ungu kering mempunyai kandungan antosianin 95.41 ± 1.76 ppm, kapasitas antioksidan (DPPH) sebesar 91.57 ± 2.94 mg AEAC/100 g, kadar vitamin C 1.25 ± 0.07 mg/100 g.

Hasil uji *in vivo* menunjukkan sari rosela 72 mg/hari/200 g BB meningkatkan kapasitas antioksidan total plasma 0.2655 ± 0.0016 mM dibanding

tikus negative (TNEG) yang memiliki kapasitas antioksidan total 0.0893 ± 0.0134 mM. Selain itu sari rosela cenderung dapat menurunkan MDA di hati dan ginjal, meningkatkan insulin sebesar 0.4433 ± 0.1802 ng/ml, serta cenderung menurunkan kadar inflamasi *TNF- α* , namun tidak berpengaruh terhadap *DNA adduct* (N7 metilguanin). Konsumsi sari rosela ungu memiliki dampak positif dalam menurunkan tingkat keparahan patogenesis penyakit diabetes melalui peningkatan jumlah antioksidan dalam tubuh, menurunkan pembentukan malonaldehid, meningkatkan insulin, dan menurunkan pembentukan senyawa inflamasi *TNF- α* .

Kata Kunci : rosela, malonaldehid, kapasitas antioksidan, *DNA adduct*, insulin, diabetes, *streptozotisin*

SUMMARY

MARDIAH. Influence of Purple Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Against Several Markers of Diabetes Mellitus on Sprague Dawley Rats. Supervised by FRANSISKA RUNGKAT ZAKARIA, ENDANG PRANGDIMURTI, and MUHAMMAD RIZAL MARTUA DAMANIK.

Diabetes melitus is a metabolic disease that involves a series of errors in metabolism process such as hyperglycemia, oxidative stress and inflammation. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between the production of ROS (Reactive oxygen species) by cellular antioxidant defenses. Increased ROS production and decreased antioxidant in the cells cause damage or cell death through necrosis or apoptosis. Free radicals can attack fat and cause lipid peroxidation. Free radicals can attack DNA, including in pancreatic cells and causing DNA adducts. If it happens in the cells of the pancreas DNA is damaged and no longer able to produce insulin, and results hyperglycemia. The condition of hyperglycemia makes immune cells secrete cytokines (TNF- α and IL-6), produces inflammation that aggravates diabetes.

The purpose of this study was to observe the effect of antioxidant compounds in roselle extract in diabetic Sprague Dawley rats induced by streptozotocin. Roselle calyx was dried with cabinet dryer using two types of roselle calyx namely red and purple roselle. Antidiabetic effect of roselle extract was tested in 6 groups of rats namely normal control rats (TN), glibenclamide rats (TG), rats roselle doses 1 (TROS1), rats roselle doses 2 (TROS2), preventive rats (TPREV) and negative control rats (TNEG). The experiments were conducted for 21 days.

The results showed that purple roselle calyx with drying cabinet dryer were chosen to be used in the intervention study because anthocyanin content of purple roselle higher than red roselle which is expected to give effect to an increase in antioxidants in the body of rats. Phytochemical screening test showed that roselle extract contained flavonoids, steroids, triterpenoids, saponins, tannins and phenols hydroquinone. Dry purple roselle contained anthocyanin 95.41 ± 1.76 ppm, antioxidant capacity (DPPH) was 91.57 ± 2.94 mg AEAC / 100 g, and levels of vitamin C 1.25 ± 0.07 mg / 100 g.

Total antioxidant capacity (TAC) on rats groups TROS1 (0.2655 ± 0.0016 mM) was higher than on TROS2 (0.1868 ± 0.0962 mM) and TG (0.2109 ± 0.0055 mM). Rats groups of negative control (TNEG) had a total antioxidant capacity of the lowest (0.0893 ± 0.0134 mM). The content of malonaldehyde (liver and kidney) on rats group of TROS1 and TROS2 was lower than rats TNEG. Analysis of insulin showed that TROS1 contained the same insulin levels (0.4433 ± 0.1802 ng/ml) with others groups of TROS2, TG and TPREV. Rat in the TNEG group had the lowest insulin level (0.1286 ± 0.0337 ng/ml). Roselle trend to reduce levels of inflammatory TNF, but did not affect the DNA adducts (N7 methylguanine). Purple roselle consumption have a positive impact in reducing the severity of the pathogenesis of diabetes through tent to increase the amount of

antioxidants in the body, reduce the formation of malonaldehyde, increase insulin production and tend to reduce the formation of inflammatory compounds (TNF- α).

Keywords : roselle, malonaldehyde, antioxidant capacity , DNA adduct, insulin, diabetes mellitus , streptozotocin

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2014
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan yang wajar di IPB. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

**PENGARUH SARI ROSELA UNGU (*Hibiscus sabdariffa* Linn)
TERHADAP BEBERAPA PENANDA DIABETES MELITUS
PADA TIKUS *SPRAQUE DAWLEY***



MARDIAH

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor
pada
Program Studi Ilmu Pangan

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2014**

- Penguji pada Ujian Tertutup : Puspo Edi Giriwono, PhD
(Staf Pengajar Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, FATETA, IPB)
DR dr Irma Suparto, MS
(Staf Pengajar Departemen Kimia, FMIPA, IPB)
- Penguji pada Ujian Terbuka : Prof Dr Yahdiana Harahap, MS Apt
(Staf Pengajar Fakultas Farmasi Universitas Indonesia)
Prof Dr Ir Slamet Budijanto, MAgr
(Staf Pengajar Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, FATETA, IPB)

Judul Penelitian : Pengaruh Sari Rosela Ungu (*Hibiscus sabdariffa*
Linn) terhadap beberapa Penanda Diabetes
Melitus pada Tikus *Sprague Dawley*
Nama : Mardiah
NRP : F261090051

Disetujui
Komisi Pembimbing

Prof Dr Ir Fransiska R. Zakaria, MSc
Ketua

Prof Drh M Rizal Martua Damanik MRepSc PhD
Anggota

Dr Ir Endang Prangdimurti, MSi
Anggota

Diketahui oleh,

Ketua Program Studi Ilmu Pangan

Prof Dr Ir Ratih Dewanti, MSc



Dekan Sekolah Pascasarjana

Prof Dr Ir Rahmi Syah, MScAgr

Tanggal Ujian : 18 Agustus 2014

Tanggal Lulus : 29 AUG 2014

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur pada Alloh SWT karena atas rahmat dan hidayahNya sehingga penelitian disertasi dengan judul “Pengaruh Sari Rosela Ungu (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap Beberapa Penanda Diabetes Melitus pada Tikus *Sprague Dawley*” dapat diselesaikan dengan baik. Sebagian dari disertasi ini artikel dengan judul “Perubahan Kandungan Kimia Sari Rosela Merah dan Ungu (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Alat Pengering *Cabinet Dryer* dan *Fluidized Bed Dryer*” telah diterima pada jurnal nasional terakreditasi Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian, untuk diterbitkan pada Vol.24 tahun 2014. Satu artikel dengan judul “*The effect of roselle extract (Hibiscus sabdariffa L) on blood glucose and total antioxidant level on diabetic rat induced by streptozotocin*” telah dikirim pada Journal Functional Foods.

Terima kasih penulis sampaikan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada Prof Dr Ir Fransiska R. Zakaria, MSc, Prof Drh M.Rizal Martua Damanik, MRepSc, PhD dan Dr Ir Endang Prangdimurti, MSi atas pemikiran, arahan dan bimbingan, nasehat, motivasi dan doanya. Kepada Ketua Program Studi Pascasarjana Ilmu Pangan Prof Dr Ratih Dewanti, MSc atas motivasi dan arahnya. Kepada Dekan Fakultas Ilmu Pangan Halal dan Rektor Universitas Djuanda atas ijinnya yang diberikan pada penulis untuk melanjutkan studi S3 ini. Terima kasih juga disampaikan pada Dr dr Irma Suparto, MS dan Puspo Edi Giriwono, PhD selaku penguji ujian tertutup atas saran dan masukannya untuk perbaikan laporan disertasi Kepada Prof.Dr.Ir.Slamet Budijanto, MAgr dan Prof Dr Yahdiana Harahap, MSApt selaku dosen penguji ujian terbuka. Kepada Laboratorium Seafast, Laboratorium ITP, TPG IPB, Laboratorium Terpadu FKH IPB, Laboratorium GMK IPB atas fasilitas laboratorium yang digunakan selama penelitian, Laboratorium DNA Rumah Sakit Dharmais, Jakarta atas ijinnya mengerjakan isolasi DNA, Laboratorium Bioekivalen dan Bioavailabilitas, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia atas ijinnya menggunakan LCMS untuk analisa *DNA adduct*. Teman-teman sejawat Fakultas Ilmu Pangan Halal atas motivasi dan pengertian yang luar biasa. Teman-teman seperjuangan angkatan 2009 (Siti, Wita, Tita, Zita, Ai, Meilan) jasa kalian tidak pernah terlupakan. Adik kelasku Purnama yang mendampingi selama penelitian dan ikut membantu menganalisa data, semoga Alloh melimpahkan Rahmat dan KaruniaNya pada kalian semua, aamiin. Yang saya hormati dan sayangi kedua orang tua (Alm.A. Djalil Harun dan Rohani), mertua (Bapak Tuin dan Almh Rantih), suami tercinta Rohman Robani, anak-anakku tersayang (Izza Kamila, Fadhlan Aulia, Amalia Adzhari, dan Anisa Rizka Safira) dan keluarga besar yang telah memberi dukungan, doa, kesempatan dan kasih sayang.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat untuk semua pihak.

Bogor, Agustus 2014

Mardiah

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	iii
DAFTAR ISI	xii
1 PENDAHULUAN	
Latar Belakang	1
Tujuan Penelitian	3
Hipotesis Penelitian	3
Manfaat Penelitian	4
Ruang Lingkup Penelitian	4
Daftar Pustaka	4
2 DISAIN PENELITIAN	7
Bahan dan Alat	7
Tempat dan Waktu Penelitian	7
Metode Penelitian	8
Tahap 1. Pemilihan varietas rosela dan alat pengering yang digunakan untuk mengeringkan rosela	9
Tahap 2. Pengujian sari rosela secara <i>in vivo</i> menggunakan tikus <i>Sprague Dawley</i>	9
Tahap 3. Analisis beberapa parameter penanda stres oksidatif menggunakan plasma dan organ tikus (pankreas, limfa, hati dan ginjal)	11
3 PERUBAHAN KANDUNGAN KIMIA SARI ROSELA MERAH DAN UNGU (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) DENGAN ALAT PENGERING <i>CABINET DRYER</i> DAN <i>FLUIDIZED BED DRYER</i>	
Abstrak	12
Pendahuluan	12
Bahan dan Metode	13
Hasil dan Pembahasan	16
Simpulan	20
Daftar Pustaka	20
4 THE EFFECT OF ROSELLE EXTRACT (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) ON BLOOD GLUCOSE AND TOTAL ANTIOXIDANT LEVEL ON DIABETIC RAT INDUCED BY STREPTOZOTOCIN	
Abstract	23
Introduction	23
Materials and Methods	24
Result	26
Discussion	30
Conclusion	33
Reference	33

DAFTAR ISI (LANJUTAN)

5	ANTI INFLAMASI SARI ROSELA PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI DENGAN <i>STREPTOZOTOSIN</i>	
	Abstrak	37
	Pendahuluan	37
	Bahan dan Metode	38
	Hasil dan Pembahasan	40
	Simpulan	42
	Daftar Pustaka	43
6	PENGARUH SARI ROSELA TERHADAP <i>DNA ADDUCT</i> PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI DENGAN <i>STREPTOZOTOSIN</i>	
	Abstrak	45
	Pendahuluan	45
	Bahan dan Metode	46
	Hasil dan Pembahasan	49
	Simpulan	53
	Daftar Pustaka	54
7	PEMBAHASAN UMUM	56
	Diabetes Melitus dan ROS	58
	Pengukuran Penanda Stres Oksidatif	61`
	Resisten Insulin dan Inflamasi	63
	Daftar Pustaka	67
8	SIMPULAN DAN SARAN	
	Simpulan	71
	Saran	72
	RIWAYAT HIDUP	73

1 PENDAHULUAN

Latar Belakang

Di Indonesia, diabetes melitus merupakan salah satu penyakit tidak menular tertinggi yang menyebabkan kematian. Diabetes melitus (DM) adalah penyakit yang berhubungan dengan gaya hidup terutama konsumsi pangan. Beberapa faktor yang berhubungan dengan peningkatan resiko pada DM tipe 2 adalah meningkatnya umur, obesitas, makan yang berlebihan, jenis diet (meningkatnya konsumsi lemak hewani), riwayat keluarga dengan diabetes, penyakit hipertensi, hiperlipidemia, dan penyakit jantung (Ma dan Tong 2010).

Diabetes melitus terbagi atas diabetes melitus tipe 1 dan tipe 2. Diabetes tipe 1 adalah disebabkan oleh kerusakan seluler yang dimediasi oleh autoimun yang merusak sel β pankreas sehingga sel tidak mampu memproduksi insulin. Diabetes tipe ini biasanya terjadi mulai pada masa anak-anak namun dapat juga terjadi pada semua usia. Diabetes melitus tipe 2 biasanya ditandai dengan adanya penurunan sensitivitas terhadap insulin (resistensi insulin) atau akibat terjadinya penurunan produksi insulin dan terjadi pada usia di atas 45 tahun dan juga bisa terjadi pada orang yang mengalami obesitas (Oever *et al.* 2010).

Diabetes melitus dicirikan oleh ketidakcukupan sintesis insulin atau kerusakan aksi insulin yang akan menyebabkan hiperglikemia. Hiperglikemia meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terdiri dari radikal bebas dan senyawa radikal, dan menurunkan antioksidan. Kondisi ini menyebabkan stres oksidatif. Radikal bebas adalah senyawa yang pada orbit terluarnya mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan, sifatnya sangat labil dan sangat reaktif sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada komponen sel seperti DNA, lipid, protein dan karbohidrat. Bila radikal bebas ini menyerang DNA sel pankreas maka menyebabkan kerusakan DNA, terjadi disfungsi sel β dan menurunkan jumlah sel β penghasil insulin pada pankreas (Vincent *et al.* 2004; Robertson *et al.* 2003; Pazdro dan Burgess 2010). Kondisi stres oksidatif dapat menyebabkan resisten insulin dan komplikasi diabetes (Virgolici *et al.* 2008).

Beberapa mekanisme yang berkontribusi dengan patogenesis diabetes melitus akibat hiperglikemia adalah *glycation* (pengikatan protein dengan gula atau lemak), peroksidasi lemak, oksidasi dan metilasi DNA menghasilkan *DNA adduct* serta autooksidasi glukosa. Kondisi diabetes juga meningkatkan senyawa inflamasi seperti *IL-6* (Interleukin 6) dan *TNF- α* (Tumor Necrosis Factor α). ROS dapat menginduksi *NF- κ B* (Nuclear Factor kappa β) untuk mengekspresikan gen senyawa sitokin tersebut (Oever *et al.* 2010).

ROS dapat dinetralisir oleh antioksidan yang ada dalam tubuh sehingga kerusakan biologis oleh radikal bebas dan senyawa radikal yang dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif dapat dihindari (Pokorny *et al.* 2001). Antioksidan merupakan senyawa pemberi proton untuk meredam dampak negatif ROS, sehingga antioksidan mampu mencegah interaksi antara radikal dan senyawa biologis sebagai target (Kohen dan Nysta 2002). Mekanisme kerja antioksidan seluler menurut Ong *et al.* (1995) antara lain, antioksidan dapat berinteraksi langsung dengan oksidan, radikal bebas, atau oksigen tunggal; mencegah pembentukan jenis oksigen reaktif; mengubah jenis oksigen reaktif menjadi kurang toksik; mencegah kemampuan oksigen reaktif; dan memperbaiki

kerusakan yang timbul. Sementara menurut Pokorny *et al.* (2001) mekanisme kerja antioksidan ada empat yaitu 1) mengikat *reactive oxygen species* (ROS) dan radikal nitrogen bebas, 2) memetabolisme peroksida lipid menjadi produk non radikal, 3) mengkelat ion logam, dan 4) mereduksi potensial oksidasi suatu molekul. Konsumsi antioksidan dapat mencegah stres oksidatif dan kerusakan sel yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti hipertensi, diabetes melitus, jantung, kolesterol dan penyakit neurodegeneratif.

Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai minuman fungsional adalah kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan tanaman asli India yang dibawa ke Malaysia dan kemudian dibudidayakan di seluruh negara tropis. Kandungan terbanyak dalam rosela adalah antosianin yang merupakan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Umumnya senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan primer dan *scavenger* terhadap anion superoksida (Tsao 2010). Flavonoid berperan sebagai pendonor hidrogen, memiliki kemampuan menstabilkan dan mendelokalisasi elektron tidak berpasangan pada radikal bebas, serta mampu mengkelat ion logam (terminasi reaksi Fenton) (Rice-Evans *et al.* 1997).

Rosela kering mengandung 13% asam dalam bentuk campuran asam sitrat dan asam malat, dan 15,3% asam hibiscus ($C_6H_6O_7$) (Duke 1983). Menurut Hirunpanich *et al.* (2005) rosela mengandung alkaloids, L-asam askorbat, anisaldehyd, antosianin, β karoten, β sitosterol, asam sitrat, *cyandin-3-rutinoside*, *delphinidin*, galaktosa, *gossypetin*, *hibiscetin*, mukopolisakarida, pektin, *protocatechuc acid*, polisakarida, kuercetin, asam stearat dan lilin. Menurut Kuo *et al.* (2012) sari rosela dalam metanol mengandung *protocatechuic acid* (PCA) (8.62%), epigallokatekin gallat (20.34%), katekin (9.86%), epigallokatekin (10.11%) dan *caffeic acid* (18.24%). Beberapa penelitian menunjukkan rosela efektif menurunkan tekanan darah (Onyekwe *et al.* (1999); Herrera *et al.* (2004); Faraji dan Tarkhari (1999); Adegunloye *et al.*(1996); McKay *et al.* (2010), memperbaiki profil lipid (Khosravi *et al.* 2009); berfungsi sebagai antioksidan yang melindungi kerusakan hati (Tseng *et al.* 1996); Tseng *et al.* (1997); Elsaadany *et al.* (1991); Dahiru *et al.* (2003), meningkatkan enzim antioksidan di hati (Okoko dan Ibiba 2008), antiinflamasi, analgesik (Reanmongkol dan Itharat 2007) serta menurunkan asam urat (Kirdpon *et al.* 1994; Kuo *et al.* 2012). Penelitian mengenai kemampuan rosela sebagai antidiabetes belum banyak dilakukan. Penelitian tentang pengaruh sari rosela merah terhadap tikus diabetes yang diinduksi aloksan pernah dilakukan oleh Mardiah *et al.* (2010). Hasilnya menunjukkan bahwa sari rosela merah dapat menurunkan kadar gula darah dari 477.6 mg/dl menjadi 161.1 mg/dl selama 12 hari. Selain itu terjadi pertumbuhan jumlah *pulau langerhans* pada sel β setelah dirusak oleh aloksan yaitu sebanyak 24.8 dibanding kontrol (6.6). Namun perlu dikaji lebih lanjut bagaimana mekanisme komponen bioaktif yang terdapat dalam rosela mampu menurunkan risiko penyakit diabetes melitus.

Dalam penelitian ini diuji kemampuan rosela sebagai antioksidan dengan melakukan uji *in vivo* menggunakan tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi dengan *streptozotosin*. Senyawa *streptozotosin* merupakan salah satu zat diabetogenik yang bersifat toksik, terutama terhadap sel β pankreas (Szkudelski 2001; Kim *et al.* 2006). *Streptozotosin* memberikan efek sitotoksik akut pada sel dan molekul

karena membentuk ROS penyebab kerusakan oksidatif (Gayathri dan Kannabiran 2009). Rosela yang dibuat dalam bentuk sari diharapkan mampu meningkatkan kapasitas antioksidan yang terdapat dalam tubuh sehingga stres oksidatif dapat dikurangi, yang pada akhirnya dapat mencegah penyakit degeneratif seperti diabetes melitus.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Memilih varietas rosela (merah atau ungu) dan metode pengeringan yang digunakan (*fluidized bed dryer* atau *cabinet dryer*) berdasarkan kandungan antosianin, vitamin C dan kapasitas antioksidan.
2. Menguji kemampuan rosela dalam meningkatkan status antioksidan total berdasarkan kapasitas antioksidan total dalam plasma dan kadar malonaldehid ginjal dan hati tikus percobaan.
3. Mengetahui pengaruh sari rosela terhadap kadar glukosa darah dan insulin pada tikus diabetes.
4. Mengetahui kemampuan rosela dalam memperbaiki kerusakan sel β pankreas oleh *streptozotosin* berdasarkan parameter kadar gula darah, insulin dan *DNA adduct*.
5. Mengetahui kemampuan antiinflamasi sarirosela berdasarkan parameter jumlah senyawa inflamasi *TNF- α* dan *IL-6*.

Hipotesis Penelitian

1. Jenis alat pengering mempengaruhi kandungan kimia kedua varietas kelopak bunga rosela.
2. Kelopak rosela ungu memiliki warna yang lebih gelap dibanding kelopak rosela merah yang mengindikasikan kandungan antosianin dan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi.
3. Sari rosela dapat meningkatkan kapasitas antioksidan total dalam tubuh sehingga dapat mengurangi stres oksidatif akibat radikal bebas berlebih dalam tubuh tikus diabetes melitus.
4. Sari rosela dapat memperbaiki sel β pankreas yang telah dirusak oleh *streptozotosin* yang ditandai dengan perbaikan produksi insulin yang selanjutnya memperbaiki kondisi tikus diabetes melitus.
5. Sari rosela dapat menurunkan kadar *DNA adduct* dan malonaldehid yang menjadi marker stres oksidatif pada penyakit diabetes.
6. Sari rosela dapat menurunkan kadar *TNF- α* dan *IL-6* sebagai penanda inflamasi yang terjadi pada tikus diabetes melitus.

Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan informasi tentang :

1. Peran antosianin dan zat aktif lainnya dalam kelopak rosela dalam meningkatkan kapasitas antioksidan dalam tubuh.
2. Mekanisme sari rosela dalam menurunkan tingkat keparahan stres oksidatif pada tikus diabetes melitus.

Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah menggunakan satu jenis rosela (merah atau ungu) yang digunakan sebagai bahan untuk mengetahui pengaruh rosela dalam menurunkan dan memperbaiki penanda keparahan penyakit diabetes melitus pada tikus percobaan. Penanda keparahan diabetes melitus yang dikaji dalam penelitian ini adalah marker stres oksidatif seperti kapasitas antioksidan, malonaldehid dan *DNA adduct*. Untuk melihat hasil perbaikan rosela pada penyakit diabetes maka dilihat dari hasil kadar gula darah, insulin dan kadar senyawa inflamasi (*TNF- α* dan *IL-6*).

DAFTAR PUSTAKA

- Adegunloye BJ, Omoniyi JO, Owolabi OA, Ajagbonna OP, Sofola OA, Coker HA. 1996. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *Afr.J.Med.Sci.* 25(3): 235-238.
- Dahiru D, Obiand H, Umaru H. 2003. Effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on carbon tetrachloride induced liver damage. *Biokemistri.* 15(1): 27-33.
- Duke JA. 1983. Handbook of Energy Crops. unpublished.
- El-Saadany SS, Sitohy MZ, Labib SM, el-Massry RA. 1991. Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Entrez Pub. Med. Nahrung.* 35(6): 567-576.
- Faraji HM, Tarkhari HA. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *J. Ethnopharmacol.* 65(3): 231-236.
- Gayathri M, Kannabiran K. 2009. The Effects of oral administration of an aqueous extract of *Ficus bengalensis* stem bark on some hematological and biochemical parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Biol.* 33: 9-13.
- Herrera A, Romero SF, Chavez-Soto MA, Tortoriello J. 2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine.* 11:375-382.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatasaran, Sato H, Herunsalee A, Suthisisang C. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol. Pharm. Bull.* 28(3): 481-484.

- Khosravi M, Jalali K, Afkhami AM, Fatehi F. 2009. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *J. Altern Compliment Med.* 15(8):899-903.
- Kim JS, Ju JB, Choi CW, Kim SC. 2006. Hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of four Korean medicinal plants in alloxan induced diabetic rats. *Am.J.Boichem.Biotech.* 2:154-160.
- Kirdpon S, Nakorn SN, Kirdpon W. 1994. Changes in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) juice. *J. Med. Assoc. Thailand.* 77(6): 314-321.
- Kohen, Nysta. 2002. Invited Review : Oxidation of biological system :oxidative stres phenomena, antioxidant, redox reaction and methods for their quantification. *Toxicopathol.* 30(6):620-650.
- Kuo CY, Kao ES, Chan KC, Leeb HJ, Huang TF, Wang CJ. 2012. *Hibiscus sabdariffa* Linn. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Functional Foods.* 4:375-381.
- Ma RCW, Tong PCY. 2010. Epidemiology of type 2 Diabetes. Didalam: Holt RIG, Cokram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ, editor. Textbook of Diabetes. Ed ke-4. UK:A John Wiley&Sons, Ltd.
- Mardiah, Noli N, Irwan. 2010. Potential of roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) as antidiabetic. Prosiding dalam seminar International Pangan Fungsional, Bali
- McKay DL, Oliver C-Y, Edward S, Jeffrey BB. 2010. *Hibiscus sabdariffa* Linn. Tea (Tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J. Nutr.*140(2): 298-303.
- Oever I, Raterman A, Nurmohamed MT, Simsek S. 2010. Endothelial dysfunction, inflammation and apoptosis in diabetes melitus. *Mediators of Inflammation.* hal 1-15. Doi:10.1155/2010/792393.
- Okoko T, Ibiba FO. 2008. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri.* 20(2):47-52.
- Ong ASH, Niki E, Packer L. 1995. Nutrition, Lipids, and Desease. Illinois: AOCS Champaign Pr.
- Onyenekwe PC, Anjani EO, Ameh DA, Gamaniel KS. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in wistar rats. *Cell Biochem.Funct.* 17(3): 199-206.
- Pazdro, Burgess JB. 2010. The role of vitamin E and oxidative stres in diabetes complications. *Mechanism of Ageing and Development.* 131 : 276-286.
- Pokorny I, Yanishlieva N, Gordon M. 2001. Antioxidants in Food. Boca Raton Boston New York Washington, DC: CRC Press
- Reanmongkol W, Itharat A. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces in experimental animals. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 29(1) : 29-38
- Rice-Evans C, NJ Miller , G Paganga. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science.*2:152-159.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. 2003. Glucose toxicity in β cell type 2 Diabetes, good radical gone bad and the glutathione connection. *Diabetes.* 52:581-587.

- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol.Res.* 50(6):537-546.
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of distary polyphenol. *Nutrients.* 2:1231-1246.
- Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin Wu HW, Wang CJ. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *J.of Food Chem.Toxicol.* 35(12):1159-1164.
- Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, Chu HY. 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 101(2):137-148.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews.* 25(4):612-628.
- Virgolici B, Mohora M, Gaman L, Lixandru D, Manolescu B, Coman A, Stoian I. 2008. Relation between inflammation and oxidative stress markers in diabetic foot patients. *Romanian J.Biophys.* 18(4): 273–282.

2 DESAIN PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) varietas ungu dan merah yang diperoleh dari perkebunan rosela di Leuwiliang, Bogor. Tikus galur *Sprague Dawley* sebagai hewan percobaan diperoleh dari BPPOM, Jakarta. Bahan-bahan kimia untuk analisa kimia sari rosela dan analisis untuk organ tikus (insulin, kapasitas antioksidan total, gula darah, senyawa inflamasi, malonaldehid).

Untuk keperluan pengeringan rosela digunakan *fluidized bed dryer* dan *cabinet dryer*. Analisa kimiawi digunakan peralatan gelas, spektrofotometer, dan *microplate reader*.



Gambar 1. Kelopak bunga rosela ungu (kiri) dan kelopak bunga rosela merah (kanan)

Tempat dan Waktu Penelitian

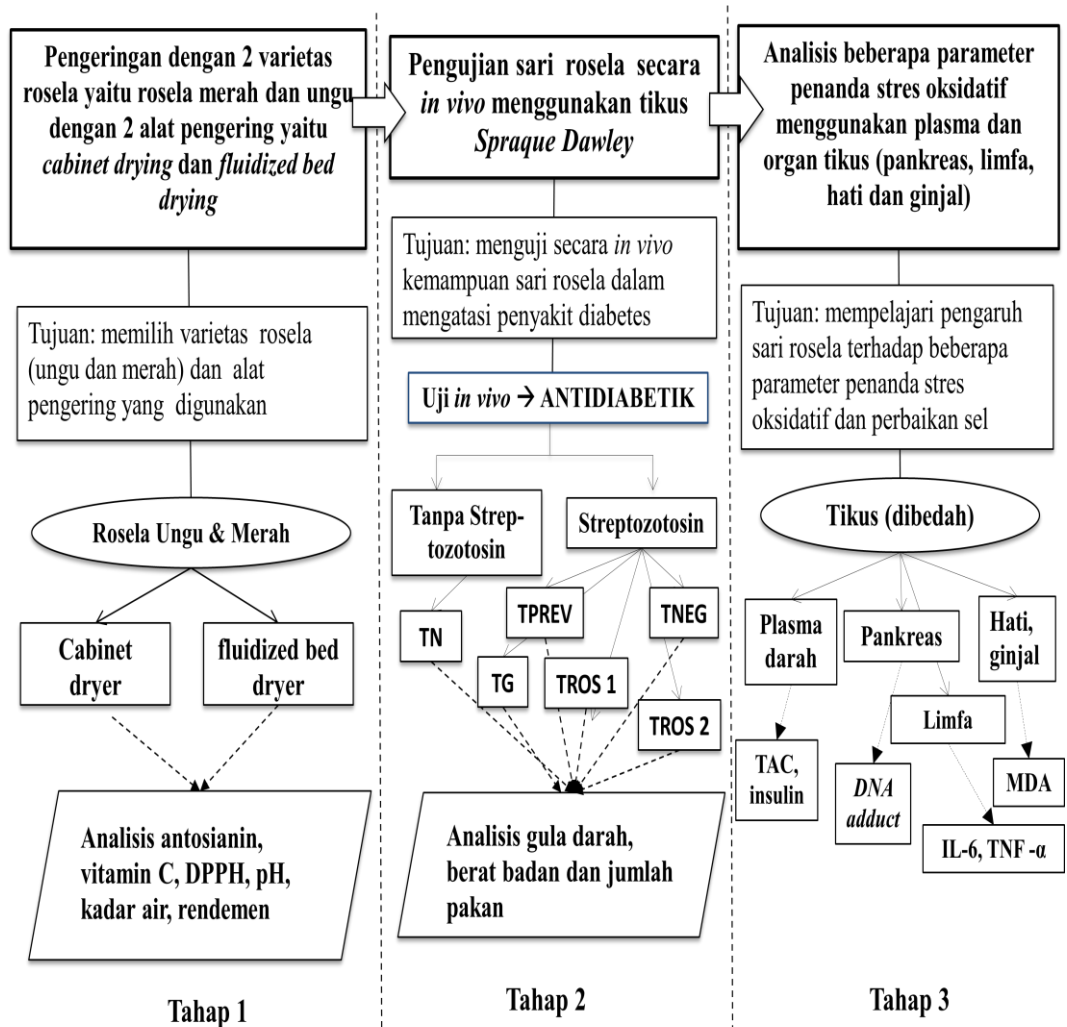
Penelitian dilaksanakan mulai dari bulan September 2012 sampai Juni 2014 di beberapa Laboratorium, yaitu:

1. Laboratorium *Southeast Asian Food and Agricultural Science and Technology* (SEAFAST) Center, IPB.
2. Laboratorium Departemen ITP, FATETA IPB
3. Laboratorium Terpadu FKH, IPB
4. Laboratorium Ekstraksi DNA Rumah Sakit Dharmais, Jakarta
5. Laboratorium Bioekivalen dan Bioavailabilitas Fakultas Farmasi UI, Depok

Metode Penelitian

Penelitian ini dirancang dalam 3 tahap berikut dan disajikan pada Gambar 1.

1. Pemilihan varietas rosela dan alat pengering yang digunakan untuk mengeringkan rosela
2. Pengujian sari rosela secara *in vivo* menggunakan tikus *Sprague Dawley*
3. Analisis beberapa parameter penanda stres oksidatif menggunakan plasma dan organ tikus (pankreas, limfa, hati dan ginjal)



Gambar 1. Skema Tahapan Penelitian

Keterangan: TN= Tikus tanpa *Streptozotodin* (STZ) TG= Tikus dengan STZ dan diberi *glibenklamid*; TNEG= tikus dengan STZ dan diberi aquades; TROS1 = Tikus dengan STZ dan diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB; TROS2= Tikus dengan STZ dan diberi rosela 288 mg/hari/200 g BB; TPREV = Tikus diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB sampai hari ke 11 disuntik STZ dan diteruskan pemberian rosela sampai akhir perlakuan

Tahap 1. Pemilihan varietas rosela dan alat pengering yang digunakan untuk mengeringkan rosela

Tahap ini bertujuan untuk memilih varietas rosela (ungu atau merah) dan alat pengering yang digunakan dalam penelitian ini. Dua alat pengering yang dicobakan (*fluidized bed drying* dan *cabinet drying*) ditujukan agar proses pengeringan lebih terkontrol dan lebih higienis. Parameter yang digunakan untuk pemilihan rosela dan alat pengering adalah antioksidan (vitamin C dan antosianin) dan kapasitas antioksidannya (uji DPPH) pada rosela kering. Sebagai kontrol pengujian senyawa antioksidan dan kapasitas antioksidan juga dilakukan pada rosela segar.

Pengeringan Rosela. Pengeringan *cabinet dryer* menggunakan suhu 60°C dan bahan dikeringkan selama kurang lebih 6 jam sampai kering. Pengeringan dengan alat *fluidized bed drying* menggunakan suhu inlet 105°C dan suhu outlet sebesar 70°C, dan dilakukan selama kurang lebih 1.5 jam. Waktu pengeringan ditentukan berdasarkan kadar air rosela kering yang diharapkan yaitu sekitar 2.1-2.5% basis kering

Analisis kimia yang dilakukan menggunakan sari rosela yaitu rosela kering direbus pada air mendidih selama 10 menit lalu disaring. Rasio rosela dan air 1:100. Selain itu dilakukan uji penapisan fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui jenis komponen fitokimia yang ada pada sari rosela.

Tahap 2. Pengujian sari rosela secara *in vivo* menggunakan tikus *Sprague Dawley*

Penelitian pada tahap ini bertujuan untuk menguji secara *in vivo* kemampuan sari rosela terpilih dalam mengatasi penyakit diabetes. Penelitian menggunakan tikus jenis *Sprague Dawley* jantan berumur ± 2 bulan (200 \pm 30 g). Tikus diperoleh dari BPPOM Jakarta. Penelitian telah mendapat ijin (kode etik) dengan nomor No.LB.02.01/5.2/KE.446/2013 dari Dinas Kesehatan, Jakarta.

Pembuatan Sari Rosela. Rosela kering direbus dengan air mendidih selama 10 menit dengan konsentrasi 1% dan disaring. Rebusan dipisahkan dengan vakum evaporator suhu 50°C sampai 10 kalinya. Sari rosela yang diperoleh dikemas dalam plastic polietilen dan disimpan pada suhu 4°C.

Pengelompokan dan Perlakuan dengan Tikus Percobaan. Tikus *Sprague Dawley* disuntik dengan *streptozotosin* (STZ) secara intraperitoneal dengan dosis 30-35 mg/Kg BB untuk membuat tikus diabetik. STZ menghasilkan kondisi stres oksidatif khususnya pada sel β pankreas. Sebagai kontrol adalah tikus yang tidak disuntik STZ. Jumlah tikus dalam setiap kelompok perlakuan adalah 4 ekor (sesuai dengan minimum jumlah sampel menurut Hukum Federer). Perlakuan secara terperinci pada setiap kelompok adalah sebagai berikut :

- (1) Kelompok tikus kontrol dan disingkat dengan kode TN
- (2) Kelompok tikus yang disuntik dengan *streptozotosin* dan diberi aquades (kelompok tikus kontrol negatif) dan diberi kode TNEG
- (3) Kelompok tikus diabetes dan diberi obat *glibenklamid* dengan dosis 0.09 mg/hari/200 g BB dan diberi kode TG
- (4) Kelompok tikus diabetes dan diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB dan diberi kode TROS1

- (5) Kelompok tikus diabetes dan diberi rosela 288 mg/hari/200 g BB dan diberi kode TROS2
- (6) Kelompok tikus yang diberi rosela selama 11 hari lalu disuntik STZ, setelah diabetes dilanjutkan pemberian sari rosela sampai hari ke 21 dan diberi kode TPREV.

Perlakuan dilakukan selama 21 hari. Sari rosela dan *glibenklamid* diberi sebanyak 2 ml/hari dengan cara sonde. Pakan yang diberikan adalah modifikasi pakan AIN 93 M. Jumlah pakan yang diberikan 25 g/hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

Analisis yang dilakukan pada tikus selama perlakuan adalah pengukuran kadar gula darah setiap 1 minggu, berat badan setiap 2 hari sekali dan jumlah pakan yang dikonsumsi setiap hari.

Pembuatan Ransum. Ransum diberikan kepada tikus dengan komposisi tertentu untuk mendukung pertumbuhan tikus. Ransum yang digunakan menggunakan ransum AIN-93M yang merupakan diet untuk pemeliharaan. Diet ini merupakan perbaikan diet 76A.

Tabel 1. Komposisi ransum

Komposisi	AIN-93M (g/kg diet)
<i>Cornstarch</i>	465.692
Casein (>85% protein)	140
Dekstrin dari pati jagung	155
Sukrosa	100
Minyak jagung	40
Serat (CMC)	50
Mineral	35
Vitamin (Fitkom)	10
<i>L-Cysteine</i>	1.8
<i>Choline bitartrate (41.1% choline)</i>	2.5
TBHQ (mg)	8

Sumber : Reeves (1997)

Tabel 2. Komposisi mineral

Mineral	g /kg
Calcium carbonat anhidrous	290.535
Potasium fosfat monobasic	203.455
Potasium sitrat	22.785
NaCl	60.225
Potasium sulfat	37.925
Magnesium oksida	19.53
Ferri sitrat	4.93
Zinc Karbonat	1.345
Mineral	g /kg
Sodium meta silikat	1.18

Mangan karbonat	0.515
Kupri karbonat	0.245
Krom potasim sulfat	0.225
Asam borat	66.325
Sodium fluoride	51.68
Nikel karbonat	25.88
Litium klorida	14.16
Sodium selenat anhidrous	8.34
Potasium iodat	8.14
Amonium paramolibdat	6.47
Amonium vanadat	5.37
Sukrosa	170.745

Tahap 3. Analisis beberapa parameter penanda stres oksidatif menggunakan plasma dan organ tikus (pankreas, limfa, hati dan ginjal)

Tahap penelitian ini adalah lanjutan dari tahap dua setelah masa perlakuan berakhir yaitu menganalisis beberapa parameter penanda stres oksidatif dan perbaikan sel.

Pengambilan Organ dan Persiapan Sampel. Pada akhir masa perlakuan (setelah 21 hari) tikus dianestesi menggunakan eter. Tikus lalu ditelentangkan dan dibersihkan dengan alkohol. Sebelum pengambilan organ dilakukan *exsanguinations* (pengambilan darah sampai mati) dulu. Darah dimasukkan dalam tabung yang mengandung EDTA. Darah segera disentrifuse pada 1870 g selama 15 menit. Plasma yang terbentuk dipisahkan dan disimpan pada suhu -20°C. Tikus dibedah dan diambil organnya seperti limfa, ginjal, hati dan pankreas. Organ tersebut dicuci dengan PBS dingin, ditiriskan dan dibungkus dengan alumunium foil dan disimpan pada suhu -20°C sebelum dianalisis. Analisis yang dilakukan terhadap plasma darah adalah insulin dan kapasitas antioksidan total. Organ hati dan ginjal digunakan untuk analisis malonaldehid (MDA), limfa untuk analisis kadar senyawa inflamasi (*TNF- α* dan *IL-6*). Pankreas digunakan untuk analisis *DNA adduct* menggunakan LCMS. Sebelumnya DNA sel pankreas diisolasi menggunakan ekstrasi DNA kit (genomic kit).

3 PERUBAHAN KANDUNGAN KIMIA SARI ROSELA MERAH DAN UNGU (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) DENGAN ALAT PENGERING CABINET DRYER DAN FLUIDIZED BED DRYER*

Abstract

Most of roselle leaves were dried to handle and increase its preservation. In this study, two methods for drying roselle leaves i.e cabinet dryer (60°C, 6 hours) and fluidized bed dryer (70°C, 1.5 hours) have been done on two variety of roselles (red roselle and purple roselle). The result showed that drying methods could decrease the content of anthocyanine, vitamin C and antioxidant capacity compared with fresh roselle as control. The cabinet dryer maintained more of anthocyanin than fluidized bed dryer. The anthocyanin and antioxidant capacity in purple roselle was higher than red roselle. But vitamin C content in red roselle was higher than than in purple roselle. The phytochemical analyses indicated the content of flavonoid, steroid, triterpenoid, and saponine for both of roselle relatives same.

Keywords : *cabinet dryer, fluidized bed dryer, anthocyanin, antioxidant capacity, roselle*

Pendahuluan

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) adalah salah satu jenis tanaman dari famili Malvaceae. Rosela memiliki senyawa kimia yang diyakini sebagai bahan pengobatan tradisional yang mempunyai kegunaan untuk beberapa penyakit. Beberapa penelitian menunjukkan rosela efektif menurunkan tekanan darah (Onyekwe *et al.*, 1999; Faraji dan Tarkhari 1999; Adegunloye *et al.*, 1996; McKay *et al.*, 2010), menurunkan profil lemak (Khosravi *et al.*, 2009), meningkatkan enzim antioksidan di hati (Okoko dan Ibiba, 2008), anti inflamasi, analgesik (Reanmongkol dan Itharat, 2007) dan melindungi kerusakan hati (Tseng *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1997).

Rosela memiliki keunggulan warna yang menarik karena kandungan pigmen antosianinnya. Di Indonesia dikenal 2 varietas rosela yaitu rosela merah dan ungu, yang diberikan nama demikian karena warna kelopak kedua varietas rosela tersebut mempunyai warna merah dan ungu. Antosianin merupakan senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Umumnya senyawa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan primer, kelator (mampu mengikat logam) dan *scavenger* terhadap superoksida anion. Kemampuan antioksidatif antosianin timbul dari reaktifitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron tidak berpasangan, serta kemampuannya mengkelat ion logam (terminasi reaksi Fenton) (Rice-Evans *et al.*, 1997).

*Telah diterima untuk publikasi pada Jurnal Teknologi Industri Pertanian vol.24 tahun 2014

Antosianin, seperti halnya pigmen alami lainnya, memiliki stabilitas yang rendah. Antosianin dapat mengalami degradasi selama ekstraksi, pemurnian, pengolahan, dan penyimpanan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Laleh *et al.* (2006) menunjukkan bahwa peningkatan pH, suhu, dan paparan cahaya dapat merusak molekul antosianin. Paparan cahaya juga dapat memperbesar degradasi pada molekul antosianin. Penyebab utama kehilangan pigmen warna berhubungan dengan hidrolisis antosianin (Ozela *et al.*, 2007).

Rosela mengandung kadar air yang cukup tinggi (86%) sehingga mudah sekali rusak. Salah satu upaya untuk mengawetkannya adalah membuat rosela kering. Di Indonesia selama ini rosela dikeringkan dengan menggunakan sinar matahari. Pengeringan dengan sinar matahari membutuhkan waktu lama yaitu selama 3-4 hari tergantung suhu dan kelembaban. Pengeringan dengan metode ini menghasilkan produk yang kurang higienis. Dalam penelitian ini dicoba pengeringan rosela dengan *fluidized bed dryer* dan *cabinet dryer*. Menurut Ashaye (2013) pengeringan dengan *cabinet dryer* lebih baik dibanding menggunakan sinar matahari untuk mengeringkan rosela. Menurut Lie (2009) pengeringan dengan oven suhu 60°C memberikan penerimaan terbaik pada rosela kering. Sementara menurut Bauman *et al.* (2005) metode pengeringan *fluidized bed dryer* merupakan metode terbaik untuk pengeringan buah dan sayur dimana menghasilkan mutu yang lebih baik, waktu rekonstitusi yang lebih singkat, memiliki transfer suhu dan massa lebih baik dan menggunakan waktu yang lebih pendek.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh jenis alat pengering terhadap kadar senyawa antioksidan (vitamin C dan antosianin) dan kapasitas antioksidannya (uji DPPH) pada rosela kering. Sebagai kontrol, pengujian senyawa antioksidan dan kapasitas antioksidan juga dilakukan pada rosela segar.

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah kelopak bunga rosela merah dan rosela ungu. Kelopak rosela diperoleh dari perkebunan Leuwiliang, Bogor. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisa meliputi HCl 37%, H₂SO₄, selenium mix, NaOH, metanol, 2,2 *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH⁺), buffer sodium asetat, buffer sodium klorida, vitamin C murni (Merck), Larutan iod, asam oksalat, akuades dan air bebas ion.

Alat-alat yang digunakan adalah pisau, tampah, timbangan kasar, *cabinet dryer*, *fluidized bed dryer*, spektrofotometer, sentrifus, pipet mikro, pompa vakum, *Buchner unit*, *Shaker*, dan peralatan gelas untuk analisis.

Metode Penelitian

Penentuan jenis alat pengering terbaik dilakukan dengan cara membandingkan secara deskripsi data parameter sifat kimia (total antosianin, vitamin C dan total antioksidan) sari rosela kering. Alat pengering kelopak bunga rosela yang digunakan adalah *cabinet dryer* dan *fluidized bed dryer*. Berat rosela yang dikeringkan dengan dua alat tersebut adalah setara atau sama untuk menghindari bias.

Pengeringan Kelopak Bunga Rosela dengan *Cabinet dryer*

Kelopak bunga rosela dipisahkan dari bijinya kemudian dicuci dengan air bersih lalu ditiriskan airnya. Kelopak bunga rosela dibagi 2 untuk memperkecil ukuran ($5 \times 3 \text{ cm}^2$). Pengeringan dengan *cabinet dryer* menggunakan suhu 60°C dan bahan dikeringkan selama kurang lebih 6 jam sampai kering dengan ditandai kelopak berwarna kecoklatan dan *crispy* (mudah pecah) jika diremas dengan kadar air sekitar 2-3%. Selama proses pengeringan, rosela secara teratur dibolak balik dan diubah posisi dalam rak *cabinet* untuk mendapatkan pemerataan efek panas pada bahan secara sempurna sehingga didapatkan tingkat kekeringan yang seragam dan waktu yang lebih cepat. Setelah kering rosela dibungkus plastik polietilen yang rapat untuk menghindari pengaruh kelembaban dan disimpan pada suhu 4°C .

Pengeringan Kelopak Bunga Rosela dengan *Fluidized bed dryer*

Kelopak bunga rosela dipisahkan dari biji dan dicuci dengan air bersih lalu ditiriskan airnya. Kemudian kelopak rosela diperkecil ukurannya $2 \times 2 \text{ cm}^2$. Kelopak rosela dikeringkan dengan alat *fluidized bed dryer*. Prinsip kerja mesin pengering ini adalah penghambusan udara panas oleh kipas peniup (*blower*) melalui suatu saluran ke atas bak pengering (kantong) yang menembus hamparan bahan sehingga bahan tersebut dapat bergerak dan memiliki sifat seperti fluida. Pengeringan dengan alat tersebut menggunakan suhu inlet 105°C sedangkan suhu outlet (pada alat) adalah sebesar 70°C , dan dilakukan selama kurang lebih 1.5 jam. Rosela kering dimasukkan ke kantong plastik polietilen dan ditutup rapat untuk menghindari pengaruh kelembaban dan disimpan pada suhu 4°C .

Analisis Kadar Air (AOAC, 1995)

Cawan kosong yang bersih dikeringkan dalam oven suhu $100-120^\circ\text{C}$ sekitar 15 menit, didinginkan dalam desikator (untuk cawan aluminium 10 menit dan cawan porselen 30 menit), kemudian ditimbang. Sampel rosela (segar atau kering) sebanyak 5 gram dimasukkan dalam cawan, kemudian dimasukkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 10 jam. Cawan berisi contoh diangkat kembali kemudian didinginkan dengan menggunakan desikator sebelum ditimbang kembali. Persentase kadar air (berat basah) dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B_1 - B_2}{B} \times 100\%$$

B = Berat sampel (gram)

B1 = Berat (sampel + cawan) sebelum dikeringkan (gram)

B2 = Berat (sampel + cawan) sesudah dikeringkan (gram)

Perhitungan kesetaraan rosela kering terhadap rosela segar berdasarkan konversi matematik perbedaaan kadar air rosela segar dan kering. Bentuk konversi dari perubahan kadar air tersebut adalah sebagai berikut:

$$\text{Berat Rosela kering} = \frac{\text{Berat rosela segar} \times (100 - \text{Kadar air rosela segar})}{(100 - \text{kadar air rosela kering})}$$

Analisis Sifat Kimia Rosela Kering

Rosela kering yang dihasilkan dengan dua alat pengering tersebut kemudian dianalisis karakteristik kimianya yaitu pH, total antosianin, vitamin C dan total antioksidan. Cara ekstraksi rosela kering dilakukan dengan memanaskan sejumlah rosela kering dalam volume tertentu (setara dengan 15% rosela segar) yaitu 2 g dalam 200 ml air selama 5 menit pada suhu 100°C sambil terus diaduk dan disaring.

Analisis Kadar Antosianin (Wrolstad *et al.*, 2005)

Kadar antosianin diukur dengan metode perbedaan pH, yaitu mengukur absorbansi larutan sari rosela pada pH 1 dan pH 4,5 yang diukur pada panjang gelombang 510nm dan 700nm, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Abs} = [(A_{510} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH4,5}}]$$

Konsentrasi antosianin dihitung sebagai sianidin 3-glukosida dengan koefisien ekstingsi molar 26.900 L mol⁻¹ cm⁻¹ dan berat molekul 449,2 menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi antosianin (mg L}^{-1}\text{) / ppm} = \frac{A \times \text{BM} \times \text{fp} \times 1000}{\epsilon \times L}$$

dimana:

- A = Absorbansi [(A₅₁₀-A₇₀₀)_{pH1}-(A₅₁₀-A₇₀₀)_{pH4,5}]
- BM = Berat molekul (449,2)
- fp = faktor pengenceran
- ε = koefisien ekstingsi molar (26.900)
- L = diameter kuvet (1 cm)

Sampel sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian sampel disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan dari endapannya. Endapan yang dihasilkan kemudian ditambahkan metanol sebanyak 25 ml. Kemudian sampel dikocok selama 2 jam. Setelah itu, sampel kembali disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan kembali dari endapannya pada tempat yang berbeda dengan sebelum dicampurkan metanol. Hal ini dilakukan berulang hingga filtrat tidak berwarna. Filtrat metanol dievaporasi hingga kering, kemudian dicampurkan dengan filtrat pertama.

Pengukuran antosianin sampel dilakukan dengan pembacaan sampel sebanyak 4 ml ditambahkan 1 ml buffer sodium klorida, kemudian absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 510 nm dan 700 nm pada pH 1 dan pH 4.5. Pada gelas piala lain, sampel sebanyak 4 ml ditambahkan 1 ml buffer sodium asetat kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm dan 700 nm.

Kapasitas Antioksidan (Einbond *et al.*, 2004)

Pada tabung reaksi, sebanyak 20 µl sampel dicampurkan dengan 1 ml DPPH 1 mM, kemudian ditambahkan air bebas ion hingga 5 ml. Larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam keadaan gelap. Kemudian absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm. Persen kapasitas antioksidan diukur dengan menggunakan metanol sebagai kontrol.

$$\% \text{ Kapasitas antioksidan} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Untuk melihat kesetaraannya dengan asam askorbat (vitamin C) maka persen kapasitas antioksidan sampel diplotkan kepada kurva standar kapasitas antioksidan asam askorbat. Kapasitas antioksidan dinyatakan dalam mg AEAC/100 g. AEAC adalah *ascorbic acid equivalen antioxidant capacity*.

Kadar Vitamin C Metode Titration Iod (Day dan Underwood, 2002)

Penentuan kadar vitamin C dilakukan dengan persiapan sampel sebanyak 25 ml yang ditambahkan beberapa tetes indikator kanji 1%. Kemudian titrasi dengan larutan Iod 0,01 N sampai terbentuk warna biru.

Perhitungan kadar vitamin C dilakukan berdasarkan kurva standar vitamin C per 100 gram bahan dihitung dengan:

$$\text{Vitamin C per 100 gram} = C \times fp \times \frac{100}{A}$$

Keterangan:

A = berat bahan (gram)

Fp = faktor pengenceran

C = konsentrasi vitamin C berdasarkan kurva standar

Penentuan Derajat Keasaman (pH) 10% Solution

Rosela kering sebanyak 10 gram diletakkan dalam gelas piala kering dan bersih. Kemudian ditambahkan ke dalamnya 90 ml akuades netral (pH 7.0) aduk sampai rata. Derajat keasaman diukur dengan menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi menggunakan larutan buffer phospat pH 4 dan pH 7.

Penapisan Fitokimia (Harborne, 2006)

Analisis fitokimia dilakukan pada rosela kering untuk mengetahui kandungan bahan aktif secara kualitatif. Prinsip analisis dilakukan dengan deteksi perubahan warna dan adanya endapan.

Pengolahan dan Analisis Data

Penentuan varietas rosela (merah dan ungu) dan alat pengering terpilih (*Cabinet dryer* dan *Fluidized bed dryer*) dipilih berdasarkan data secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Pengukuran nilai pH pada rosela berkisar antara 2.29-2.35 (Tabel 1), dimana pada kondisi pH ini antosianin berada dalam bentuk kation flavilium, berwarna merah dan kondisi paling stabil. Sementara bila pH rosela di atas pH 4 maka antosianin berwarna kuning, berada dalam bentuk kalkon. Perbedaan metode pengeringan tidak memberikan perubahan nilai pH yang signifikan. Nilai pH ini berkorelasi terhadap warna rosela, karena rosela akan berubah warnanya pada pH yang berubah. Salah satu karakteristik utama antosianin adalah perubahan warna yang merespon adanya perubahan pH lingkungan. Warna dan stabilitas antosianin pada larutan sangat tergantung pada pH. Antosianin paling stabil pada pH rendah

dan perlahan kehilangan warnanya seiring dengan peningkatan pH. Menurut Tsao (2010) warna antosianin tergantung pada pH, dimana berwarna merah pada kondisi asam dan biru bila kondisi basa. Beberapa faktor lain dapat mempengaruhi warna adalah derajat hidrosilasi, metilasi pada cincin aromatik dan glikosilasi gula. Antosianin adalah senyawa yang lebih stabil dalam kondisi asam dibanding dalam larutan netral atau basa (Rein, 2005). pH yang rendah berhubungan dengan kandungan asam yang ada dalam rosela diantaranya asam sitrat, asam malat (Hussein *et al.*, 2010). Selain itu, rosela mengandung asam lain yaitu asam suksinat, asam tartarat dan asam oksalat (Fasayiro *et al.*, 2005).

Antosianin merupakan pigmen yang memberikan warna merah, biru dan ungu pada tanaman. Antosianin termasuk golongan flavonoid. Menurut Christian *et al.* (2006) ada 2 jenis antosianin yang diisolasi dari ekstrak metanol pada rosela yaitu *delphinidin 3 sambubioside* dan *cyanidin 3 sambubioside*, dimana keduanya berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Kedua senyawa tersebut efektif menghambat lipid peroksidase 64% dan menghambat peroksidasi liposom sebesar 63%. Pada Tabel 1 terlihat kandungan antosianin rosela segar ungu lebih tinggi (487.18 ppm) dibandingkan dengan rosela merah (255.83 ppm). Jika dilihat dari pigmen yang dihasilkan dari sari rosela, maka sari rosela ungu jauh lebih pekat warnanya dibandingkan dengan rosela merah. Pigmen yang dihasilkan rosela ungu memberikan warna ungu kehitaman sementara rosela merah berwarna merah. Warna yang makin pekat makin tinggi antosianinnya. Menurut Hussein *et al.* (2010) semakin pekat warna merah pada rosela maka kandungan antosianinnya makin tinggi.

Tabel 1. Hasil analisis kimia sari rosela ungu dan rosela merah

Komposisi Kimia	Kondisi segar		Alat Pengeringan			
	Rosela ungu	Rosela merah	<i>Cabinet dryer</i>		<i>Fluidized bed dryer</i>	
			Rosela ungu	Rosela merah	Rosela ungu	Rosela merah
Kandungan antosianin (ppm)*	487.18 ± 27.26	255.83 ± 23.47	95.41±1.76	71.65±1.72	75.99±1.85	52.89±0.25
Kapasitas antioksidan (mg AEAC/100 g)*	580.29±15.28	253.62±15.41	91.57±2.94	46.35±2.02	108.51±1.33	39.68±1.56
Vitamin C (mg/100 g)*	18.52±0.62	21.81±0.49	1.25±0.07	1.97±0.15	1.23±0.07	1.25±0.11
pH	2.35±0.03	2.34±0.03	2.29±0.01	2.30±0.01	2.31±0.01	2.34±0.03
Kadar air (%)	84.69±0.25	85.63±0.04	2.13±0.04	2.43±0.05	2.25±0.00	2.23±0.11
Rendemen (%)			14.05±0.18	12.28±0.18	13.23±0.22	12.78±0.30

*Dihitung berdasarkan berat kering bahan

**Data dihitung dari 2 kali ulangan

Kandungan antosianin rosela kering hasil pengeringan baik dengan *cabinet dryer* maupun *fluidized bed dryer* jauh lebih rendah dari rosela segar. Proses pengeringan dapat menurunkan kandungan antosianin. Penelitian Laleh *et*

al.(2006) menunjukkan bahwa peningkatan pH, suhu, dan paparan cahaya dapat merusak molekul antosianin. Pengeringan rosela pada suhu yang makin tinggi menyebabkan penurunan kadar antosianin dan vitamin C. Penelitian Hayati *et al.* (2011) menunjukkan rosela yang dikeringkan dengan oven suhu 50°C selama 2 x 24 jam lebih tinggi kandungan antosianinnya dibandingkan dengan suhu 60°C selama 2x24 jam dan rosela yang dikeringkan dengan matahari (selama 7 hari).

Jika dibandingkan antara dua alat pengering, maka kandungan antosianin sari rosela pada rosela yang dikeringkan dengan *cabinet dryer* lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan *fluidized bed dryer*. Hal ini diduga karena pada pengeringan dengan *cabinet dryer* kelopak bunga rosela ukurannya lebih besar daripada ukuran rosela pada pengeringan dengan *fluidized bed dryer*. Ukuran yang kecil diduga juga akan menambah luas permukaan bidang kontak dengan panas yang menyebabkan laju oksidasi semakin cepat sehingga kerusakan antosianin semakin besar. Reaksi tersebut akan semakin cepat terjadi dengan peningkatan suhu, dimana suhu pada *cabinet dryer* menggunakan suhu 60°C selama 6 jam dan *fluidized bed dryer* menggunakan suhu 70°C selama 1.5 jam.

Pada Tabel 1 menunjukkan kandungan vitamin C pada dua alat pengering jauh lebih kecil dibandingkan dengan rosela segar. Vitamin C mudah rusak oleh suhu tinggi. Pada penelitian Toontom *et al.* (2012) menyatakan bahwa kandungan vitamin C dapat dipertahankan pada kondisi segar dan pengeringan dengan metode *freeze dryer* dibandingkan dengan metode oven (60°C) dan pengeringan dengan sinar matahari. Penelitian Mahanom *et al.* (1999) proses pengeringan beberapa herbal dengan metode oven suhu 50°C, 9 jam dan 70°C selama 5 jam menyebabkan penurunan kandungan fitokimia (klorofil, asam askorbat, niasin, riboflavin dan karotenoid) dibandingkan kontrol.

Jika dibandingkan antara kedua varietas rosela maka rosela merah memiliki kandungan vitamin C lebih tinggi (1.97 ±0.15 mg/100g) dibandingkan dengan rosela ungu (1.25 ±0.15 mg/100 g) (Tabel 1) pada pengeringan dengan *cabinet dryer*. Hal ini menunjukkan bahwa rosela merah mengandung vitamin C lebih tinggi namun kandungan antosianin yang lebih rendah dari rosela ungu. Penelitian yang dilakukan oleh Hussein *et al.* (2010) rosela yang derajat merahnya lebih sedikit memiliki kandungan vitamin C yang lebih tinggi.

Antioksidan merupakan zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Antioksidan juga mampu melindungi sel dari efek bahaya radikal bebas oksigen reaktif jika berkaitan dengan penyakit. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang dibandingkan terhadap vitamin C (asam askorbat). Aktivitas antioksidan rosela diukur berdasarkan kemampuannya mendonorkan atom H atau kemampuannya menangkap radikal menggunakan radikal *1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil yang memiliki elektron yang tidak berpasangan dan menunjukkan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Radikal DPPH dipilih untuk mewakili semua radikal bebas yang terdapat dalam tubuh sehingga aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan penangkapan radikal secara umum. Kemampuan aktivitas antioksidan kelopak bunga rosela disebabkan kandungan fitokimia yang dikandungnya, salah satunya adalah antosianin. Antosianin memiliki mekanisme aktivitas antioksidan seperti flavonoid umumnya. Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid sangat tergantung pada jumlah dan lokasi gugus fenolik (-OH) yang berperan untuk menetralkan radikal bebas dengan

menyumbangkan atom hidrogen. Flavonoid berperan mengurangi radikal bebas seperti radikal superoksida, peroksil, alkoksil dan hidroksil dengan menyumbangkan atom hidrogennya (Halliwell *et al*, 1995)

Antioksidan lainnya yang banyak ditemukan dalam bahan pangan adalah vitamin C dan karotenoid (Halliwell 1995). Penelitian Christian dan Jackson (2009) menyatakan bahwa peran aktivitas antioksidan pada rosela tidak hanya oleh peran antosianin saja sebagai grup fenolik namun juga kandungan vitamin C. Pada rosela putih dimana tidak memiliki antosianinnya namun kandungan vitamin C nya tinggi (86.5 mg/100g) dibanding pada rosela merah (63 mg/100 g), memiliki aktivitas antioksidan yang sama. Menurut Hussein *et al*. (2010) varietas merah (ungu dan merah) memiliki antioksidan dan aktivitas penghambat siklooksigenase yang lebih tinggi daripada rosela putih sehingga rosela varietas merah lebih potensial dalam kesehatan.

Tabel 1 menunjukkan aktivitas antioksidan rosela ungu lebih tinggi dibandingkan dengan rosela merah. Hal ini diduga dari peran antosianin rosela ungu yang jauh lebih tinggi daripada rosela merah. Namun dari dua alat pengering yang digunakan aktivitas antioksidan dengan *fluidized bed dryer* menunjukkan data aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dari *cabinet dryer* untuk rosela ungu, namun sebaliknya untuk rosela merah. Aktivitas antioksidan tidak hanya dipengaruhi oleh senyawa antosianin dan vitamin C saja, namun oleh senyawa lain yang juga berperan sebagai antioksidan. Penapisan fitokimia kedua rosela untuk melihat peran senyawa lain yang juga mendukung aktivitas antioksidan rosela yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia rosela ungu dan rosela merah

Senyawa Fitokimia	Rosela Ungu	Rosela Merah
Alkaloid	-	+
Flavonoid	+	+
Phenol hidroquinon	+	+
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	+
Tanin	+	+
Saponin	+	+

Keterangan :

Tanda (-) artinya tidak mengandung senyawa yang dimaksud

Tanda (+) artinya mengandung senyawa yang dimaksud

Hasil penapisan fitokimia pada Tabel 2 menunjukkan rosela ungu dan rosela merah memiliki kandungan fitokimia yang sama. Perbedaan terdapat pada kandungan alkaloid yang tidak terdapat (terdeteksi) pada rosela ungu. Analisa identifikasi komponen fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang berkontribusi dalam aktivitas antioksidan. Menurut Suwandi (2012) ekstrak rosela dengan etanol 70% mengandung senyawa saponin, tanin, fenolik, flavonoid, tripernoid dan glikosida. Webb (2007) menyatakan bahwa beberapa antioksidan seperti karotenoid, flavonoid, fenol, dan polifenol mempunyai kemampuan untuk menangkal radikal bebas. Senyawa flavonoid mempunyai khasiat sebagai antioksidan dengan menghambat berbagai reaksi oksidasi serta mampu bertindak

sebagai pereduksi radikal hidroksil, superoksida dan radikal peroksil (Satria, 2005). Demikian pula yang dinyatakan oleh Chalid (2003) bahwa tanaman cincau yang mengandung alkaloid, saponin dan flavonoid sangat potensial sebagai kemoprotektif dan mampu menghambat peroksidasi lipid secara nonenzimatik. Menurut Elhassan *et al.* (2014) rosela mengandung quercetin 12.96%. Alago *et al.* (2014) menyatakan kandungan fitokimia yang terdapat dalam ekstrak rosela dalam air adalah flavonoid (1.08%), saponin (1.13%), alkaloid (0.09%), tannin (0.07%), total fenol (0.05%), dan glikosida (0.05%).

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) memiliki kandungan air yang cukup tinggi sehingga mudah sekali rusak. Pengeringan dengan *cabinet dryer* maupun *fluidized bed dryer* menghasilkan penurunan kandungan antosianin, kapasitas antioksidan dan vitamin C bila dibandingkan dengan rosela segar. Pengeringan rosela dengan *cabinet dryer* lebih mampu mempertahankan kandungan antosianin bila dibandingkan dengan *fluidized bed dryer*. Rosela ungu mengandung antosianin yang lebih tinggi dibanding rosela merah namun kandungan vitamin C yang lebih sedikit rendah dibanding rosela merah. Kandungan antosianin dan vitamin C merupakan senyawa antioksidan yang mempunyai peran penting untuk menangkap radikal bebas penyebab penyakit degeneratif. Rosela ungu memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan rosela merah. Namun dari data aktivitas antioksidan rosela ungu menunjukkan pengeringan dengan alat *fluidized bed dryer* lebih baik dari *cabinet dryer* dan sebaliknya terjadi pada rosela merah. Hasil penapisan fitokimia dua jenis rosela menunjukkan adanya kandungan flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin yang relatif sama.

Saran

Untuk membandingkan antara kedua jenis alat pengering sebaiknya ukuran bahan yang akan dikeringkan harus sama. Selain itu perlu ditentukan variasi suhu dan waktu yang tidak berbeda jauh sehingga dapat ditentukan secara tepat alat pengering yang dapat meminimalkan kehilangan zat aktif akibat proses pengeringan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, melalui Proyek Hibah Bersaing tahun 2012.

Daftar Pustaka

Adegunloye BJ, Omoniyi JO, Owolabi OA, Ajagbonna OP, Sofola OA, dan Coker HA. 1996. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *Afr J Med Sci.* 25(3): 235-238.

- Ashaye OA. 2013. Studies on moisture sorption isotherm and nutritional properties of dried Roselle calyces. *International Food Res J.* 20(1): 509-513.
- Alago TO, Edema MO, Atayese AO, dan Bankole MO. 2014. Phytochemical and in vitro anti bacterial properties of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (roselle) juice. *JMedPlant Res* 8(6):339-344
- AOAC, 1995. Official Methods of Analysis of The Association of Analytical Chemists, Washington D.C.: AOAC.
- Bauman I, Bobi Z, Dakovi CZ, dan Ukrainczyk M. 2005. Time and speed of fruit drying on batch fluid-beds. *Sadhana.* 30(5):687–698.
- Christian KR, Nair MG, dan Jackson JC. 2006. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *J Food Compos Anal* 19 : 778-783
- Christian KR dan Jackson JC. 2009. Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *J Food Compos Anal* 22 : 663-667
- Chalid SY. 2003. Pengaruh sari daun cincau hijau *Cyclea barbata* L. Miers dan *Premna oblongifolia* Merr terhadap aktivitas enzim antioksidan dan pertanaman tumor kelenjar susu mencit C3H. [Tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
- Day RA. dan Underwood A. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Terjemahan. Edisi Keenam. Jakarta: Erlangga.
- Einbond L, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, dan Kennely EJ. 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem* 84: 23-28.
- Elhassan EHAR, Ahmmed EM, dan Sirag N. 2014. Standardization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) calyx cultivated in Sudan. *J MedPlants Res* 8(4):217-222
- Faraji M dan Tarkhari A. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *J Ethnopharmacol* 65(3): 231-236.
- Fasayiro SB, Ashaye OA, Adeola, dan Samuel FO. 2005. Chemical and storability of fruit flavoured (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) drinks. *World J of Agric Sci* 1(2):165-168.
- Halliwell B, Aeshbach R, Lolinggen J, dan Auroma OL. 1995. Toxicology. *J Food Chem.* 33:601
- Harborne JB. 2006. *Metode Fitokimia*. Terjemahan. Bandung : ITB.
- Hayati R, Nurhayati N, dan Annisa. 2011. Pengaruh suhu pengeringan terhadap mutu rosela kering (*Hibiscus sabdariffa*). *J Floratek* 6:1-7.
- Hussein RM, Shahein YE, El Hakim AE, dan Awad HM. 2010. Biochemical and molecular characterization in three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J of Am Sci* 6:11
- Khosravi M, Jalali K, Afkhami AM, dan Fatehi F. 2009. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II Diabetes. *J Altern Compliment Med* 15(8):899-903.
- Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jameei R, dan Zare S. 2006. The Effect of light, temperature, pH, and species on stability of anthocyanin pigment in four berries Species. *Pakistan J Nutrition* 5 (1): 90-92.
- Lie BJ. 2009. Effect of sun drying and oven drying on quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.). [Tesis]. Malaysia : Universiti Malaysia Sabah.

- Mahanom, Azizah AH, dan Dzulkifly MH. 1999. Effect of different drying methods on concentrations of several phytochemicals in herbal preparation of 8 medicinal plants leaves. *Mal J Nutr*.5:47-54
- McKay DL, Oliver C, Edward S, dan Jeffrey BB. 2010. *Hibiscus sabdariffa* Linn. tea (Tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *J Nutr* 140(2): 298-303.
- OkokoT dan Ibiba FO. 2008. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri* 20(2):47-52
- Ozela E F, Stringheta PC, dan Chauca M C. 2007. Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. *Cien Inv Agr* 34(2):115-120.
- Onyenekwe PC, Anjani EO, Ameh DA, dan Gamaniel KS. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in wistar Rats. *Cell Biochem Funct* 17(3): 199-206.
- Reanmongkol W dan Itharat A. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L.in experimental animals. *Songklanakarinn J Sci Technol* 29(1) : 29-38.
- Rein M. 2005. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. [Disertasi]. Finlandia:Universitas Helsinki.
- Rice-Evans C, Miller NJ dan Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. (2): 152–159.
- Satria E. 2005. Potensi antioksidan dari daging buah muda dan daging buah tua mahkota dewa *Phaleria macrocarpa* (Scheff.). [Skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Suwandi T. 2012. Pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap streptococcus sanguinis penginduksi gingivitis menuju obat herbal terstandar. [Disertasi]. Jakarta:Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.
- Toontom N, Meenune M, Posri W, dan Lertsiri. 2012. Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavor characteristics of dried chili. *International Food Res J* 19(3):1023-1031
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of distarylpolyphenol. *Nutrients*. 2:1231-1246.
- Tseng TH, Wang CJ, Kao ES, dan Chu HY. 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact* 101(2): 137-148.
- Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin Wu HW, dan Wang CJ. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *J. of Food Chem Toxicol*. 35(12): 1159-1164.
- Wrolstad R E, Durst R W, dan Lee J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Sci and Tech* 16: 423–428.
- Webb G P. 2007. Dietary Supplements and Functional Foods. Oxford: Blackwell Publishing Ltd

4 THE EFFECT OF ROSELLE EXTRACT (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) ON BLOOD GLUCOSE LEVEL AND TOTAL ANTIOXIDANT LEVEL ON DIABETIC RAT INDUCED BY STREPTOZOTOCIN*

Abstract

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) contains phenolic compounds, especially anthocyanins which act as antioxidants. The purposes of this study were to examine the antioxidant capacity and capability of purple roselle extract as an antidiabetics in diabetic rats induced by streptozotocin (STZ). A total of 24 male rats was used in this study. The rats were divided into six groups including group of normal rats as standard group (SG), diabetic rats given distilled water (DiW), diabetic rats given roselle extract 72 mg/day/200 g bw (DiR1), diabetic rats given roselle extract 288 mg/day/200 g bw (DiR2), preventive rats (PR1) which were rats given roselle extract 72 mg/day/200 g bw for 11 days then injected with STZ and continued with roselle extract 72 mg/day/200 g bw until the 21th day, and the last group was glibenclamide rats (DiG), were diabetic rats given glibenclamide 0.09 mg/day/200g bw. Roselle extract was given orally administered 2ml/day/rat for 21 days. Results showed that blood sugar of DiR2, DiG and PR1 rat groups tended to decrease. Total antioxidant capacity (TAC) in DiR1 (0.2655 ± 0.0016 mM) was same with others group (DiR2, PR1, DiG). Negative control rats (DiW) had the lowest total antioxidant capacity (0.0893 ± 0.0134 mM). The content of malonaldehyde (MDA) of liver not significant ($P > 0.05$) but MDA of kidney was significant ($P < 0.05$), that DiR1, PR1, DiG, DiR2 was lower than in DiW. Insulin content analysis showed that DiR1 had the highest insulin levels (0.4433 ± 0.1802 ng/ml) and differ significantly with DiW. Meanwhile groups of negative control rats (DiW) had the lowest insulin levels (0.1286 ± 0.0337 ng/ml). It was concluded that roselle extract had the ability to lower blood sugar (both curative and preventive), increase of antioxidant capacity, and improve insulin production.

Keywords : *Roselle, blood glucose, total antioxidant capacity, streptozotocin*

Introduction

Diabetes Melitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia associated with abnormalities in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins and caused by a decrease in insulin secretion or insulin sensitivity, or both. The diseases may cause microvascular and macrovascular complications (Sukandar *et al.*, 2008; Giacco and Brownlee, 2010). Diabetes melitus is classified into two types, insulin dependent diabetes melitus (IDDM, Type 1) and non-insulin-dependent diabetes melitus (NIDDM, Type 2).

* makalah telah dikirim ke Journal of Functional Foods

Type I diabetes is an autoimmune disease characterized by a local inflammatory reaction in and around islets that is followed by selective destruction of insulin-secreting β cells. Type II diabetes is characterized by peripheral insulin resistance and impaired insulin secretion (Delli *et al.*, 2010).

Hyperglycemic conditions can result in the formation of reactive oxygen species (ROS). Excessive ROS can cause oxidative stress and exacerbate damage to the β cells (Robertson *et al.*, 2003; Pazdro and John, 2010). ROS can also decrease the intracellular antioxidant (Vincent *et al.*, 2004). Hyperglycemia can lead to increased lipid peroxidation, superoxide production, lipoprotein glycation, oxidative DNA damage, platelet aggregation and activation, and a decreased production of prostacyclin (Cser *et al.*, 1999). Lipid peroxidation results in malonaldehyde (MDA), acrolein, and 4-hydroxynonenal (4-HNE) commonly used as biomarkers to assess lipid peroxidation of biological oxidative stress. MDA is formed after radical compounds attack membrane lipids containing polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Kohen and Nysta, 2002; Skrydlewska *et al.*, 2005; Devasagayam *et al.*, 2003).

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) has been believed for many years to be able to reduce the risk of degenerative diseases. Several studies have shown that roselle was effective in lowering blood pressure (Onynekwe *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2004; Faraji and Tarkhari, 1999; Adegunloye *et al.*, 1996; McKay *et al.*, 2010), had an antioxidant function protecting the liver from a damage (Tseng *et al.*, 1996; Tseng *et al.*, 1997; Elsaadany *et al.*, 1991; Dahiru *et al.*, 2003), increased the antioxidant enzymes in the liver (Okoko and Ibiba, 2002), was anti-inflammatory and analgesic (Reanmongkol and Itharat, 2007), and was found to lower uric acid (Kirdpon *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 2012). Roselle has high antioxidant content. The highest components in roselle are anthocyanins, a flavonoid group. Anthocyanins found in roselle are delphinidin-3-sambubioside, cyanidin-3-sambubioside, and delphinidin-3-glucose (Christian *et al.*, 2006). Beside anthocyanins, it also contains alkaloids, L-ascorbic acid, anisaldehyde, β -carotene, β -sitosterol, citric acid, galactose, gossypetin, hibiscetin, and mucopolysaccharides (Hirunpanich *et al.*, 2005).

ROS or free radicals can be neutralized and destroyed by antioxidants present in the body so that the biological damage by these compounds can be avoided (Vincent *et al.*, 2004). The purpose of the research was to evaluate whether roselle would increase the antioxidants in the body, reduce oxidative stress and improve insulin production in diabetic rats induced by streptozotocin.

Materials and Methods

Roselle Extraction

Petals of purple roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) were obtained from Leuwiliang plantation, Bogor, West Java. Fresh roselle was dried using oven with a temperature of 60°C for 6 hours. Dried roselle were then boiled with water for 10 minutes at a concentration of 2g/200 ml. Roselle extract was concentrated 10 ml by vacuum evaporator and stored at 4°C.

Experimental Animals

All animal experimental protocol used in this study was approved by Health Development and Research Committee, Health Ministry, Republic of Indonesia with ethical clearance No.LB.02.01/5.2/KE.446/2013. Male Sprague Dawley (SD) rats (200 ±30 g), 8 weeks old, used in the studies were purchased from BPPOM (National agency for drug and food control), Jakarta. All animals were housed in laboratory conditions for one week before experiments began. Rats were allowed free access to drinking water (*ad libitum*) and were maintained at a constant temperature of 24-26°C and 50–60% relative humidity conditions. Before the experiment, rats were adapted to the laboratory diet (modified of AIN-93M, Reeves, 1997) for 7 days.

Diabetes Induction

Diabetic condition of rats was induced experimentally by intraperitoneal injection of freshly prepared streptozotocin (STZ)(Sigma,USA) solution at a dose of 30-35 mg/kg body weight in 0.1M cold citrate buffer, pH 4.5 (Gayatri and Kanabiran, 2009). Blood was collected from the tail vein after 72 h and glucose levels were determined using glucometer test kit. Animals were considered diabetic if the testing blood glucose values were always above 200 mg/dl. If blood glucose levels did not reach >200mg/dl, then rats were re-injected with the same dose of streptozotocin. Control rats received citrate buffer (pH 4.5) alone.

Experimental Design

Rats were randomly divided into six groups, (four rats per group). In group one (SG): the rats were not induced by STZ, and were given drinking water only. In group two (DiG) diabetic rats were given glibenklamide 0.09 mg/day/200 g bw; In group three (DiW) diabetic rats were given drink water only. In group four (PR1) rats were treated with roselle extract 2 ml/day (for 2 ml contains 72 mg/day/200 g bw) for 10 days prior to injection with STZ, and then treated with roselle extract until 21th day. In group five (DiR1), diabetic rats were treated with roselle extract (72 mg/day/200g bw). In group six (DiR2) diabetic rats were treated with roselle extract 2 ml/day (for 2 ml contains 288 mg/day/200g bw). The roselle extract was administered 2 ml/day by orally. Feed was given approximately 25 g/rat/day. During treatment period glucose levels were measured 2 to 3 times in all groups of treated rats.

At the end of the treatment period, all rats were anaesthetized with ether and the body was cleaned by alcohol. Further, the peritoneal was opened, and blood sampling by using the syring. Blood of rats from each group was collected and centrifuged at 1870 g for 15 min at 4°C. Rat body organs were washed in a PBS (phosphate buffered saline) solution, drained, and weighed. The organs were then wrapped in aluminum foil and stored in a freezer at -20°C (Girgis *et al.* 2010).

Analysis of Samples

Analysis of blood glucose was done by using an Accucheck glucometer (Roche, Germany). Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method (Antioxidant assay kit CSO790, Sigma Aldrich, USA) was applied. The method is based on the formation of the ABTS•+ cation [2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] and its scavenging by antioxidant sample constituents (plasma) measured by spectrophotometry. Decay of green/blue chromophore absorbance is inversely associated with antioxidant content and the control antioxidant is Trolox, a hydrophilic vitamin E analog.

Insulin assay was transformed in a commercial kit (Biorbyt ORB54820, USA) using sample of rat blood plasma. This assay is a two site ELISA. The microplate is precoated with a monoclonal antibody against insulin. Standard and samples are added into the wells and co-incubated with a monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) enzyme. After washing step to remove any unbound substances, TMB substrate is added and colour develops in proportion to the amount of insulin bound initially.

Analysis of malonaldehyde (MDA) was done on rat liver and rat kidney. MDA measurements was carried out following the procedures of Singh *et al.* (2002). A total of 0.5 ml of liver supernatant plus 2.0 ml of cold HCl (0.25 N) containing 15% TCA, TBA 0:38% and 0.5% BHT. The mixture was heated at 80°C for 1 hour. Once cool, the mixture was centrifuged at 822g (3500 rpm) for 10 minutes. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. As the standard solution, a TEP (tetraetoksipropana) was used.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed in Mean \pm STD. Analyses of data using ANOVA.

Results

Diabetes was characterized by increased levels of blood glucose. The blood glucose data derived from the calculation of average blood sugar level on 4 rats during the treatment period were shown in Figure 1. In Figure 1, day 7th was the induction day with STZ and after 2-3 days rats were hyperglycemic indicated by an increase of blood glucose >200 mg/dl. Treatments with roselle were given after the rats showed some hyperglycemia symptoms including high diuretic, skin turgor, high feed intake, lost body weight. Figure 1 also showed that rats given roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1) had a decrease of blood glucose level on day 14th, but increased again until the end of the treatment period. Meanwhile rats given roselle extract 288 mg/day/200g bw (DiR2) had a decrease of blood glucose level from day 14th until the end of the treatment period. Negative control rats (DiW) had decreased of blood glucose level on days 7th and 14th, but the blood glucose level increased again until the end of the treatment period. Rats fed glibenclamide drug (DiG) had a decreased of blood glucose level on days

14th. However this blood glucose level was found to increase on day 21th and decrease again in the end of the treatment period.

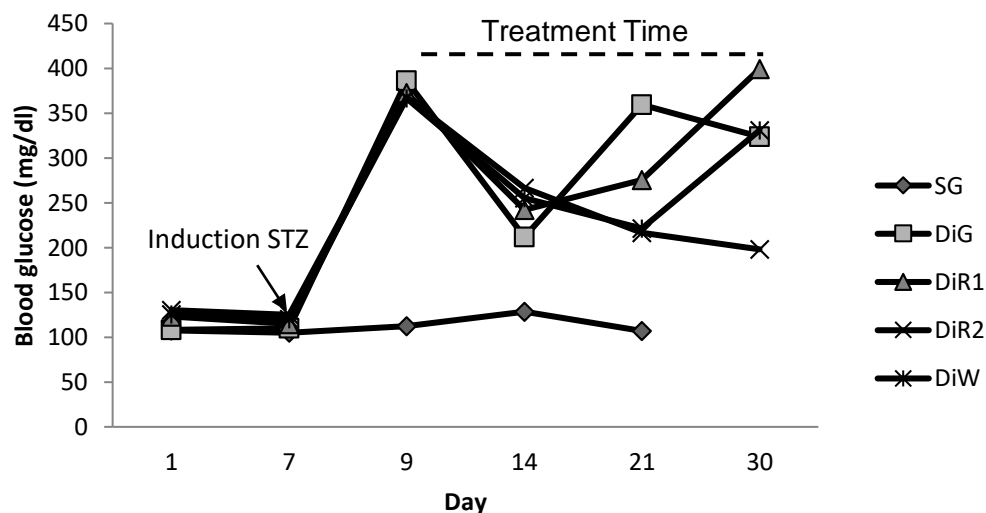


Figure 1. Average of blood glucose of treated rats (day 1 first level of blood glucose ; day 7, STZ induction, the 9th-21th day treatment time with roselle (DiR1,DiR2); with glibenclamide (DiG); control (SG) and negative (DiW).

Figure 2 showed blood glucose of PR1 rats that were induced with STZ after the rats were given roselle extract 72 mg/day/200g bw for 10 days. The rats had hyperglycemia 2 to 3 days after. Once the conditions of hyperglycemia (blood glucose > 200 mg/dl) were obtained, the rats were given roselle again until days 21st. These rats were found to suffer from hyperglycemia from day 13th until day 18th and after that blood glucose decrease until the end of the experiment.

Symptoms of diabetes among other things are a lot of eating, lots of drinking accompanied by loss of weight. These symptoms are seen in Figure 3 and Figure 4. It was shown in Figure 3 that the average feed consumption of diabetic-induced rats in DiW, DiG, DiR1, DiR2 were higher than that of normal rats (SG). In preventive rats (PR1), the average feed consumption before the rats became diabetic was lower than that of normal rats (SG). However after having diabetes their average feed consumption increased to a level above that of normal rats (SG).

Figure 4 describes the changes in body weight, where the negative control rats (DiW) lost weight during the treatment period. Rats in normal group (SG) tended to gain weight. Preventive rats (PR1) initially gained weight, but after being induced with STZ they lost weight showing a diabetes condition. Meanwhile body weight of rats in the other groups (DiR1, DiR2, DiG) was relatively constant.

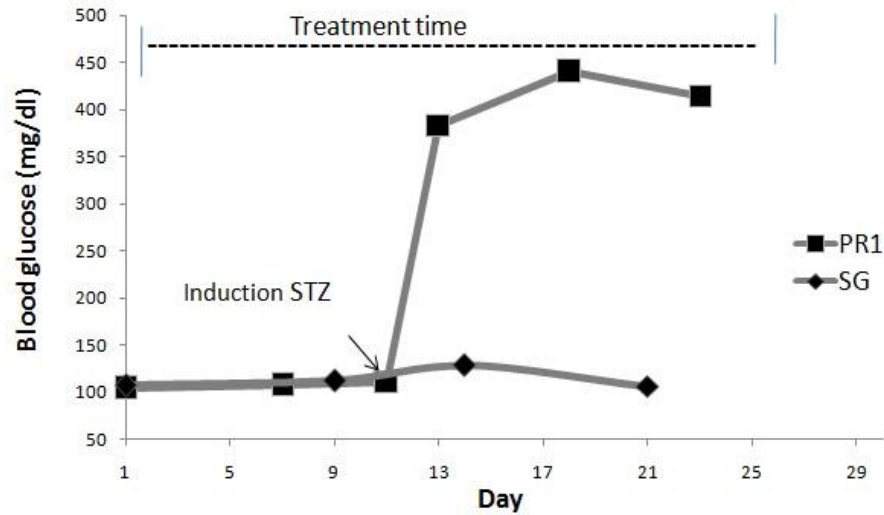


Figure 2. Average blood glucose of rats (PR1), given roselle extract 72 mg/day/200g bw for 10 days,. Day 11th was the induction time with STZ. After 3 days rats had hyperglycemia and were continued to receive roselle until day 21.

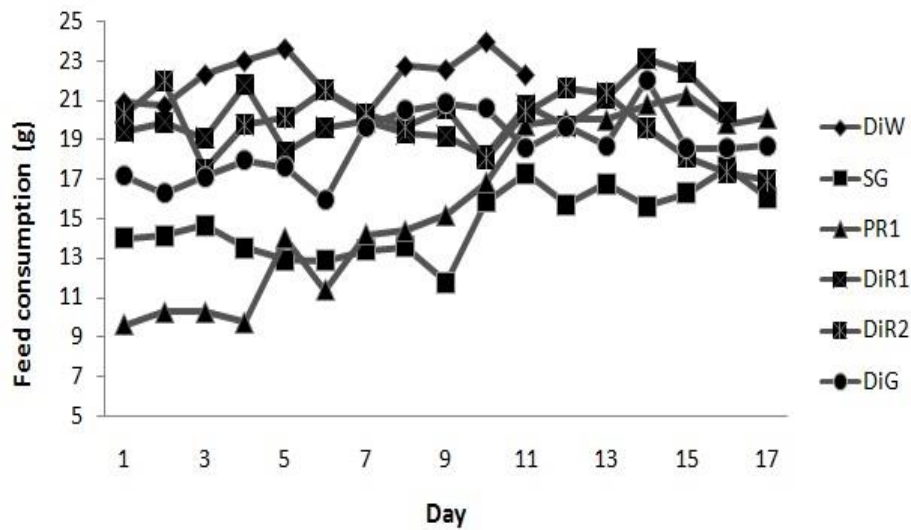


Figure 3. Feed consumption of treatment rats (control (SG); glibenclamide (DiG) roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1); roselle extract 288 mg/day/200g bw (DiR2); preventive (PR1); negative (DiW)

The effect roselle extract on total antioxidant capacity (TAC), insulin and malonaldehyde (kidney) had expressed on Table 1 significant difference ($p < 0.05$) was found in different groups, except malonaldehyde in liver. Table 1 showed that rats treated roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1), DiR2, PR1 and DiG were not differ significantly but differ significantly with DiW. Rats in the negative group (DiW) had the lowest total antioxidant capacity.

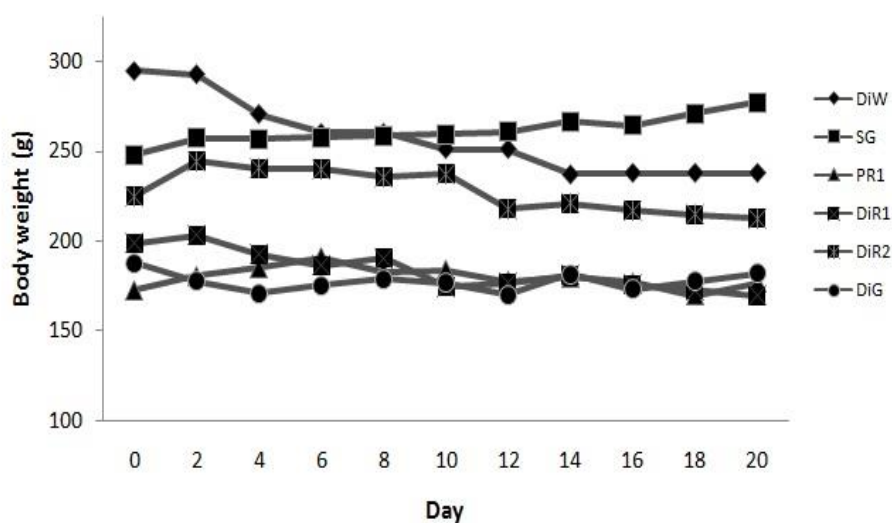


Figure 4. Changes of rat body weight (control (SG); glibenclamide (DiG); roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1); roselle extract 288mg/day/200g bw (DiR2); preventive (PR1); negative (DiW).

MDA which is a marker of oxidative stress was found to be markedly different (Table 1). Data showed that rats in the negative control (DiW) had MDA levels (kidney) higher than those of other groups (PR1, DiG, DiR1, DiR2). Meanwhile, in MDA of liver, data were not significantly different ($P > 0.05$). Results of insulin analysis showed that the group of rats treated with roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1) had the highest blood insulin content. Rats in DiR2, PR1 and DiG groups were found to have relatively similar insulin content. Meanwhile, rats in the negative (DiW) group had the lowest insulin levels.

Table 1. Average content of insulin and total antioxidant capacity in blood plasma and malonaldehyde in rat liver and rat kidney

Treatment***	Insulin (ng/ml)	MDA (nmol/g)*		TAC (mM)**
		Liver	Kidney	
SG	0.1968 ± 0.0486 ^{ab}	1.0966 ± 0.2351 ^a	4.6611 ± 0.4151 ^b	0.1659 ± 0.0192 ^{ab}
DiW	0.1286 ± 0.0337 ^a	1.3666 ± 0.1978 ^a	5.1952 ± 0.3789 ^b	0.0893 ± 0.0134 ^a
PR1	0.3516 ± 0.1528 ^{ab}	1.2907 ± 0.1698 ^a	3.8166 ± 0.5866 ^a	0.2318 ± 0.0038 ^{bc}
DiR1	0.4433 ± 0.1802 ^b	1.0954 ± 0.4282 ^a	3.5558 ± 0.1190 ^a	0.2655 ± 0.0016 ^c
DiR2	0.2918 ± 0.1083 ^{ab}	1.1865 ± 0.4728 ^a	3.6188 ± 0.1936 ^a	0.1868 ± 0.0962 ^{bc}
DiG	0.3504 ± 0.1853 ^{ab}	1.1444 ± 0.3718 ^a	3.8348 ± 0.1146 ^a	0.2109 ± 0.0055 ^{bc}

Values (Mean ± SE) with different superscripts in a row differ significantly ($P < 0.05$)

*MDA (malonaldehyde)

**TAC (Total Antioxidant Capacity)

***control normal (SG); negative (DiW); roselle 72 mg/day/200g bw (DiR1); roselle 288 mg/day/200g bw (DiR2); preventive rats (PR1); glibenclamide (DiG).

Discussion

Streptozotocin (STZ) is a chemical used to induce diabetes in experimental animals. This compound provides acute cytotoxic effects on cells and molecules, especially against pancreatic β cell. Damaged pancreatic β cells lead to reduced insulin and causes hyperglycemia (Gayathri and Kannabiran, 2009; Kim *et al.*, 2006; Szkudelski, 2001). STZ generates free radicals such as superoxide radical O_2^- , H_2O_2 and OH^- including nitric oxide which causes DNA damage (Szkudelski, 2001). Hydroxyl group (OH^-) is a very strong oxidizing compounds that can react with DNA, proteins, lipids, amino acids and glucose (Kohen and Nysta, 2002). DNA damage causes the β cells of the pancreas unable to produce insulin so that blood glucose increases (hyperglycemia). According to Robertson *et al.* (2003) hyperglycemic conditions may result in the formation of ROS (reactive oxygen species) such as O_2^- and peroxide (Vincent *et al.*, 2004). The formation of free radicals is stimulated by H_2O_2 in pancreatic β cells (Gayathri and Kanabiran, 2009). Excessive ROS can cause oxidative stress and can exacerbate damage to pancreatic β cells. Oxidative stress can decrease the number of insulin-producing β cells in the pancreas (Szkudelski, 2001). In STZ-induced diabetic rats, diabetes develops as a result of irreversible pancreatic β -cell destruction leading to degranulation and reduced insulin secretion. In Figure 1 and Figure 2 all rats injected with streptozotocin (PR1, DiG, DiW, DiR1, DiR2) experienced hyperglycemia characterized by increased levels of blood sugar (> 200 mg/dl).

Figure 1 showed that negative control rats (DiW) had a lost body weight and a decrease blood glucose level after being induced with streptozotocin 30-35 mg / kg body weight. This might be due to the notion that pancreas cells could still produce insulin before they were damaged. According to Arora *et al.* (2009) administration of STZ in low concentration had the tendency to make insulin secreted from pancreas cells and the remaining cells escaping from the attack of STZ might cause an over secretion of insulin to maintain normoglycemia. Similar notion was expressed by Graham *et al.* (2011) stating that administration of low doses of STZ would still allow pancreatic cells to produce insulin.

Figure 1 showed that the levels of blood glucose in rats of DiR2 group decreased indicating that roselle was capable of lowering blood glucose level in diabetic rats induced by STZ. Decreased levels of glucose showed an improvement in the number of β cells producing insulin in pancreatic cells. Rats treated with glibenclamide drug as a positive control in this study also showed a decrease in blood sugar levels. According to Valverde *et al.* (2012) glibenclamide has the same mechanism in lowering blood sugar through the mechanism of stimulation of insulin secretion. In addition, glibenclamide prevents glucagon secretion. It was shown in Figure 2, that in preventive (PR1) group had high blood glucose levels after being induced with streptozotocin. However, the pancreatic β cells of these rats seemed to get repaired so that they were capable of producing insulin, as indicated by decreased blood glucose levels at the end of the treatment period. The presence of insulin (Table 1) showed the restoration of pancreatic cells after being damaged by streptozotocin. In rats with restored cell function, the proportion of insulin-positive cells in the islets was increased (Yin *et*

al., 2006). Rats given roselle extract 72 mg/day/200g bw (DiR1) had the highest insulin levels among rats of the other groups. However, as can be seen in Figure 1, there was no correlation between the amount of serum insulin and the lowering blood glucose levels. This indicates that there is a occurrence of a symptom of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus in rats of that group. According to Arora *et al.* (2009), in rats administered with STZ, non-fasting serum glucose level continued to increase gradually after STZ administration without affecting the non-fasting serum insulin levels. In addition, they were shown to produce type 2 or non-diabetes insulin dependent diabetes mellitus. It was stated further that (Suhariningsih *et al.* 2009 and Syamsul *et al.* 2011) insulin resistance occurred as a result of damages in insulin receptors which was related to the existence of free radicals.

The hallmark of diabetes mellitus is polyuria-excessive urine production, polydipsia-excessive thirst and polyphagia-excessive eating, dehydration, lost of weight, no balancing of electrolyte, and ketoacidosis (Cser *et al.*,1999; Akbarzadeh *et al.*,. 2007; Graham *et al.*, 2011). The measurement of skin turgor and observation of cage bedding for urine output acted as a surrogate marker of thirst (Graham *et al.*, 2011). In Figure 4 body weight of rats in negative control groups (DiW) decreased quite a lot while that body weight of the rats in the normal group (SG) tended to increased. In their studies AlKushi (2013) and Al Assaf (2012) obtained similar results in that STZ induced rats had body weight loss while normal rats had increased body weight during the treatment period. In diabetic condition, the body will take energy from the adipose cells because body cells have trouble getting energy from sugar due to insulin resistance (Vella and Rizza, 2010). This leads to decreased body weight due to the degradation of fat cells (lipolysis). The decrease in body weight in diabetic rats may indicate loss or degradation of structural proteins, which have been reported to contribute to body weight (Erejuwa *et al.*, 2010). Results of a study by Yin *et al.* (2006) indicated that compared to those in normal control, rats administered with streptozotocin experienced a reduction in the proportion of insulin positive cells and an increase in glucagon positive cells. Glucagon induce lipolysis and glukoneogenesis.

The average body weight of rats in DiG group was relatively constant. Similar results in rats treated with glibenclamide group were also expressed by Erejuwa *et al.* (2010) who found that glibenclamide did not give any change in body weight of STZ diabetic induced rats. Polyphagia conditions can be seen in Figure 3 where rats in the negative control group (DiW) consumed feed most but had decreased body weights (Figure 4).

In diabetic condition oxidative stres may occur as indicated by higher amount of prooxidants than antioxidants. MDA is a highly reactive compound that is the end product of lipid peroxidation, and is usually used as a biomarker to assess lipid peroxidation of biological oxidative stres. The level of lipid peroxidation can be suppressed by the presence of antioxidants. In diabetes, protein oxidation (protein carbonylation) and lipid peroxidation (MDA) also increase (Pazdro and Burgess, 2010; Cser *et al.*, 1999; Gayathri and Kannabiran, 2009; Alassaf, 2012). In this study, malonaldehyde of negative control (DiW) rats had higher MDA kidney than did rats of the other groups. Malonaldehyde kidney from DiR1, DiR2, PR1 and DiG was lower than that from DiW. It was indicated that roselle was able to reduce the amount of lipid peroxidation by free radicals in

as shown by the results which were almost the same as the one of the positive control group (SG). Tseng *et al.* (1996) found that roselle contained hibiscus protocatechuic acid (PCA), a simple phenolic compound capable of functioning as an antioxidant at a concentration of 0.05 mg/ml and 0.10 mg/ml. PCA is able to decrease lactate dehydrogenase and alanine transaminase and decrease the formation of malonaldehyde. Likewise, Kelvin (2012) found that roselle extract in water was able to protect the body from harm of oxidized LDL with CuSO₄ induced by the inhibition of the formation of conjugated diene and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) with a concentration of 5 mg/ml and was more effective than vitamin with 100 IU vitamin E used as a standard. Reducing lipid peroxidation is particularly important to indicate lower levels of oxidative stress (Pazdro and Burgess, 2010).

Total antioxidant capacity shows overall amount of antioxidants in the body. The advantage of this test is that it measures all antioxidant, not just in a bioactive component (Kusano and Ferrari, 2008). In this study, it was shown that total antioxidant capacity (TAC) in DiR1, DiR2, DiG, PR1 was higher than that in DiW group. This showed that rats fed roselle could increase total antioxidant capacity. According to Vincent *et al.* (2004) hyperglycemic conditions can lower total plasma antioxidant capacity in patients with and without diabetes. STZ induced diabetic rats have decreased antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase which would lower the total antioxidant in the body (Judiono *et al.*, 2012; Alassaf, 2012). Anthocyanin pigments contained in the roselle drink can reduce oxidative stress due to an increased number of free radicals in the body of diabetic rats. Anthocyanins can provide electrons or H atoms to free radicals so that these compounds can be stable and free-radical chain reactions can be stopped (Tsao, 2010). In addition, roselle has other compounds such as quercetin, ascorbic acid, and protocatechuic acid (PCA) that function as antioxidants (Hirunpanich, 2005). Vitamin C plays a role as scavenger, and has an ability to donate electrons to ROS to make it stable (Kohen and Nysta 2002). Alago *et al.* (2014) states that phytochemical contents in roselle extract in water are flavonoids (1.08%), saponins (1.13%), alkaloids (12.09%), tannins (12.07%), total phenols (0.05%), and glycosides (0.05%). Roselle is able to increase glutathione peroxidase and catalase in liver of treated rats compared with that in control mice (Okoko and Ibiba, 2008). These enzymes are able to play a role in improving pancreas cells in diabetic rats (Erejuwa *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2011) as well as in rats suffering from complications such as neuropathy due to diabetes (Vincent *et al.*, 2004). Pazdro and Burgess (2010) found that in diabetic rats, treatment with antioxidants reduces signs of oxidative damage in the pancreas. Mechanisms which can be described in this study is that roselle has some amount of antioxidant that can donate H⁺ ions and function as a metal chelator (containing polyphenols) that can bind Fe²⁺. Through these functions, antioxidant can indirectly lower the Fenton reaction and prevents oxidation caused by increased hydroxyl radicals. Polyphenols can also induce the body's antioxidant enzymes (SOD, catalase) which is able to decompose hydrogen peroxide, H₂O₂ and superoxide anion and inhibits the expression of the enzyme xanthine oxidase (Tsao, 2010). In this study treatment with roselle extract increased total antioxidant capacity, reduced MDA as a marker of oxidative stress and increased insulin as an evident of damage repair in pancreas.

Conclusion

Hyperglycemia causes a condition in which the body produces free radicals that can damage cells and cause a reduction in pancreatic insulin. The role of antioxidants in roselle could reduce the amount of free radicals formed. This was indicated by the finding that pancreatic β cells were able to repair and produce insulin in amount which was higher than in negative control rats. Roselle extract could increase the antioxidant capacity of the body to protect the body from damages caused by hyperglycemia. Roselle extract could decrease malonaldehyde in kidney as marker oxidative stress. The results of this study showed that rats induced with STZ of 30-35 mg / kg had damaged pancreatic cells, but these cells could still be repaired as indicated by the ability of the cells to produce insulin.

Acknowledgement

The authors are thankful to Ministry of Education and Culture for the financial support of this project (BPPS) and to PT. Garuda Food for providing TAC kits.

References

- Adegunloye, B.J., Omoniyi, J.O., Owolabi, O.A., Ajagbonna, O.P., Sofola, O.A and Coker, H.A. 1996. Mechanisms of the blood pressure lowering effect of the calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* in rats. *Afr. J. Med. Sci.*, 25(3): 235-238.
- Akbarzadeh, A., Norouziyan, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S.H., Farhangi, A., Verdi, A.A., Mofidian S.M.A. and Lame Rad, B. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (2) :60-64.
- Alago, T.O., Edema, M.O., Atayese, A.O., and Bankole, M.O. 2014. Phytochemical and in vitro anti bacterial properties of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (roselle) juice. *J. Med. Plant Res.*, 8(6):339-344.
- AlAssaf, A.H. 2012. Antihyperglycemic and antioxidant effect of ginger extract on streptozotocin-diabetic rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11 (12): 1107-1112.
- AlKushi A.G. 2013. Biochemical and ultrastructure changes in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12 (4): 313-321.
- Arora, S., Ojha, S.K. and Vohora, D. 2009. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in Swiss albino mice. *Global Journal of Pharmacology*, 3 (2): 81-84.
- Bhowmilk, A., Khan, L.A., Akhter, M. and Rokeya, B. 2009. Studies on the antidiabetic effects of mangifera indica stem-barks and leaves on nondiabetic, type 1 and type 2 diabetic model rats. *Bangladesh J Pharmacol*, 4: 110-114.
- Christian, K.R., Nair, M.G., and Jackson, J.C. 2006. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). *J Food Compos Anal.*, 19:778-783.

- Cser, M.A., Sziklai, L., Mauriceand, F.L. and Ingrid, L. 1999. Antioxidant Status of Insulin Dependent Diabetics, In: Kumpulainen, J.T. and Salonen, J.T. (editors), *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition*. The Royal Society of Chemistry, Finland.
- Dahiru, D., Obiand, O.J., and Umaru, H. 2003. Effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on carbon tetrachloride induced liver damage. *Biokemistri*, 15 (1): 27-33.
- Delli, A.J., Larsson, H.E., Ivarsson, S.A. and Lernmark, A. 2010. Type I Diabetes, In: Holt, R.I.G., Cokram, C., Flyvbjerg, A., Goldstein, B.J. (editors), *Textbook of Diabetes*. 4th edition. A John Wiley & Sons Ltd Publ, UK.
- Devasagayam, T.P.A., Boloor, K.K. and Ramasarma, T. 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40:300-308.
- ElHassan E.H.A.R, Ahmmed, E.M. and Sirag, N. 2014. Standardization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) calyx cultivated in Sudan. *J.Med.Plants Res.*, 8(4):217-222.
- El-Saadany, S.S., Sitohy, M.Z., Labib, S.M. and El-Massry, R.A. 1991. Biochemical dynamics and hypocholesterolemic action of *Hibiscus sabdariffa* (Karkade). *Entrez Pub. Med. Nahrung*, 35(6): 567-576.
- Erejuwa O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S.A., Sirajudeen, K.N.S., Salzihan, M.D., Salleh, S., and Gurtu, M.D. 2010. Antioxidant protective effect of glibenclamide and metformin in combination with honey in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int.J.Mol.Sci.*, (11): 2056-2066, doi:10.3390/ijms11052056.
- Faraji, M. and Tarkhari, A. 1999. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. *J. Ethnopharmacol*, 65(3): 231-236.
- Gayathri, M and Kannabiran, K. 2009. The Effects of oral administration of an aqueous extract of *Ficus bengalensis* stem bark on some hematological and biochemical parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Biol.*, 33: 9-13.
- Giacco, F. and Brownlee, M. 2010. Pathogenesis of Microvascular Complication, In: Holt, R.I.G., Cokram, C., Flyvbjerg, A., Goldstein, B.J. (editors), *Textbook of Diabetes*. 4th edition. A John Wiley & Sons Ltd Publ, UK.
- Girgis, N.F., Kamel, S., Labib, B., Naby, S.E.H. and Samy, S. 2010. Cellular and DNA changes due to clonazepam abuse in brains of albino rats and role of clonidine during withdrawal period. *J.ForensicMed.Clin.Toxicol*, 18(1):25.
- Graham, M.L., Janecek, J. L., Kittredge, J.A., Hering, B.J and Schuurman, H.J. 2011. The Streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comparative Medicine*, 61(4): 356–360.
- Herrera, A., Romero, S.F., Chavez-Soto, M.A., and Tortoriello, J. 2004. Effectiveness and tolerability of a standardized extract from *Hibiscus sabdariffa* in patients with mild to moderate hypertension: a controlled and randomized clinical trial. *Phytomedicine*, 11:375-382.
- Hirunpanich, V., Utaipat, A., Morales, N.P., Bunyapraphatasaran, Sato, H., Herunsalee, A and Suthisisang, C. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) *in vitro* using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol. Pharm. Bull*, 28(3): 481-484.

- Judiono, Djokomoeljanto, and Hadisaputro. 2012. Biomolecular aspects of plain kefir antidiabetic potentials. *International Journal of Food, Nutrition & Public Health*, 5(2):7-23
- June, C.C., Wen,L.H., Sani,H.A., Latip,J., Gansau,J.A., Chin,L.P., Embi,N. and Sidek, H.M. 2012. Hypoglycemic effects of *Gynuraprocumbens* fractions on streptozotocin-induced diabetic rats involved phosphorylation of GSK3 β (Ser-9) in liver. *SainsMalaysiana*, 41(8): 969–975.
- Khosravi,M., Jalali,K., Afkhami,A.M., and Fatehi,F. 2009. Effects of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on lipid profile and lipoproteins in patients with type II diabetes. *J. Altern Compliment Med.*, 15(8):899-903.
- Kim, J.S., Ju,J.B., Choi,C.W., and Kim,S.C. 2006. Hypoglycemic and antihyperlipidemic effect of four Korean medicinal plants in alloxan induced diabetic rats. *Am.J.Boichem.Biotech*, 2:154-160.
- Kirdpon S., Nakorn,S.N. and Kirdpon,W. 1994. Changes in urinary chemical composition in healthy volunteers after consuming roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) juice. *J. Med. Assoc. Thailand*,77(6): 314-321.
- Kohen and Nysta. 2002. Invited Review : Oxidation of biological system :oxidative stres phenomena, antioxidant, redox reaction and methods for their quantification. *Toxicolpathol*, 30(6):620-650.
- Kuo, C.Y., Kao,E.S., Chan,K.C., Leeb,H.J., Huang,T.F., and Wang,C.J. 2012. *Hibiscus sabdariffa* Linn. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats. *Journal of Functional Foods*,4 : 375-381.
- Kusano, C. and Ferrari,B. 2008. Total antioxidant capacity: a marker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 7(1):1-15.
- McKay,D.L., Oliver, C., Edward,S. and Jeffrey, B.B. 2010. *Hibiscus sabdariffa* Linn. Tea (Tisane) lowers blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *TheJournal of nutrition*, 140(2): 298-303.
- Okoko, T and Ibiba, F.O. 2008. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri*, 20(2):47-52.
- Onyenekwe P.C., Anjani,E.O., Ameh,D.A. and Gamaniel, K.S. 1999. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in wistar rats cell. *Biochechemistry Functional*, 17(3): 199-206.
- Pazdro and Burgess,J.R. 2010. The role of vitamin E and oxidative stres in diabetes complications. *Mechanism of Ageing and Development*, 131 :276-286.
- Reanmongkol, W. and Itharat,A. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn. calyces in experimental animals. *Songklanakarin Journal ScienceTechnology*, 29(1) : 29-38.
- Reeves, P.G. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet. *The Journal of Nutrition*, (127):5.
- Robertson,R.P., Harmon,J., Tran, P.O., TanakaY. and Takahashi,H. 2003. Glucose toxicity in β cell type 2 diabetes, good radical gone bad and the glutathione connection. *Diabetes*, 52:581-587.
- Sharma,D.K., Varshneya,C., More,B.S. and Bhardwaj,P. 2011. Effect of methanolic extract of *Carosea* leaves o glycemc control antioxidant status in alloxan induced diabetes I rats. *Pharmacologyonline*,3: 864-868.

- Singh, R.P., Murthy, K.N.C., and Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 81-86.
- Skrzydłowska, E., Sulkowski, S., Koda, S.M., Zalewski, B., Koda, L.K. and Sulkowska, M. 2005. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 11(3):403-406.
- Suharningsih, Winarni, D., Husen, S.A., Muzaki, Priyo, T.A. 2009. Uji penggunaan matras cursonic untuk menurunkan kadar gula darah penderita diabetes melitus tipe 2. Report of research, Universitas airlangga.
- Sukandar, Yulinah, Elin, Andrajati, Retnosari, Sigit, I., Joseph, Adyana, Setiadi, K.I., Prayitno, A. and Kusnandar, A. 2008. ISO Farmakoterapi. PT.ISFI Penerbitan, Jakarta.
- Syamsul, E.K., Nugroho, A.E. and Pramono, S. 2011. The antidiabetic of combination metformin and purified extract of *Andrographis paniculata* (Burn.) in high fructose fat red rats. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3): 124 – 131.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.*, 50(6):537-546.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of distary polyphenol. *Nutrients*, 2:1231-1246.
- Tseng T.H., Kao, E.S., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin Wu, H.W., and Wang, C.J. 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* Linn. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *J. of Food Chem. Toxicol.*, 35(12): 1159-1164.
- Tseng, T.H., Wang, C.J., Kao, E.S. and Chu, H.Y. 1996. Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, 101(2): 137-148.
- Valverde, L.F., Cedillo, F.D., Ramoz, M.L., Cervera, E.G., Gomez, E.P., Arredondo, C.C., and Leon, G.A. 2012. Glibenclamide-pregnenolone derivative has greater hypoglycaemic effects and biodistribution than glibenclamide-OH in alloxan rats. *Biomed Pap Med Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 156(2):122-127.
- Vella, A. and Rizza, R.A. 2010. Metabolic Disturbances in Diabetes, In: Holt, R.I.G., Cokram, C., Flyvbjerg, A., Goldstein, B.J. (editors), *Textbook of Diabetes*. 4th edition. A John Wiley & Sons Ltd Publ, UK.
- Vincent, A.M., Russell, J.W., Low, P. and Feldman, E.L. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25(4):612-628.
- Wright E, Bacon JL, Glass LC. 2006. Oxidative stress in type 2 diabetes: The Role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract*. 60(3): 308–314. www.ncbi.nlm.nih.gov (Online). Diakses tanggal 20 Oktober 2012.
- Yin, D., Tao, J., Lee, D.D., Shen, J., Hara, M., Lopez, J., Kuznetsov, A., Philipson, L. H. and Chong, A.S. 2006. Recovery of islet cell function in streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes*, 55:3256-336

5 ANTI INFLAMASI SARI ROSELA PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI DENGAN *STREPTOZOTOSIN*

Abstrak

Patogenesis diabetes melitus melibatkan proses inflamasi tingkat rendah akibat peningkatan glukosa darah. Inflamasi merupakan respon imun tubuh terhadap kerusakan seluler yang membutuhkan perbaikan, namun inflamasi yang berkelanjutan dapat menimbulkan kerusakan sel yang lebih luas dan permanen, dan dapat menyebabkan resisten insulin. Inflamasi disebabkan oleh radikal bebas yang dihasilkan akibat kondisi hiperglikemia dan obesitas. Pada penelitian ini dilakukan pengujian pemberian sari rosela pada tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi oleh *streptozotosin*. Ada 6 kelompok tikus yaitu tikus kontrol (TN), tikus diabetes yang diberi minuman aquades (TNEG), tikus diabetes yang diberi sari rosela 72 mg/hari/200 g BB selama 21 hari (TROS1), tikus diabetes yang diberi sari rosela 288 mg/hari/200 g BB selama 21 hari (TROS2), tikus diabetes yang diberi *glibenklamid* (TG) dan tikus yang diberi sari rosela 72 mg/hari/200 g BB selama 11 hari kemudian diinduksi dengan *streptozotosin* lalu dilanjutkan dengan sari rosela lagi sampai akhir masa perlakuan (TPREV). Analisa senyawa penandainflamasi (*TNF- α* dan *IL-6*) dilakukan pada sel imun dari limfa menggunakan teknik ELISA. Hasilnya menunjukkan bahwa sari rosela memiliki kecenderungan dapat menurunkan kadar senyawa penanda inflamasi yaitu *TNF- α* pada tikus diabetes namun belum mampu menurunkan kadar *IL-6*.

Kata kunci : rosela, inflamasi, *TNF- α* , *IL-6*, antioksidan

Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan sindrom gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh berkurangnya sekresi insulin atau penurunan sensitivitas jaringan terhadap insulin. DM dapat diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu tipe 1 dan tipe 2. Diabetes melitus tipe 2 juga disebut diabetes melitus tidak bergantung insulin (noninsulin-dependent diabetes melitus, NIDDM), yang disebabkan oleh penurunan sensitivitas jaringan target terhadap efek metabolik insulin. Diabetes melitus tipe 2 lebih sering dijumpai pada kira-kira 90% dari seluruh kasus diabetes. Pada kedua jenis DM, metabolisme semua nutrien utama terganggu. Resistensi atau tidak adanya insulin akan mengurangi efisiensi penggunaan dan pengambilan glukosa oleh sebagian besar sel tubuh, kecuali sel otak. Pada DM gangguan metabolisme karbohidrat dapat menyebabkan hiperglikemia.

Gangguan pada sekresi maupun aktivitas insulin pada diabetes melitus dapat disebabkan oleh mekanisme glikasi non enzimatis yaitu proses pengikatan glukosa secara kimiawi ke gugus amino bebas pada protein tanpa bantuan enzim, maupun adanya peningkatan inflamasi. Inflamasi adalah respon fisiologis tubuh terhadap kerusakan atau adanya gangguan faktor luar. Kondisi hiperglikemia menyebabkan respon senyawa inflamasi yang dimediasi oleh sitokin. Keberadaan

sitokin akan merusak sensitivitas insulin dan keseimbangan glukosa (Ikmal *et al.* 2013). Inflamasi terjadi setelah peningkatan glukosa darah ditandai dengan meningkatnya berbagai penanda peradangan, seperti *high sensitivity C reactive protein* (hs-CRP), *interleukin-6* (IL-6), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan *interleukin-18* (IL-18) (Node dan Inoue 2009; Nadeem *et al.* 2013).

Pemicu inflamasi dapat melalui ROS yang meningkat selama berlangsungnya penyakit diabetes melitus. ROS (*reactive species oxygen*) dapat mengaktifkan *NF- κ B* yaitu salah satu faktor transkripsi yang meregulasi ekspresi gen proinflamasi seperti *TNF- α* , *IL-6* dan *C reactive protein*. Selain itu kondisi diabetes dapat meningkatkan ketersediaan asam lemak bebas akibat proses lipolisis. Peningkatan asam lemak bebas akan mengaktifkan sistem imun untuk mengeluarkan sitokin *IL-6*, *TNF- α* , *IL-1 β* . Hal ini juga menjelaskan keterkaitan antara obesitas dengan peningkatan inflamasi.

TNF- α dan *IL-6* adalah senyawa inflamasi yang dikeluarkan oleh sel adiposa dan sel imun (neutrofil, makrofag) dan sel otot. *IL-6* dikeluarkan sebesar 30% dari jaringan *visceral adipose*. *TNF- α* berperan pada apoptosis mikrovaskuler pada DM tipe 1 dan 2, terlibat pada patogenesis diabetes nepropati dan retinopati (Oever *et al.* 2010). Inflamasi menyebabkan resisten insulin yang akan memperparah kondisi diabetes. Selain itu inflamasi dapat menyebabkan disfungsi sel β (Jakus *et al.* 2012, Badawi *et al.* 2010).

Peningkatan konsumsi antioksidan alami dapat menekan kelebihan inflamasi (Giriwono *et al.* 2011; Ebaid *et al.* 2013; Chang *et al.* 2012; Rytter 2011). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan sari rosela terhadap penurunan kadar senyawa inflamasi yang terdapat pada tikus diabetes.

Bahan dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah kelopak bunga rosela ungu (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang diperoleh dari perkebunan rosela di Leuwiliang, Bogor. Tikus jantan galur *Sprague Dawley* (200-250 g/ekor) umur 2 bulan digunakan sebagai hewan percobaan yang diperoleh dari BPPOM, Jakarta. Analisis senyawa inflamasi menggunakan metode imunokimia menggunakan kit komersial yaitu *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) dari Biorbyt, UK dengan catalog no. orb50113 dan *interleukin 6* (IL-6) dari Biorbyt, UK dengan catalog no. orb50053, dan BCA kit untuk analisa kadar protein.

Peralatan utama saat pengukuran kandungan protein fraksi limfa dan pengukuran *IL-6* dan *TNF- α* adalah mikropipet (Eppendorf) dan *microplate reader*.

Metode Penelitian

Sari rosela dibuat dengan cara merebus rosela kering sebanyak 1% dalam air selama 10 menit lalu disaring. Sari rosela dipekatkan dengan menggunakan vakum evaporator sampai 10 kalinya.

Perlakuan dengan Tikus Percobaan

Pengelompokan terbagi atas 6 grup tikus dan masing-masing grup terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok tikus tersebut adalah :

- (1) Kelompok tikus yang tidak diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi minuman aquades (TN)
- (2) Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi *glibenklamid* dosis 0.45 mg/Kg BB yang disuspensikan dalam aquades (TG)
- (3) Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi minuman aquades (TNEG)
- (4) Kelompok tikus yang diberi sari rosela selama 11 hari lalu diinduksi dengan *streptozotosin* lalu diberi sari rosela sampai masa perlakuan (21 hari) (TPREV)
- (5) Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi sari rosela (72 mg/hari/200 g BB) (TROS1)
- (6) Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi sari rosela (288 mg/hari/200 g BB) (TROS2)

Tikus disuntik secara intraperitoneal dengan *streptozotosin* dengan dosis 35 mg/Kg BB dalam 0.1 M buffer sitrat dingin (pH 4.5)(Gayathri dan Kannabiran, 2009). Setelah 72 jam dari penyuntikan, ujung ekor tikus diberi alkohol 70% dan diuji kadar glukosa darah dengan menggunakan alat *blood glucose test meter* (accu check). Tikus dinyatakan mengalami diabetes jika kadar gula menunjukkan >200mg/dl darah. Pada tikus yang tidak diinduksi dengan *streptozotosin*, tikus hanya disuntik dengan 0.1 M buffer sitrat saja. Pemberian sari rosela diberikan melalui sonde.

Sebelum diberi perlakuan, tikus percobaan diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Pada saat itu semua tikus diberi perlakuan ransum dan minuman sama yaitu ransum dan minuman standar. Setelah 7 hari, tikus percobaan mulai diberi perlakuan sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan selama 21 hari. Pemberian minuman dilakukan secara *ad libitum*. Pakan diberi setiap hari kurang lebih 25 g/tikus/hari. Tikus ditimbang setiap dua hari sekali, dan sisa makanan diukur setiap hari untuk mengetahui berapa makanan perlakuan yang dikonsumsi setiap hari.

Terminasi Tikus Percobaan (Okoko dan Ibiba 2008)

Tikus percobaan diterminasi dengan cara dibius menggunakan eter. Tikus lalu ditelentangkan dan dibersihkan dengan alkohol. Selanjutnya dalam kondisi terbius lapisan peritonealnya dibuka, untuk memudahkan pengambilan organ limfa. Sebelum pengambilan organ dilakukan *exsanguinations* (pengambilan darah sampai mati) dulu. Organ yang telah diambil kemudian dicuci dalam larutan PBS (buffer fosfat salin), ditiriskan, dan ditimbang. Organ-organ tersebut kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20° C (Girgis *et al.* 2010).

Persiapan Sampel untuk Analisa Senyawa Inflamasi

Sejumlah sampel limfa (kira-kira 0.1 g) ditimbang dan ditambah dengan 1 ml larutan PBS. Sampel digiling hingga halus, setelah itu disentrifugasi 4500 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dianalisa kadar proteinnya. Pengukuran kadar protein dilakukan dengan metode *Bichinconinic acid* (BCA). Prinsip pengukuran protein dengan metode BCA sama dengan prinsip Lowry. Pembentukan Cu^{2+} dengan protein dalam kondisi alkali. Reduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ menunjukkan jumlah protein yang terdapat dalam sampel.

Jika kadar protein sampel 10-100 ng/ml, maka sampel diencerkan 100 kali dengan diluent buffer, jika kadar protein 1-10 ng/ml, maka sampel diencerkan 10 kali, jika kadar protein 15.6-1000 pg/ml, maka sampel diencerkan 2 kalinya dan jika kadar protein ≤ 15.6 pg/ml maka sampel tidak perlu diencerkan.

Persiapan Larutan Standar

Persiapan standar dilakukan dengan menyiapkan larutan standar 10 ng/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.3 pg/ml, 15.6 pg/ml. Pengenceran larutan standar menggunakan *diluent buffer*.

Analisa *TNF- α* dan *IL-6*

Masing-masing larutan standar dan sampel sebanyak 0.1 ml dimasukkan pada *plate 96 well* (plate sudah dilapisi antibodi *antimouse TNF- α*). Sejumlah 0.1 ml *diluent buffer* dimasukkan pada *plate* sebagai kontrol. Lalu *plate* ditutup dengan penutup *plate* dan diinkubasi suhu 37°C selama 90 menit. Setelah itu penutup *plate* dibuka dan isi *plate* dibuang. Sebanyak 0.1 ml antibodi *antimouse TNF- α* yang sudah mengikat biotin ditambahkan pada masing-masing *plate* dan inkubasi suhu 37°C selama 60 menit. Setelah itu dilakukan pencucian *plate* sebanyak 3 kali menggunakan 0.01M PBS. Kemudian ditambahkan 0.1 ml avidin biotin peroksidase kompleks pada masing-masing *plate* dan diinkubasi 37°C selama 30 menit. *Plate* dicuci 5 kali dengan 0.01M PBS. Lalu ditambahkan 90 μl pewarna TMB (3,3,5,5 *tetramethylbenzidine*) pada masing-masing *plate* dan diinkubasi 37°C selama 30 menit sampai berwarna biru. Pada masing-masing *plate* ditambahkan 0.1 ml *stop solution* dan warna berubah menjadi kuning. Setelah itu dilakukan pembacaan pada absorbansi 450 nm dengan *microplate reader*.

Prosedur analisa *IL-6* sama dengan analisa *TNF- α* , bedanya *plate* pada *IL-6* sudah dilapisi dengan antibodi *antimouse IL-6*. Perlakuan yang lain mengikuti cara analisa *TNF- α* .

Hasil dan Pembahasan

Tabel 1 menunjukkan data senyawa *TNF- α* tidak berbeda nyata, namun menunjukkan bahwa kadar *TNF- α* kelompok rosela 1 (TROS1) dan kelompok

tikus rosela 2 (TROS2) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan kelompok tikus negatif (TNEG). Kandungan *TNF- α* pada kelompok tikus *glibenklamid* (TG)(1.3646 \pm 0.5846 pg/ μ g) hampir sama dengan kelompok tikus rosela 1 (1.3534 \pm 0.3998 pg/ μ g).

Tabel 1 menunjukkan data *IL-6* tidak berbeda secara signifikan. Namun ada kecenderungan kelompok tikus diabetes (TNEG, TPREV, TG dan TROS2) memiliki kadar yang *IL-6* lebih tinggi daripada tikus normal (TN).

Tabel 1. Nilai rata-rata senyawa inflamasi pada sel limfa tikus

Kelompok tikus	Kadar Protein (μ g/g)	Kandungan <i>TNF-α</i> (pg/ μ g)	Kandungan <i>IL-6</i> (pg/ μ g)
TN	49250	1.0569 \pm 0.0874	1.7298 \pm 0.4412
TNEG	89498	1.7404 \pm 0.1479	3.4731 \pm 0.9200
TPREV	86194	1.5537 \pm 0.3533	3.2595 \pm 0.9443
TG	52826	1.3646 \pm 0.5846	2.7845 \pm 0.9988
TROS1	85258	1.3534 \pm 0.3998	-
TROS2	79955	1.1975 \pm 0.3519	3.2801 \pm 0.2917

*Analisis ANOVA, data tidak berbeda nyata ($P > 0.05$)

Keterangan :Kelompok tikus normal (TN), Kelompok tikus preventif (TPREV), kelompok tikus diabetes yang diberi rosela dosis 1 (TROS1), kelompok tikus diabetes yang diberi rosela dosis 2 (TROS2), kelompok tikus diabetes diberi *glibenklamid* (TG) dan kelompok tikus diabetes dan diberi aquades (TNEG).

Kelompok tikus diabetes (TNEG) memiliki kadar *IL-6* dan *TNF- α* paling tinggi diantara kelompok lainnya. Kelompok tikus diabetes mengalami hiperglikemia (kadar gula >250 mg/dl) dimana kondisi ini menyebabkan tingginya stres oksidatif karena terjadi produksi radikal bebas (ROS) yang berlebihan yang tidak diimbangi dengan pertahanan antioksidan dalam tubuh. Menurut Virgolici *et al.* (2008) peningkatan level inflamasi berhubungan dengan peningkatan stres oksidatif. Kondisi diabetes dapat meningkatkan senyawa inflamasi seperti *TNF- α* dan *IL-6*. Peningkatan senyawa inflamasi ini berhubungan dengan naiknya BMI (*Body Mass Index*) dan resisten insulin (Nadeem *et al.* 2013). Penelitian lain menyebutkan plasma orang yang mengalami obesitas dan diabetes melitus tipe 2 mengandung konsentrasi *IL-6* yang tinggi (Yimagou *et al.* 2013).

Pada kondisi diabetes (TNEG) terjadi peningkatan superoksida yang dapat mengaktifkan protein kinase C (PKC) (Vidigal *et al.* 2012). PKC berfungsi untuk mengaktifkan sitokin. Hal ini yang menyebabkan peningkatan sitokin dalam penelitian ini kadar *TNF- α* dan *IL-6* pada kelompok tikus diabetes. Lebih lanjut Chang *et al.* (2012) menyatakan bahwa diabetes melitus dapat mengaktifasi *NF- κ B* (Nuclear factor kappa B) yang bertanggung jawab pada produksi beberapa senyawa inflamasi dimana ekspresi gennya diatur oleh sitokin proinflamasi, faktor pertumbuhan dan adesi molekul.

Data pada Tabel 1 menunjukkan tikus kelompok rosela (TROS1 dan TROS2) memiliki kecenderungan nilai *TNF- α* yang lebih rendah dari kelompok tikus diabetes (TNEG). Kelompok tikus *glibenklamid* (TG) mengandung senyawa *TNF- α* yang hampir sama dengan kelompok tikus TROS1 dan TROS2. Pada penelitian ini *glibenklamid* juga mempunyai kemampuan untuk menurunkan

level inflamasi *TNF- α* . Tabel 1 menunjukkan semua tikus yang mengalami diabetes, kadar senyawa inflamasi *IL-6* juga mengalami peningkatan, namun pemberian sari rosela tidak memberikan pengaruh terhadap penurunan pada kadar senyawa inflamasi ini.

Penurunan *TNF- α* pada kelompok tikus diabetes yang diberi rosela (TROS1 dan TROS2) diduga karena kandungan antioksidan yang ada pada sari rosela. Rosela mengandung antosianin, vitamin C, tanin, steroid, fenol hidroksiquinon dan saponin. Menurut Giriwono *et al.* (2011) suplementasi 10% *fermented barley* yang mengandung senyawa polifenol dapat menurunkan level 8OHdG pada plasma, menghambat peningkatan kadar NO (*nitric oxide*) pada plasma yang berhubungan dengan peningkatan sistem inflamasi. Aktivitas antioksidan senyawa polifenol yang ada pada *fermented barley* menghambat propagasi ROS yang akan menginduksi inflamasi dan kerusakan organ akibat induksi mikroba lipopolisakarida. Antioksidan pada barley yang difermentasi mampu menekan kadar sitokin inflamasi pada plasma (*IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α*) dan menurunkan konsentrasi NO plasma. Sari rosela juga terbukti sebagai anti inflamasi, analgesik dan mempunyai aktivitas antipiretik pada hewan percobaan (Reanmongkol dan Itharat 2007). Penurunan kadar senyawa inflamasi juga disebabkan karena meningkatnya kadar enzim antioksidan hati seperti hasil penelitian Ebaid *et al.* (2013) yang memberikan whey protein pada tikus diabetes menyebabkan kadar glutathion pada hati meningkat dan senyawa inflamasi menurun. Menurut Okoko dan Ibiba (2008) sari rosela dapat meningkatkan enzim glutathion peroksidase (GSH) dan katalase serta menurunkan level TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Penelitian Chang *et al.* (2012) pada senyawa antioksidan yang terdapat pada anggur dan berry yaitu resveratol mempunyai kemampuan sebagai anti inflamasi melalui penekanan ekspresi gen pada jalur *NF- κ B* dan ekspresi gen sitokin *IL-1 β* . Resveratol ini diberikan pada tikus diabetes yang diinduksi dengan *streptozotosin*. Lebih lanjut dinyatakan bahwa resveratol mampu mencegah produksi ROS berlebihan karena kemampuannya untuk menangkap radikal bebas. Penelitian Rytter (2011) menunjukkan bahwa pemberian α carotene, β carotene, lutein dan likopen dapat menurunkan kadar *IL-6* pada penderita diabetes.

Simpulan

Diabetes menyebabkan peningkatan kadar senyawa inflamasi. Kelompok tikus diabetes yang diberi rosela dosis 72 mg/hari/200 g BB dan 288 mg/hari/200 g BB cenderung dapat menurunkan kadar *TNF- α* . Namun pemberian rosela pada tikus diabetes tidak mempengaruhi kadar *IL-6*. Senyawa antioksidan yang terdapat dalam rosela dapat menekan atau menurunkan kadar radikal bebas dan menyebabkan penurunan kadar *TNF- α* . Hal ini menunjukkan dugaan bahwa rosela cenderung dapat menurunkan tingkat inflamasi, sehingga dampak keparahan berlanjut akibat inflamasi dapat ditekan.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Dikti, melalui Proyek Penelitian Fundamental tahun 2014.

Daftar Pustaka

- Badawi A, Klip A, Haddad P, Bailo BG, El-Soheemy A, Karmali M. 2010. Type 2 diabetes melitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Journal Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 3: 173-186.
- Chang CC, Chang CY, Huang JP, Hung LM. 2012. Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chinese Journal of Physiology*. 55(10): 30. DOI: 10.4077/CJP.2012.BAA012
- Ebaid H, Ahmed OM, Mahmoud AM, Ahmed RR. 2013. Limiting prolonged inflammation during proliferation and remodeling phases of wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats supplemented with camel undenatured whey protein. *BMC Immunology*. 14:31.
- Gayathri M, Kannabiran K. 2009. The Effects of oral administration of an aqueous extract of *Ficus bengalensis* stem bark on some hematological and biochemical parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Biol*. 33: 9-13.
- Girgis NF, Kamel S, Labib B, Naby SEH, Samy S. 2010. Cellular and DNA changes due to clonazepam abuse in brains of albino rats and role of clonidine during withdrawal period. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol*. 18(1):25.
- Giriwono PE, Shirakawa H, Hokazono H, Goro T, Komai M. 2011. Fermented barley extract supplementation maintained antioxidative defense suppressing lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75(10):1971-1976.
- Ikmal SIQS, Huri HZ, Vethakkan SR, Wan Ahmad WA. 2013. Potential biomarkers of insulin resistance and atherosclerosis in type 2 diabetes melitus patients with coronary artery disease. *International Journal of Endocrinology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/698567>
- Jakus V, Šandorova E, Kalninova J, Krahulec B. 2012. Monitoring of glycation, oxidative stress and inflammation in relation to the occurrence of vascular complications in patients with type 2 diabetes melitus. Report of research. Faculty of Medicine Comenius University. Slovak Republic
- Nadeem A, Naveed AK, Hussain MM, Raza SI. 2013. Correlation of inflammatory markers with type 2 diabetes melitus in Pakistan patients. *J Postgrad Med Inst*. 27(3):267-273
- Node K, Inoue T. 2009. Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure. *Cardiovascular Diabetology*. www.cardiab.com. (Online). Diakses tanggal 20 Oktober 2012.
- Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. 2010. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes melitus. *Mediators of Inflammation*. hal 1-15 Doi:10.1155/2010/792393
- Okoko T, Ibiba FO. 2008. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri*. 20(2):47-52.
- Reanmongkol W, Itharat A. 2007. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. in experimental animals. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 29(1) : 29-38.

- Rytter E. 2011. Effect of dietary antioxidants on oxidative stress, inflammation and metabolic factors. [Disertasi]. Fakultas Kedokteran Uppsala Universitet, Swedia.
- Vidigal FC, Cocate G1, Pereira LG, Alfenas CG. 2012. The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process. *Nutr Hosp.* 27(5):1391-1398.
- Virgolici B, Mohora M, Gaman L, Lixandru D, Manolescu B, Coman A, Stoian I. 2008. Relation between inflammation and oxidative stress markers in diabetic foot patients. *Romanian J.Biophys.* 18(4): 273–282.
- Yimagou EL, Songwi E, Matsha TE, Kengne AP. 2013. Diabetes mellitus and Inflammation. *Curr Diab Rep.* DOI 10.1007/s11892-013-0375-y

6 PENGARUH SARI ROSELA TERHADAP DNA ADDUCT PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI DENGAN STREPTOZOTOSIN

Abstrak

Pada penyakit diabetes melitus terjadi peningkatan ROS (*reactive oxygen species*) yang dapat berinteraksi dengan DNA membentuk modifikasi basa DNA (*DNA adduct*). ROS berinteraksi dengan DNA pankreas menyebabkan kerusakan dan terjadi gangguan pembentukan insulin sehingga kondisi ini memperparah kondisi penyakit diabetes melitus. Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) mengandung sejumlah senyawa antioksidan diharapkan mampu menurunkan ROS yang pada akhirnya dapat mengurangi jumlah *DNA adduct* yang terbentuk. Penelitian ini menggunakan tikus *Sprague Dawley* yang dibuat diabetes dengan induksi *streptozotosin* (STZ) secara intraperitoneal. Ada 6 kelompok tikus yaitu tikus kontrol (TN), tikus diabetes dan diberi obat *glibenklamid* (TG), tikus diabetes yang diberi minuman aquades (TNEG), tikus diabetes yang diberi sari rosela 72 mg/hari/200 g BB selama 21 hari (TROS1), tikus diabetes yang diberi sari rosela 288 mg/hari/200 g BB selama 21 hari (TROS2) dan tikus yang diberi sari rosela 11 hari kemudian diinduksi dengan STZ lalu dilanjutkan dengan sari rosela lagi sampai akhir masa perlakuan (TPREV). Analisis N7 metilguanin sebagai *DNA adduct* dilakukan pada DNA yang diisolasi dari pankreas tikus. Deteksi *DNA adduct* menggunakan alat LCMS. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian rosela pada tikus percobaan belum menghasilkan perbedaan jumlah N7 metilguanin yang signifikan.

Kata kunci : Rosela, *streptozotosin*, *DNA adduct*

Pendahuluan

Penyakit diabetes melitus dapat disebabkan oleh kurangnya insulin atau kerusakan insulin yang menyebabkan glukosa tidak dapat masuk ke dalam sel untuk diubah menjadi energi dan terjadi peningkatan glukosa dalam darah (hiperglikemia). Kondisi hiperglikemia akan menghasilkan ROS (*reactive oxygen species*). ROS menyebabkan stres oksidatif dalam sistem sel, jumlah radikal bebas lebih banyak dibanding kapasitas antioksidan yang dimiliki oleh sel. Jika sel tidak mampu meredam aktivitas radikal bebas maka radikal bebas ini akan menyerang dan merusak lipid, protein maupun DNA (Vincent *et al.* 2004). ROS akan berinteraksi dengan DNA membentuk modifikasi basa DNA, kerusakan gula deoksiribosa, terbentuknya *cross linkage* DNA-protein, dan kerusakan pada sistem perbaikan DNA. Radikal bebas juga bisa bereaksi dengan nukleotida sehingga menyebabkan perubahan yang signifikan pada komponen biologi sel. Jika ROS menyerang DNA pankreas menyebabkan kerusakan sel pankreas yang akan mengganggu produksi insulin dan ini memperparah kondisi pada penyakit diabetes.

DNA adduct adalah DNA yang terikat kovalen dengan senyawa kimia. Proses terjadinya *DNA adduct* menjadikan DNA rusak yang kemudian menyebabkan DNA tersebut tidak mampu melakukan replikasi. Hal inilah awal terjadinya kerusakan dan jika tidak ada perbaikan DNA, hal ini akan menyebabkan proses nekrosis atau apoptosis serta proses karsinogenesis. Sebenarnya setiap pembentukan *DNA adduct* dapat dihilangkan oleh *DNA repair* (Loeber *et al.* 2006; Nay dan O'Connor 2013).

Pembentukan *DNA adduct* berasal dari molekul kecil yang bersifat elektrofilik dengan DNA. Senyawa elektrofil ini dapat berasal dari paparan kimia dari luar (makanan, lingkungan, gaya hidup) dan juga senyawa genotoksik yang dihasilkan dari hasil metabolisme dalam tubuh. Senyawa yang dapat mengalkilasi DNA adalah aldehid, aril amin, siklopropan, dan enals, epoksida, furans, nitrosamine, fenol, polisiklik aromatik hidrokarbon dan quinon (Sturla 2007). Pengukuran *DNA adduct* sebagai salah satu biomarker (penanda biologis) stres oksidatif pada penyakit diabetes (kondisi hiperglikemia) telah banyak dilaporkan (Gayathri dan Kannabiran 2009; Bolzan dan Bianchi 2002; Krapfenbauer *et al.* 1998).

Rosela mengandung antioksidan yaitu senyawa yang mampu mendonorkan atom H kepada radikal bebas agar stabil. Beberapa penelitian telah membuktikan pengaruh antioksidan terhadap penurunan dan penghambatan pada pembentukan *DNA adduct* (Singletary *et al.* 2007; Pazdro dan Burgess 2010; Giriwono *et al.* 2011). Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kemampuan rosela dalam menurunkan pembentukan *DNA adduct* sebagai salah satu penanda kerusakan sel pankreas akibat stres oksidatif.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah kelopak bunga rosela ungu (*Hibiscus sabdariffa* Linn) yang diperoleh dari perkebunan rosela di Leuwiliang, Bogor. Bahan yang digunakan untuk analisa *DNA adduct* adalah isolat DNA pankreas tikus, standar N7-metilguanin (Sigma), O6-metilguanin (Aldrich), asam format (HPLC grade, Merck), metanol (HPLC grade, Merck), asam asetat (HPLC grade, Merck), asetonitril (HPLC grade, merck), dan *aquabides*.

Alat

Alat kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem spektrometer massa yang dilengkapi dengan sistem pemompaan *binary*, *autosampler* dan *spectrometer massa tipe quadrapole* (Xevo TQD, waters), Kolom C18 acquity BEH (Bridget Ethylene Hybrid) (1.7 μ m, 100mmx2.1 mm, waters), timbangan, *vortex*, *membrane milipore* 0.20 μ m (Whatman).

Perlakuan dengan Tikus Percobaan

Tikus percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus galur *Sprague Dawley*. Umur tikus yang digunakan pada penelitian ini 2 bulan (berat badan 200-250 g/ekor). Pengelompokan terbagi atas 6 grup tikus dan masing-masing grup terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok tikus tersebut adalah :

1. Kelompok tikus yang tidak diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi minuman aquades (TN)
2. Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi *glibenklamid* dosis 0.45 mg/Kg BB yang disuspensikan dalam aquades (TG)
3. Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi minuman aquades (TNEG)
4. Kelompok tikus yang diberi sari rosela selama 11 hari lalu diinduksi dengan *streptozotosin* lalu diberi sari rosela sampai masa perlakuan (21 hari) (TPREV)
5. Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi sari rosela (72 mg/hari/200 g BB) (TROS1)
6. Kelompok tikus yang diinduksi dengan *streptozotosin* dan diberi sari rosela (288 mg/hari/200 g BB) (TROS2)

Tikus disuntik secara intraperitoneal dengan *streptozotosin* dengan dosis 35 mg/Kg BB dalam 0.1 M buffer sitrat dingin (pH 4.5)(Gayathri dan Kannabiran, 2009). Setelah 72 jam dari penyuntikan, ujung ekor tikus diberi alkohol 70% dan diuji kadar glukosa darah dengan menggunakan alat *blood glucose test meter* (Accu check, Germany). Tikus dinyatakan mengalami diabetes jika kadar gula menunjukkan >200mg/dl darah. Pada tikus yang tidak diinduksi dengan *streptozotosin*, tikus hanya disuntik dengan 0.1 M buffer sitrat saja. Pemberian sari rosela diberikan melalui sonde.

Sebelum diberi perlakuan, tikus percobaan diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari. Pada saat itu semua tikus diberi perlakuan ransum dan minuman sama yaitu ransum dan minuman standar. Setelah 7 hari, tikus percobaan mulai diberi perlakuan sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan selama 21 hari. Pemberian minuman dilakukan secara *ad libitum*. Pakan diberi setiap hari kurang lebih 25 g/tikus/hari. Tikus ditimbang setiap dua hari sekali, dan sisa makanan diukur setiap hari untuk mengetahui berapa makanan perlakuan yang dikonsumsi setiap hari.

Terminasi Tikus Percobaan (Okoko dan Ibiba 2008)

Tikus percobaan diterminasi dengan cara dibius menggunakan eter. Tikus lalu ditelentangkan dan dibersihkan dengan alkohol. Selanjutnya dalam kondisi terbius lapisan peritonealnya dibuka, untuk memudahkan pengambilan organ limfa. Sebelum pengambilan organ dilakukan *exsanguinations* (pengambilan darah sampai mati) dulu. Organ yang telah diambil kemudian dicuci dalam larutan PBS (buffer fosfat salin), ditiriskan, dan ditimbang. Organ-organ tersebut kemudian dibungkus dengan aluminium foil dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20° C (Girgis *et al.* 2010).

Analisa DNA adduct**Isolasi DNA (Genomic DNA mini kit)**

Sebanyak 30 mg pankreas +200 µl bufer GT digiling sampai membentuk *pulp*, lalu ditambah 20 µl proteinase K dan dikocok dengan *shaker*, lalu *pulp* diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit, setiap 5 menit diaduk dengan *shaker*. Setelah itu ditambah buffer GBT sebanyak 200 µl dandilanjutkan dengan inkubasi suhu 60°C selama 20 menit, setiap 5 menit diaduk dengan *shaker*. Sebanyak 200 µl etanol ditambahkan pada *vial*, dikocok, lalu campuran dituang ke dalam kolom GD. *Vial* disentrifuse 13000 g selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 400 µl buffer WI, disentrifuse 13000 g selama 30 detik. Lalu ditambahkan 600 µl *wash buffer*, dan disentrifuse 13000 g selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 100 µl *elution buffer* dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu disentrifuse kembali 13000 g selama 30 detik untuk mendapatkan DNA.

Persiapan Larutan Induk (Nurfadilla 2013)

Sebanyak 5 mg standar N7- metilguanin dimasukkan dalam labu ukur 5 ml dan ditambah metanol yang mengandung 10% asam format sampai konsentrasi 1 mg/ml.

Persiapan Kurva Standar (Nurfadilla 2013)

Larutan induk N7- metilguanin diencerkan dengan aquabidestilata yang mengandung 0.5% asam format hingga konsentrasi 40 ng/ml, lalu diencerkan lagi dengan konsentrasi masing-masing 30 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml. disiapkan dalam *vial* sebanyak 20 µL dan dimasukkan ke dalam alat LC-MS/MS. Luas puncak yang dihasilkan dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya.

Persiapan Sampel (Crystalia 2013)

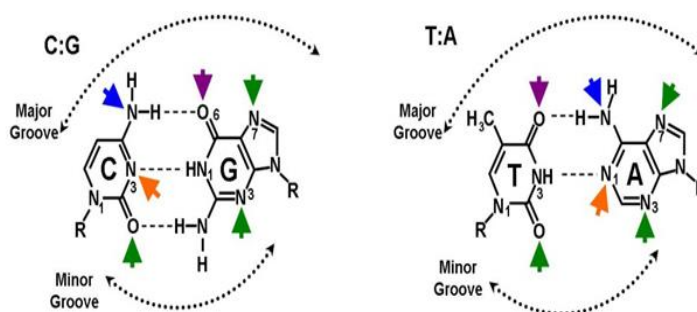
DNA pankreas dihidrolisis menggunakan aquabidest dan asam format 90% masing-masing sebanyak 200 µL. Sampel dihidrolisis dengan pemanasan pada 85°C selama 60 menit.

Analisa Sampel dan Standar (Nurfadilla 2013)

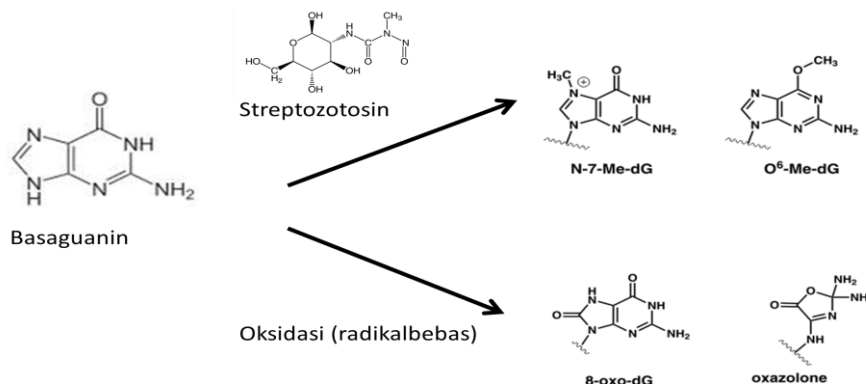
Pemisahan dilakukan dengan alat LC-MS/MS menggunakan elusi isokratik dengan komposisi fase gerak A (asam asetat 0.05% dalam aquabidest) dan fase gerak B (asetonitril) 95:5, laju alir 0.3 mL/menit selama 3 menit. DNA yang telah dihidrolisis dimasukkan ke *vial* injeksi. Volume injeksi diatur 10 µL dan analisis dilakukan pada kondisi analisis yang sudah dioptimasi. Waktu retensi puncak yang dihasilkan dan fragmentasinya dibandingkan dengan standar N7 metilguanin. Sampel dinyatakan positif mengandung N7-metilguanin, bila terbentuk puncak pada waktu retensi dan fragmentasi sama, dengan konsentrasi diatas batas deteksi.

Hasil dan Pembahasan

Induksi diabetes pada tikus percobaan menggunakan bahan diabetogenik *streptozotosin*. *Streptozotosin* adalah monofungsional nitrosoare derivatif yang diisolasi dari fermentasi broth *Streptomyces achromogenes*. *Streptozotosin* merupakan grup alkilasi dari obat-obatan antineoplastik yang dikenal sebagai alkilnitrosoare. Selain *streptozotosin*, bahan kimia yang lain yang berfungsi sebagai diabetogen adalah aloksan, diaksosida, adrenalin, glukagon, etilendiamin tetraasetat dan lain-lain. *Streptozotosin* memiliki efek genotoksik yang secara langsung memetilasi DNA (Bolzan dan Bianchi 2002). Menurut Gayathri dan Kannabiran (2009) *streptozotosin* memberikan efek sitotoksik akut pada sel dan molekul, yang membentuk ROS (*reactive oxygen species*) penyebab kerusakan oksidatif. *Streptozotosin* juga merupakan genotoksikan selektif terhadap sel β . Pemberian dosis tunggal *streptozotosin* secara cepat menimbulkan diabetes akut karena terbentuknya *DNA adduct* termasuk pembentukan *N3 methyladenine* dan *O(6)-methylguanine adduct*, dimana pembentukan senyawa ini menyebabkan nekrosis pada sel β . *Streptozotosin* berpotensi sebagai senyawa alkilasi yang secara langsung dapat memetilasi DNA. Menurut Bolzan dan Bianchi (2002) pemberian *streptozotosin* pada tikus percobaan dapat menghasilkan N7-metilguanin, O6-metilguanin, N7-metiladenin, dan N8-metiladenin. *Streptozotosin* menginduksi *DNA strain breaks*, memetilasi basa guanin pada kation metil, 70% metilasi DNA terjadi pada N7 pada guanin. Pemberian STZ akan menghasilkan radikal bebas yang kemudian menginduksi kematian sel melalui proses apoptosis dan nekrosis sel. Dalam hubungannya dengan radikal bebas, *streptozotosin* meningkatkan produksi radikal O_2^- oleh sistem *xanthine oxidase* pada sel β pankreas dan menstimulasi terbentuknya H_2O_2 yang menyebabkan fragmentasi DNA pada pulau pankreas tikus. Toksisitas STZ terletak pada aktivitas alkilasi *DNA methylnitrosoare moiety* terutama pada posisi O^6 guanin. Perpindahan gugus metil STZ yang melekat pada molekul DNA menyebabkan kerusakan sel karena terjadi proses alkilasi (Gambar 1 dan 2). Hasil rerata konsentrasi *DNA adduct* N7 metilguanin dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Senyawa alkilasi membuat modifikasi DNA (warna ungu menunjukkan tempat DNA yang sering ditempel oleh senyawa alkilasi 1(senyawa intermediate elektrofil); warna hijau adalah tempat modifikasi senyawa alkilasi 2 (N dan O alkilasi) ;warna orange tempat DNA single stranded; warna biru menunjukkan grup amino eksosiklik dalam membentuk siklikasi *DNA adduct*(Nay dan O'Connor 2013).



Gambar 2. Pembentukan DNA adduct

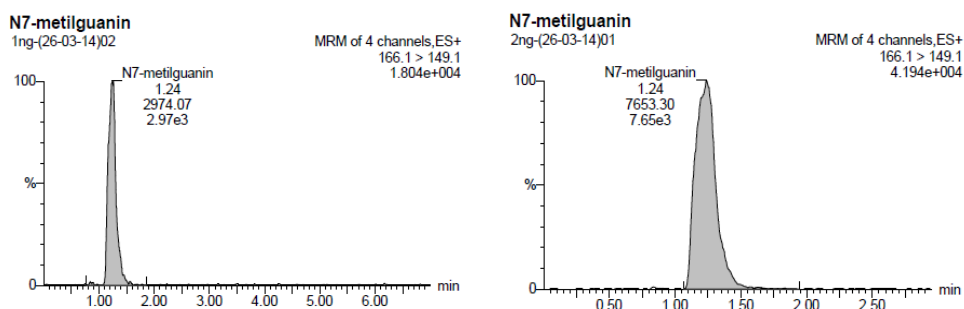
Tabel 1. Rerata konsentrasi DNA adduct (N7 metilguanin) pada DNA sel pankreas tikus

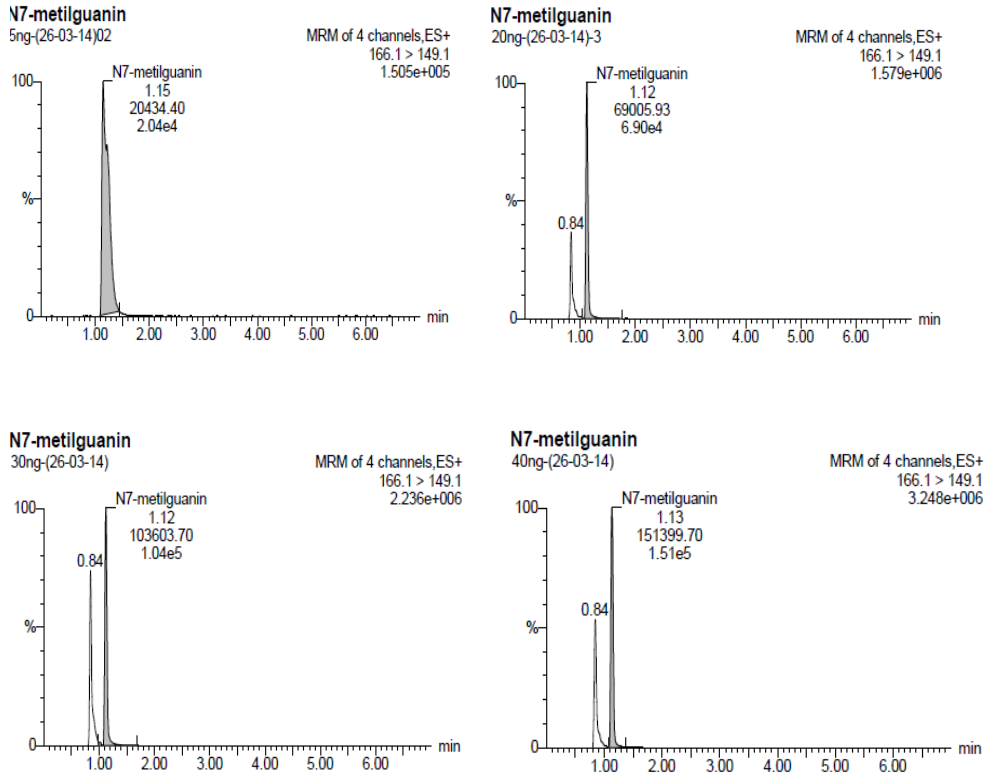
Kelompok tikus	Jumlah DNA (ng/ml)	Luas area	N7 metilguanin (pg/ml)**
TN	286.575	71.5	180.7 ^a
TPREV	226.325	41.75	172.6 ^a
TROS 1	290.660	42.4	172.8 ^a
TROS 2	323.850	63.25	178.4 ^a
TG	235.450	35.25	170.9 ^a
TNEG	215.825	34.75	170.8 ^a

**Huruf yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan ($P > 0.05$)

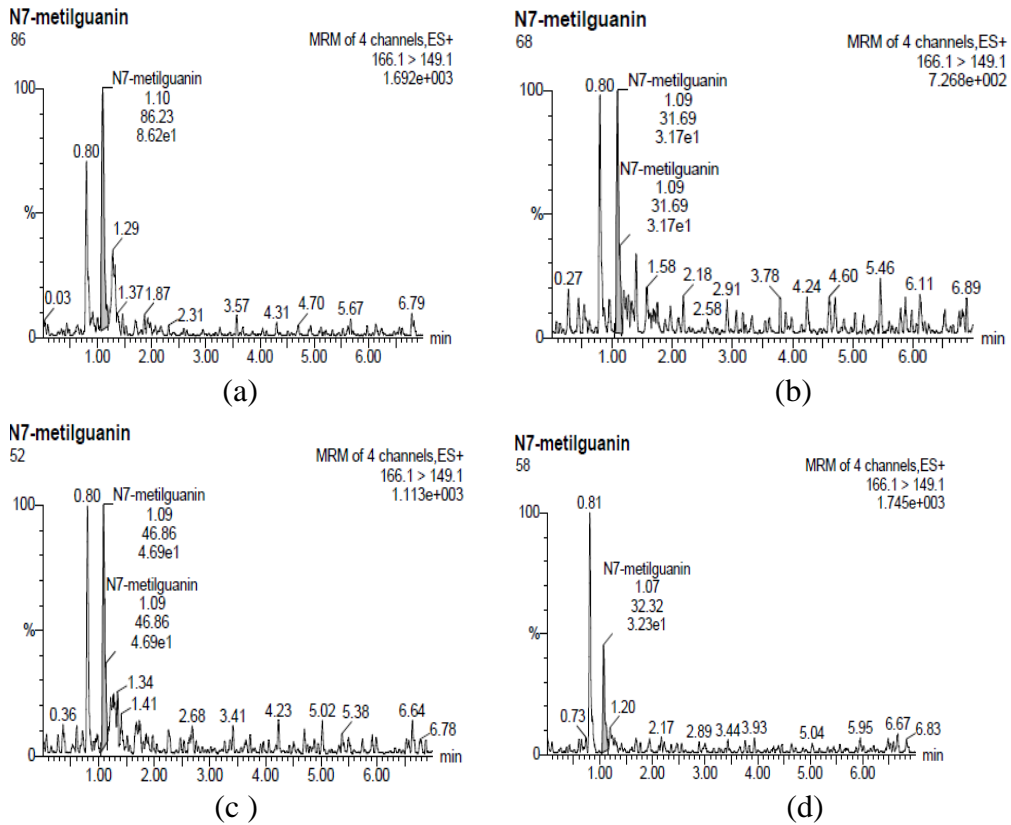
Keterangan : Kelompok tikus normal (TN), Kelompok tikus preventif (TPREV), kelompok tikus diabetes yang diberi rosela dosis 1 (TROS1), kelompok tikus diabetes yang diberi rosela dosis 2 (TROS2), kelompok tikus diabetes diberi *glibenklamid* (TG) dan kelompok tikus diabetes dan diberi aquades (TNEG).

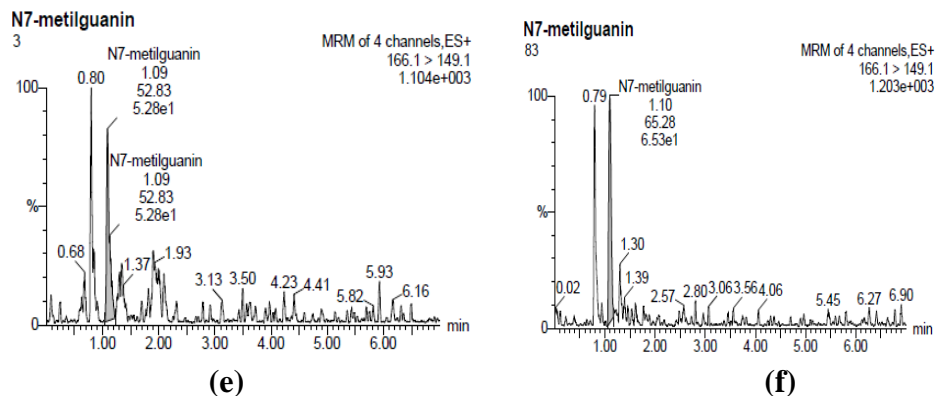
Sementara hasil diagram standar N7 metilguanin dan sampel setiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3 dan Gambar 4.





Gambar 3. Spektrogram luas area standar N7 metilguanin





Gambar 4. Spektrogram luas area N7 metil guanine sampel (a) tikus diabetes dengan sari rosela dosis 2 (TROS2); (b) tikus diabetes dengan sari rosela dosis 1 (TROS1); (c) tikus diabetes dengan *glibenklamid* (TG); (d) tikus preventif (TPREV); (e) tikus diabetes (TNEG), dan (f) tikus kontrol (TN).

Pada Tabel 1 terlihat jumlah *DNA adduct* pada setiap perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan. Hal ini dapat disebabkan karena jumlah sampel yang sedikit (50 μ l) dan sampel dihidrolisis dengan asam format 90% untuk mendapatkan *DNA adduct* (N7-metil guanine). Akibatnya jumlah *DNA adduct* yang diperoleh sedikit dan deteksi luas area pada alat sangat kecil bila dibandingkan dengan luas area standar. Menurut Nurfaradilla (2013) batas deteksi LOD untuk N7 metilguanine adalah 0.2 ng/ml. Pada standar luas areanya berkisar antara 2974 sampai 151400 sementara luas area sampel hanya berkisar antara 13 sampai 111. Menurut Ravanat (2005) akurasi penentuan lesi DNA tergantung pada jumlah analat yang dihidrolisis. Hidrolisis bisa menggunakan enzim atau asam. Untuk alat HPLC-MS dan GC-MS lebih baik menggunakan asam. Adanya asam (asam format) akan memutuskan ikatan fosfodiester yang menjadi tulang punggung DNA dan ikatan N glikosida sehingga DNA bisa terputus dan basa DNA terbebaskan (Crystalia 2013). Enzim biasanya menggunakan alkalin fosfatase/nuklease yang dapat menghidrolisis DNA menjadi nukleotida kemudian menjadi nukleosida. Kemampuan enzim untuk menghidrolisis DNA menjadi nukleosida harus terukur, sebab jika hidrolisis ini tidak lengkap maka sulit untuk mendeteksi DNA yang normal dengan DNA lesi. Selain itu juga tergantung pada stabilitas senyawa yang dihasilkan. Lebih lanjut dinyatakan untuk mendeteksi 8 oxogua digunakan asam format untuk menghidrolisis DNA lebih baik dibanding enzim. Artinya penggunaan asam untuk mendapatkan *DNA adduct* sudah cukup baik. Semua kelompok tikus perlakuan menunjukkan deteksi adanya N7 metil guanine, hal ini menyatakan bahwa semua kelompok perlakuan mengalami pembentukan *DNA adduct* walaupun tidak disuntik oleh *streptozotosin* seperti pada kelompok tikus normal (TN).

Data pada Tabel 1 juga menunjukkan bahwa *DNA adduct* dapat juga terbentuk pada kondisi tikus normal (TN). Menurut Povey (2000) pembentukan *DNA adduct* dapat terjadi karena ekspos senyawa kimia dari lingkungan, gaya hidup, sumber diet. Keberadaan *DNA adduct* merefleksikan sejumlah proses

mulai dari paparan senyawa kimia, penyerapan, metabolisme (aktivasi dan detoksifikasi) dan adanya *DNA repair*.

DNA adduct bisa terjadi karena proses oksidasi pada gugus basa DNA seperti guanine dapat teroksidasi dengan gugus hidroksil membentuk 8 hidroksiguanin, atau basa juga dapat dialkiliasi membentuk 7 metilguanin (7MG), 3 metilguanin (3MG), dan O6 metilguanin tergantung pada sisi mana gugus DNA dirusak. Pada diabetes melitus *DNA adduct* dapat terjadi melalui proses oksidasi atau alkilasi pada DNA. Menurut Pazdro dan Burgess (2010) vitamin E mampu menurunkan resiko diabetes dengan menurunkan DNA yang teroksidasi, artinya dapat menurunkan resiko kanker. Pada darah pasien diabetes melitus tipe I dan tipe II banyak ditemukan 8 hydroxy 2-deoxyguanosine (OH8DG) sebagai marker adanya kerusakan oksidatif DNA pada basa guanine (Krapfenbauer *et al.* 1998 ; Pazdro dan Burgess 2010). Menurut Rytter *et al.* (2009) pada pasien diabetes ditemukan 8oxo 7,8 dihidro 2 deoxyguanosin (8-oxodG) yang menunjukkan adanya hubungan antara glikemik dengan stres oksidatif. Namun pemberian sejumlah antioksidan tidak berpengaruh terhadap penurunan *DNA adduct* ini.

Penelitian Singletary *et al.* (2007) menyatakan bahwa kemampuan ekstrak anggur menghambat pembentukan *DNA adduct* dipengaruhi oleh meningkatnya enzim detoksifikasi fase II yaitu glutathion S transferase dan NAD(P)H quinon reduktase I. Lebih lanjut Giriwono *et al.* (2011) menyatakan suplementasi 10% fermentasi barley dapat menurunkan level 8OHDG pada plasma dan mempunyai efek menurunkan inflamasi. Menurut Wang *et al.* (2009) mekanisme menurunkan *DNA adduct* adalah melalui penekanan inflamasi dengan menutup jalur *NF-κB* dan ekspresi gen siklooksigenase.

Kemampuan rosela sebagai anti mutagenik telah dilakukan oleh Okoko dan Ibiba (2008) menyatakan tikus yang diinduksi dengan cisplatin, yang merupakan obat anti kanker yang mempunyai potensi sitotoksik pada ginjal ternyata dapat menurunkan enzim glutathion dan enzim katalase serta meningkatkan *thiobarbituric acid reactive species* (TBARS) pada hati dan ginjal tikus percobaan. Pemberian sari rosela dapat meningkatkan enzim glutathion (GSH) peroksidase dan katalase serta menurunkan level TBARS. *DNA adduct* berhubungan dengan mutagenik dan pembentukan *DNA adduct* adalah tahap awal terbentuknya kanker. *DNA adduct* dapat diminimumkan dengan proses perbaikan DNA (*DNA repair*) (Stiborova *et al.* 1998). Selain itu sistem enzim detoksifikasi seperti glutathion S transferase dimana senyawa elektrofilnya berikatan dulu dengan enzim ini sebelum berikatan dengan makromolekul seluler, sehingga senyawa elektrofilnya tidak berikatan dengan DNA dan kerusakan DNA dapat diminimumkan (Godschalk *et al.* 2002).

Simpulan

Alat LCMS yang digunakan belum mampu mendeteksi jumlah N7 metilguanin yang terbentuk akibat induksi dengan *streptozotosin*. Pemberian sari rosela pada dosis 72 mg/hari/200 g BB dan 288 mg/hari/200 g BB selama 21 hari tidak memberikan pengaruh pada pembentukan N7 metilguanin sebagai salah satu *DNA adduct*.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini terlaksana dengan adanya bantuan alat analisis untuk isolat DNA (RS Dharmais, Jakarta) dan analisis *DNA adduct* di Laboratorium Bioekivalen dan Bioavailabilitas Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok.

Daftar Pustaka

- Bolzan AD, Bianchi MS. 2002. Review : Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research*. 512 :121-134.
- Crystalia Y. 2013. Analisis O6 metilguanin dalam darah pasien kanker yang menerima siklofosamid pada regimen terapi secara kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem spektrometri massa [Skripsi]. FMIPA, Farmasi UI, Depok.
- Gayathri M, Kannabiran K. 2009. The Effects of oral administration of an aqueous extract of *Ficus bengalensis* stem bark on some hematological and biochemical parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Biol*. 33: 9-13.
- Girgis NF, Kamel S, Labib B, Naby SEH, Samy S. 2010. Cellular and DNA changes due to clonazepam abuse in brains of albino rats and role of clonidine during withdrawal period. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol*. 18(1):25.
- Giriwono PE, Shirakawa H, Hokazono H, Goro T, Komai M. 2011. Fermented barley extract supplementation maintained antioxidative defense suppressing lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75(10):1971-1976.
- Godschalk RWL, Van Schooten FJ, Bartsch H. 2002. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 36(1): 1-11
- Krapfenbauer, Birnbacher K, Vierhapper, Herkner, Kampel D, Lubec G. 1998. Glycooxidation, and protein and DNA oxidation in patients with diabetes mellitus. Department of Internal medicine, Austria. *Clinical science*. 95:331-337.
- Loeber R, Rajesh M, Fang Q, Pegg AE, Tretyakova N. 2006. Cross linking of the human DNA repair protein O6-alkylguanine DNA alkyltransferase to DNA in the presence of 1,2,3,4 diepoxybutane. *Chem Res Toxicol*. 19(5): 645–654. doi: 10.1021/tx0600088
- Nay I, O'Connor TR. 2013. Direct Repair in Mammalian Cells. Dalam: Chen C (editor). *New Research Directions in DNA Repair*. Open access. ISBN 978-953-51-1114-6. DOI: 10.5772/54449
- Nurfaradilla SA. 2013. Optimasi dan validasi metode analisis O6 metilguanin dan N7 metilguanin secara kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem spektrometri massa [Skripsi]. FMIPA, Farmasi UI, Depok.
- Okoko T, Ibib FO. 2008. The effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on cisplatin-induced tissue damage in rats. *Biokemistri*. 20(2):47-52.

- Pazdro, Burgess JB. 2010. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mechanism of Ageing and Development*. 131 : 276-286.
- Povey AC. 2000. DNA adducts: Endogenous and induced. *Toxicol Pathol*. 28:405. DOI: 10.1177/019262330002800308
- Ravanat L. 2005. Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: an analytical challenge. *J. Pharm. Sci.* 30:100-113.
- Rytter E, Vessby B, Rikard A, Johansson C, Sjödin A, Abramsson-Zetterberg L, Möller L, Basu S. 2009. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well controlled type 2 diabetes subjects. *British Journal of Nutrition*. 101:1423–1426.
- Singletary KW, Kwan JJ, Giusti M. 2007. Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage. *J Med Food*. 10(2):244–251.
- Stirobova M, Frei E, Bieler CA, Schmeiser HH. 1998. ³²P-postlabelling: a sensitive technique for the detection of DNA adduct. *Chem. Listy* (92):661 – 668.
- Sturla SJ. 2007. DNA adduct profiles: chemical approaches to addressing the biological impact of DNA damage from small molecules. *Current Opinion in Chemical Biolog*. 11:293–299. DOI 10.1016/j.cbpa.2007.05.021
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*. 25(4):612-628.
- Wang LS, Stephen SH, Steven G., Carmella. 2009. Tumors in rats anthocyanins in black raspberries prevent esophageal. *Cancer Prev Res.* (2):84-93. DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-08-0155. Diakses dari cancer prevention research.aacrjournals.org pada 1 November 2012.

7 PEMBAHASAN UMUM

Tahap pertama penelitian adalah menentukan varietas rosela (merah atau ungu) dan alat pengering (*fluidized bed dryer* dan *cabinet dryer*) yang akan digunakan untuk tahap penelitian berikutnya (tahap 2 dan tahap 3). Hasil analisa kimia terhadap rosela kering dari kedua alat pengering menunjukkan terjadi penurunan kandungan antosianin, vitamin C dan kapasitas antioksidan pada rosela merah dan ungu dibanding dalam bentuk segarnya. Sementara data rosela ungu dan rosela merah segar memiliki data antosianin masing-masing 487.18 ± 27.26 ppm dan 255.83 ± 23.47 ppm, artinya rosela segar memiliki kandungan antosianin lebih dari 5 kali dari kandungan antosianin rosela ungu dan rosela merah kering masing-masing 95.41 ± 1.76 ppm dan 71.65 ± 1.72 ppm (*cabinet dryer*). Demikian pula kapasitas antioksidan kedua varietas (ungu dan merah) segar (580.29 ± 15.28 mg AEAC/100g dan 253.62 ± 15.41 mg AEAC/100g) mempunyai kemampuan antioksidan lebih dari lima kalinya dibanding dalam bentuk kering (91.57 ± 2.93 mg AEAC/100g dan 46.35 ± 2.02 mg AEAC/100g) dengan pengering *cabinet dryer*. Kandungan vitamin C rosela (ungu dan merah) segar memiliki kandungan lebih dari sepuluh kali rosela (ungu dan merah) kering. Penelitian ini menggunakan bentuk rosela kering karena penggunaan minuman rosela dalam masyarakat selama ini adalah dalam bentuk rosela kering. Jika menggunakan bahan segar maka dapat dinyatakan bahwa akan memberikan dampak lebih dari lima kalinya dibanding dalam kondisi kering.

Dari data pengeringan kedua variasi rosela (ungu dan merah) menunjukkan rosela ungu kering memiliki kandungan antosianin dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan rosela merah kering pada kedua alat pengering (*cabinet dryer* dan *fluidized bed dryer*). Bila dibandingkan pada dua alat pengering untuk rosela ungu kering, aktivitas antioksidannya lebih tinggi bila menggunakan alat pengering *fluidized bed dryer* dibandingkan dengan *cabinet dryer*, namun kandungan antosianin rosela ungu lebih tinggi bila menggunakan alat pengering *cabinet dryer*. Pada penelitian tahap 1, terpilih variasi rosela ungu dengan menggunakan alat pengering *cabinet dryer*. Pemilihan rosela ungu adalah karena kandungan antosianin dan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding rosela merah. Sementara pemilihan alat pengering *cabinet dryer* adalah berdasarkan kemudahan operasional dan biaya pengeringan yang lebih murah.

Tahap kedua penelitian adalah menunjukkan kemampuan senyawa aktif antioksidansi rosela terhadap penanda keparahan penyakit diabetes. Penelitian dilakukan secara *in vivo* menggunakan tikus *Sprague Dawley*. Tikus dibuat diabetes dengan menggunakan *streptozotosin* (STZ). Menurut Gayathri dan Kannabiran (2009) STZ menyebabkan destruksi permanen pada sel β pankreas. STZ juga tidak hanya merusak pankreas tapi juga merusak hati dan ginjal. STZ menginduksi diabetes melalui kerusakan sel beta pankreas yang menyebabkan insulin diproduksi secara parsial atau tidak diproduksi secara total lalu menyebabkan kekurangan insulin. Beberapa gejala diabetes seperti poliuria, polidipsia dan polipagia terjadi pada tikus yang mengalami diabetes. Poliuria ditandai dengan meningkatnya urin. Menurut Akbarzadeh *et al.* (2007) urin pada kelompok tikus diabetes mencapai 130 ± 5 ml dibanding kelompok tikus normal yang hanya 10 ± 1 ml/hari. Jumlah air minum kelompok tikus diabetes mencapai

145±5 ml dan kelompok tikus kontrol normal 30±5. Polipagia dilihat dari jumlah ransum kelompok negatif tikus diabetes (TNEG) lebih banyak dibanding kelompok tikus lainnya. Namun polipagia tidak diikuti dengan peningkatan berat badan, dimana kelompok tikus diabetes mengalami penurunan berat badan. Hal ini karena induksi tikus diabetes dengan STZ sel mengalami kekurangan energi karena kekurangan glukosa dan sel mengalami degradasi sel lemak melalui proses lipolisis yaitu pembongkaran lemak untuk menjadi energi.

Menurut Szkudelski (2001) induksi diabetes dengan STZ menyebabkan NIDDM (non insulin dependent diabetes mellitus) dan IDDM (insulin dependent diabetes mellitus). STZ menginduksi secara cepat dan membuat sel mengalami nekrosis secara *irreversible*. Pemberian dosis STZ 70-250 mg/Kg BB dapat menginduksi kerusakan sel pada semua spesies selama 24 jam (Arora *et al.* 2009). Pemberian dosis STZ antara 100-180 mg/Kg dapat menginduksi diabetes tipe 1 yang ditandai dengan meningkatnya gula darah secara signifikan dan menunjukkan adanya kerusakan produksi insulin. Sementara dosis rendah di bawah 40 mg/Kg BB dapat menginduksi diabetes tipe 2. Pada penelitian ini dosis yang digunakan adalah 30-35 mg/kg BB dan tikus mengalami diabetes setelah 24-36 jam. Artinya kemungkinan besar tikus pada penelitian ini mengalami diabetes tipe 2.

Senyawa *streptozotosin* merupakan salah satu zat diabetogenik yang bersifat toksik, terutama terhadap sel β pankreas. Kerusakan sel β pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi kondisi hiperglikemia). Mekanisme STZ dalam menginduksi diabetes melalui masuknya STZ ke dalam sel β melalui glukosa transporter (Glut 2) yang menyebabkan alkilasi molekul DNA dan menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA mengaktifasi ribosilasi poli ADP. Peristiwa ini menyebabkan berkurangnya NAD dan ATP sel. Meningkatnya defosforilasi ATP merupakan substrat bagi enzim *xanthine oxidase* yang akan menghasilkan banyak radikal seperti superoksida, H_2O_2 , dan hidroksil secara *in vivo*. STZ juga menghasilkan sejumlah nitrit oksida (NO) dalam tubuh yang akan menghambat enzim akonitase dan merusak DNA. Artinya penyakit diabetes dapat diawali oleh kerusakan sel β pankreas (DNA dirusak oleh ROS) dan kondisi ini dapat meningkatkan jumlah radikal bebas yang bila tidak dapat diimbangi dengan jumlah antioksidan dalam sel menyebabkan sel mengalami stres oksidatif. Yang termasuk radikal bebas adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang terdiri dari superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil (OH^\cdot), hidrogen peroksida (H_2O_2), nitrik oksida (NO) serta radikal peroksil ($RCOO^\cdot$). Produksi ROS berlebihan mengakibatkan stres oksidatif yang merusak transkripsi gen, ekspresi protein dan meningkatkan apoptosis sel β . Stres oksidatif mempunyai kemampuan penting dalam penyakit diabetes termasuk komplikasi pada vaskuler, mikrovaskuler dan jaringan spesifik. Menurut Kusano dan Ferari (2008) total antioksidan kapasitas menurun pada pasien dengan penyakit degeneratif seperti diabetes melitus, kanker, kolesterol karena jumlah radikal bebasnya tinggi.

Sari rosela diberikan pada tikus diabetes karena rosela mengandung senyawa antioksidan terutama antosianin dan vitamin C. Sari rosela yang diberikan pada tikus sesuai dosis harian yang diminum manusia yaitu 2g/200 ml yang diminum 2 kali/hari. Konversi berat badan 70 kg manusia, pada tikus BB 200 g adalah 0.018 (Bhardwaj dan Gupta 2012), jika asumsi setiap orang

mengonsumsi 2 gelas sehari (per gelas 200 ml) sehingga konversi dosis pada tikus menjadi $(2 \text{ gr} / 200\text{ml} \times 0.018 \times 400 \text{ ml}) / 200 \text{ g}$ BB tikus dan menjadi 72 mg/hari/200 g BB. Dosis 2 adalah dosis harian dikali 4 sehingga menjadi 288 mg/hari/200 g BB. Dosis ini jauh dari dosis toksik. Menurut Suwandi (2012) tikus *Sprague Dawley* yang diberi sari rosela dengan dosis 15 g/Kg BB yang diberikan secara oral melalui sonde lambung tidak menyebabkan toksik pada organ vital tikus dalam jangka waktu pendek (14 hari).

Pada percobaan ini digunakan kelompok tikus *glibenklamid* sebagai kelompok tikus kontrol positif. Dosis *glibenklamid* yang diberikan adalah 5mg x 0.018 menjadi 0.09 mg/hari/200 g BB. *Glibenklamid* adalah obat antidiabetes yang termasuk golongan *sulfonylurea*. Mekanisme kerja *glibenklamid* adalah merangsang sekresi hormone insulin dari granul sel β pankreas. Interaksinya dengan *ATP-sensitive K channel* pada membran sel β menimbulkan depolarisasi membran dan keadaan ini akan membuka *Ca Channel* dan dengan terbukanya *Ca channel* maka ion Ca^{2+} akan masuk ke dalam membran sel β kemudian merangsang granula yang berisi insulin dan terjadi sekresi insulin (Suherman 2007). Menurut Valverde *et al.* (2012) *glibenklamid* dan *glipizide* memiliki mekanisme yang sama dalam menurunkan gula darah melalui mekanisme stimulasi sekresi insulin. Dosis *glibenklamid* untuk diabetes melitus tipe 2 adalah 2.5-5 mg/ hari untuk orang dewasa bisa meningkat sampai 15 mg/hari, maksimum 20 mg/hari (Shrivastava 2012).

Diabetes Melitus dan ROS

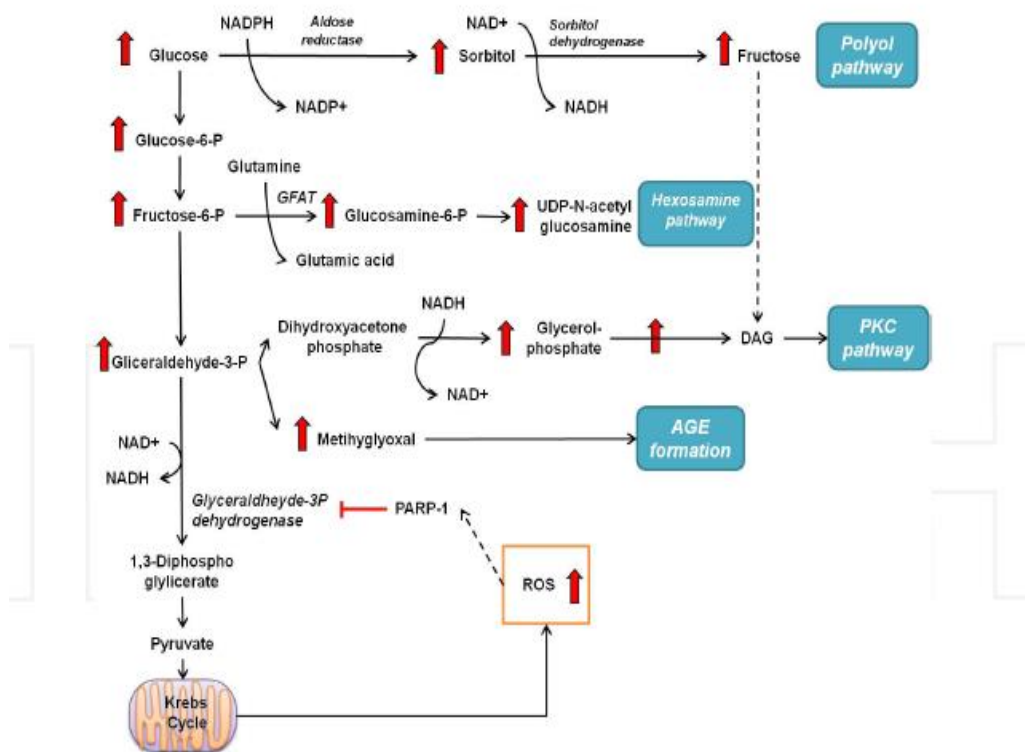
Penyakit diabetes bisa disebabkan oleh pola makan yang salah (konsumsi berlebih karbohidrat dan lemak) dan ROS. ROS dapat berasal dari endogenus (reaksi oksidatif mitokondria, enzim oksidatif, sel pagosit) maupun endogenus (polusi, xenobiotik, radiasi ion). Penyakit diabetes melitus ditandai dengan kerusakan sel β pankreas maupun kerusakan aksi dan sensitivitas insulin. Akibatnya banyak glukosa yang tidak dapat masuk ke dalam sel dan menimbulkan hiperglikemia. Kerusakan sel β pankreas dapat disebabkan oleh kerusakan secara autoimun (diabetes tipe 1) maupun kerusakan akibat ROS. Kerusakan ROS pada sel pankreas terutama pada DNA menyebabkan terjadinya *DNA adduct*, mengakibatkan kerusakan padareplikasi dan transkripsi DNA, menurunkan jumlah sel penghasil insulin. ROS juga dapat menginduksi inflamasi dan menyebabkan resisten insulin.

Konsumsi karbohidrat yang berlebihan dapat memicu hiperglikemia yang dapat meningkatkan proses glikolisis dan meningkatkan produksi berlebihan O_2^- , yang merupakan penyebab peningkatan ROS. Kelebihan glukosa pada intrasel meningkatkan radikal superoksida yang dibentuk dalam mitokondria pada rantai transpor elektron. Pada kondisi normal superoksida dibentuk dengan laju rendah. Peningkatan glukosa intraseluler menyebabkan pembentukan donor elektron yang melimpah pada siklus Krebs yang mengakibatkan meningkatnya ROS (Zozulinska dan Wysocka 2005).

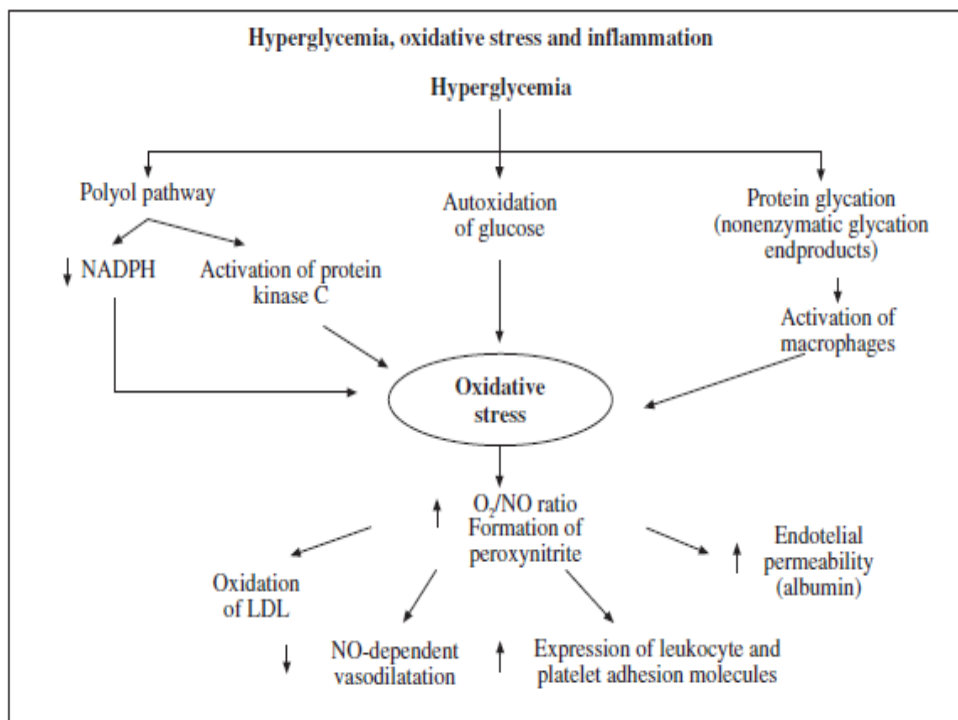
Hiperglikemia akan menyebabkan beberapa jalur metabolisme karbohidrat yang dapat meningkatkan stres oksidatif. Jalur pertama adalah melalui jalur poliol yang menyebabkan akumulasi sorbitol, yang menurunkan rasio NADPH/NADP dan meningkatkan NADH/NAD. Penurunan NADPH dalam sel menurunkan

nitric oxide (NO) dalam sel dan dapat merusak keseimbangan redoks dalam sel. Jalur kedua, hiperglikemia meningkatkan glikasi non enzimatis (*Advanced Glycation end products* (AGEs)). Pembentukan dan deposisi molekul *Advanced Glycation End products* (AGEs) merupakan hasil dari glikasi protein dan gula atau lipid akibat peningkatan kadar glukosa darah. Intermediat dari proses glikolisis merupakan bahan baku AGEs yang terbentuk melalui reaksi *Maillard*. Reaksi antara kondensasi grup karbonil gugus gula dengan N terminal dari grup amino protein seperti lisin dan arginin membentuk intermediate *Schiff base* membentuk *protein glucose adduct*. AGEs terbentuk dari senyawa karbonil dari gula non enzimatis bereaksi dengan asam amino dari protein. Senyawa dikarbonil seperti *glyoxal*, *methylglyoxal* (MG), dan *3-deoxyglucosone* berinteraksi dengan protein seluler membentuk AGEs. Senyawa dikarbonil dibentuk dari autooksidasi glukosa maupun lipid peroksida. *Methylglyoxal* terbentuk dari gliseraldehid 3 fosfat dan dihidroksiaseton fosfat yang bereaksi dengan grup arginin membentuk AGEs. Senyawa karbonil juga terbentuk dari lipid peroksida yang bereaksi dengan protein membentuk *advanced lipoxidation end products*. Secara normal senyawa AGEs dibentuk dalam tubuh tapi jumlahnya meningkat pada kondisi hiperglikemia dan hiperlipidemia. Secara eksogenus, AGEs dapat dibentuk dari asap rokok, makanan yang diproses dengan panas tinggi, makanan tinggi lemak dan protein. Dalam penelitian ini tidak diteliti mengenai AGEs.

Reseptor AGE (RAGE) diekspresikan pada berbagai organ dan sel, termasuk sel endotel, sel otot polos vaskuler dan makrofag. AGEs dapat berkemampuan sebagai oksidan dan menyebabkan pembentukan ROS. AGEs adalah protein yang mengalami glikasi secara non enzimatis yang dapat meningkatkan ROS melalui pengikatan reseptor untuk AGEs (RAGE) dan aktivasi NADPH oksidase. NADPH oksidase adalah enzim yang dapat meningkatkan produksi ROS. Ikatan AGEs pada RAGE memicu pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler, yang selanjutnya akan mengaktifasi *NF- κ B*. Aktivasi akan *NF- κ B* meningkatkan ekspresi berbagai sitokin seperti *tumour necrosis factors* (TNF- α dan TNF- β), interleukin (IL) 1, 6, 8 dan 18 dan interferon- γ (Wright 2006), termasuk mengekspresikan sejumlah gen seperti molekul *adhesion* (VCAM = vascular cell adhesion molecule, dan ICAM = Intracellular adhesion molecule), meningkatkan NO (*nitric oxide*) dan stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan organ (Giriwono *et al.* 2011). AGEs meningkatkan ROS dan mengaktifkan sinyal kaskade inflamasi (Jakus *et al.* 2012). Rosela kemungkinan mempengaruhi ekspresi genetik *NF- κ B* yang berkaitan dengan inflamasi, namun dalam penelitian ini belum dikaji. Sesuai dengan Gambar 2 kaitan antara hiperglikemia, stres oksidatif dan inflamasi dimana kerusakan akibat penyakit diabetes melitus akan menyebabkan terjadinya penyakit yang lain (jantung, hipertensi, obesitas) yang berawal dari hiperglikemia.



Gambar 1. Metabolisme glukosa pada kondisi hiperglikemia yang menghasilkan ROS (Luisa *et al.* 2013).



Gambar 2. Hubungan antara hiperglikemia, stres oksidatif dan inflamasi (Vidigal *et al.* 2012).

Jalur ketiga, hiperglikemia menginduksi ekspresi jalur PKC. Pembentukan DAG dan akumulasi *AGEs* juga dapat mengaktifkan PKC. Aktivasi PKC menyebabkan perkembangan komplikasi melalui perusakan ekspresi gen dan fungsi protein yang berkontribusi pada disfungsi dan kerusakan sel. Aktivasi PKC dalam vaskuler berhubungan dengan peningkatan sintesis protein matriks, aktivasi leukosit, aktivasi dan proliferasi sel endothelial, kontraksi sel otot halus, permeabilitas endothelial, aktivasi sitokin, pembentukan *tumor growth factor- β* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan angiogenesis. PKC menginduksi enzim NADPH oksidase yang berkemampuan memproduksi superoksida.

Pengukuran Penanda Stres Oksidatif

Hasil penapisan fitokimia sari rosela ungu dengan air menunjukkan bahwa sari rosela ungu mengandung flavonoid (antosianin), fenol hidrokinon, steroid, saponin, tanin dan triterpenoid. Antosianin merupakan sub grup flavonoid, yang termasuk dalam kelompok polifenol. Mekanisme polifenol sebagai antioksidan adalah dapat menetralkan radikal bebas melalui donor elektron atau atom H, menekan laju oksidasi melalui penghambatan pembentukan prekursor radikal bebas, mampu berperan sebagai *scavenger* pada reaksi berantai lipid peroksida radikal melalui donasi proton sehingga ROS lebih stabil dan reaksi dapat dihentikan. Polifenol juga mampu berkemampuan sebagai *metal chelator*, yang mampu mengkelat ion Fe^{2+} sehingga secara tidak langsung menurunkan reaksi Fenton dan mencegah oksidasi yang disebabkan oleh meningkatnya radikal hidroksil. Polifenol juga mampu menginduksi enzim antioksidan seperti glutathion peroksidase, katalase dan superoksida dismutase (SOD) dan menghambat ekspresi enzim xantin oksidase (Tsao 2010).

Antosianin diketahui dapat diabsorpsi dalam bentuk molekul utuh dalam lambung (Passamonti *et al.* 2003), meskipun absorpsinya jauh dibawah 1%, antosianin setelah ditransfer ke tempat yang memiliki aktivitas metabolik tinggi memperlihatkan aktivitas sistemik seperti antineoplastik, antikarsinogenik, antiatherogenik, antiviral, dan efek anti inflamasi, menurunkan permeabilitas dan fragilitas kapiler dan penghambatan agregasi platelet serta immunitas, semua aktivitas ini didasarkan pada kemampuannya sebagai antioksidan (Clifford *et al.* 2000; Middleton *et al.* 2000).

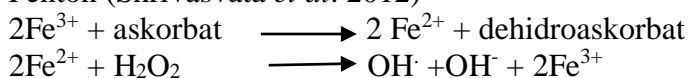
Pengukuran level marker oksidatif penting untuk mendeteksi proses metabolisme yang menyebabkan penyakit kronis. Evaluasi stres oksidatif menjadi penting untuk mengetahui mekanisme dan implikasi biologis pada kerusakan oksidatif, seperti pengukuran produk lipid peroksida yaitu malonaldehid dan kapasitas antioksidan. Pengukuran kapasitas antioksidan total adalah untuk mengukur sejauh mana komponen bioaktif yang ada dalam sari rosela dapat meningkatkan kapasitas antioksidan dalam tubuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sari rosela yang diberikan pada tikus diabetes selama 21 hari mampu meningkatkan kapasitas antioksidan sebesar $0.2655 \pm 0.0016 \text{mM}$ dibanding kelompok tikus control negative (TNEG) yaitu $0.0893 \pm 0.0134 \text{mM}$, dan kelompok tikus preventif dapat meningkatkan kapasitas antioksidan sebesar $0.2318 \pm 0.0038 \text{mM}$, sementara kelompok tikus *glibenklamid* sebesar $0.2109 \pm 0.0055 \text{mM}$. Artinya rosela mampu

meningkatkan kapasitas antioksidan pada tikus diabetes, sehingga dapat dinyatakan rosela mampu menurunkan stres oksidatif karena dapat meningkatkan antioksidan seluler untuk mengimbangi jumlah radikal bebas yang meningkat akibat penyakit diabetes.

Marker stres oksidatif lainnya adalah *DNA adduct* dan lipid peroksida malonaldehid (MDA) (Vincent *et al.* 2004; Pazdro dan Burgess, 2010). MDA adalah suatu senyawa yang sangat reaktif yang merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid, dan biasanya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif. Peroksidasi (autooksidasi) lipid khususnya asam lemak tak jenuh ganda adalah suatu reaksi berantai radikal bebas. Reaksi tersebut dicetuskan oleh sebuah senyawa radikal bebas, yaitu radikal hidroksil (OH^\cdot) yang mengambil satu hidrogen dari lemak *polyunsaturated* (LH) yang banyak terdapat pada membran sel sehingga terbentuk radikal lemak (L^\cdot) yang setelah melalui beberapa proses maka terbentuklah MDA, 9-hidroksi-nonenal, etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}) suatu radikal bebas yang merupakan metabolit reaktif peroksidasi lipid sehingga dapat digunakan sebagai indeks peroksidasi lipid. Proses lipolisis dalam sel adiposa menyebabkan banyak terdapat asam lemak bebas yang berkemampuan pada pembentukan malonaldehid. Hasil MDA pada hati dan ginjal menunjukkan sari rosela dapat menurunkan peroksidasi lemak, secara statistik data MDA ginjal signifikan namun pada MDA hati tidak signifikan.

Pembentukan *DNA adduct* terjadi karena STZ memetilasi DNA dan DNA yang termetilasi akan menyebabkan kerusakan sel β . Kondisi hiperglikemia menyebabkan meningkatkan ROS yang akan berinteraksi dengan DNA menyebabkan modifikasi DNA. Hasil analisa menunjukkan tidak ada pengaruh sari rosela terhadap kandungan N7 metilguanin antar kelompok perlakuan. Hal ini mungkin karena jumlah sampel yang terlalu sedikit ($50 \mu\text{l}$), sementara jumlah *DNA adduct* yang terbentuk sangat kecil sehingga tidak terdeteksi. Walaupun tidak terdeteksi, namun pembentukan *DNA adduct* ini sangat berpengaruh pada perkembangan penyakit yang lain. Pembentukan yang kecil saja *DNA adduct* dan terjadi pada gen pertumbuhan maka pembentukan *DNA adduct* ini dapat menyebabkan penyakit kanker.

Peningkatan kapasitas antioksidan pada perlakuan dengan pemberian rosela disebabkan oleh kemampuan antosianin, dimana antosianin paling banyak ditemukan pada rosela. Selain kemampuan antosianin dan senyawa fitokimia lainnya termasuk juga vitamin C yang terdapat pada rosela. Vitamin C dan vitamin E dapat meningkatkan respon insulin dan mereduksi stres oksidatif pada penderita diabetes (Vincent *et al.* 2004). Vitamin C merupakan senyawa pereduksi dan mampu menetralkan ROS seperti hidrogen peroksida yang merupakan mediasi proses glikasi protein yang mampu merusak sel β pankreas dan menurunkan massa sel β pada diabetes melitus tipe 2 serta vitamin C mampu mengkelat unsur logam yang mampu menghasilkan radikal bebas melalui reaksi Fenton (Shrivastava *et al.* 2012)



Vitamin C, vitamin E dan vitamin A mampu mereduksi kerusakan pada hewan percobaan yang mengalami *ischemia* dan *perfusion* yang menghasilkan

radikal bebas, diantaranya mereduksi jumlah 4HNE (4-hydroxy-nonenal) dan terbentuknya TBARS (*thiobarbituric acid reacting substances*) pada jaringan hati (Bartels *et al.* 2007). Menurut Rytter (2011) vitamin C mampu menurunkan jumlah senyawa akibat peroksidasi lemak (MDA) dan mengurangi kerusakan DNA oksidatif (8OHdG). Selain itu vitamin C dapat meningkatkan kontrol glikemik pada penderita diabetes melitus tipe 2.

Resisten Insulin dan Inflamasi

Aksi insulin diinisiasi oleh pengikatan spesifik antara insulin dan reseptor insulin yang memiliki afinitas kuat pada membran plasma pada sel target. Reseptor insulin adalah glikoprotein transmembran yang memiliki 2 unit α dan β membentuk heterotetramer. Insulin berikatan pada gugus α ekstraseluler. Insulin berikatan dengan reseptor yang menyebabkan terjadinya autofosforilasi pada reseptor yaitu adanya perubahan konformasi yang membuat subunit α mendekat dan autofosforilasi residu tirosin pada subunit β . Subunit β memiliki aktivitas intrinsik seperti tirosin kinase. Fosforilasi gugus tirosin pada *IRS (Insulin Receptor Substrate)* dan selanjutnya akan menurunkan aktivasi dari phosphoinositol-3 kinase dan menyebabkan translokasi glukosa dari ekstrasel ke intrasel oleh transporter glukosa (GLUT4). Fosforilasi *IRS (insulin receptor substrate)* menginisiasi sinyal kaskade kompleks. Protein fosfatidilinositol 3 OH kinase (P13K) menggerakkan aksi metabolik melalui aktivasi serin/treonin kinase termasuk protein kinase β (PK β). PK β ini menstimulasi pengambilan glukosa masuk ke dalam sel, melakukan sintesis glikogen, sintesis trigliserida, menekan glukoneogenesis, meningkatkan sintesis asam lemak dan trigliserida serta menekan lipolisis dalam jaringan adiposa (Chang dan Chuang 2010).

Hasil penelitian pemberian rosela pada tikus percobaan menunjukkan terjadi peningkatan insulin pada kelompok tikus rosela dosis 1 dan dosis 2 (TROS1 dan TROS2), namun peningkatan ini tidak berkorelasi dengan penurunan kadar glukosa darah. Hasil penelitian Mardiah *et al* (2010) pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan menunjukkan hasil peningkatan jumlah sel β pankreas sebesar (24.8) dibanding kontrol (6.6) yang mengindikasikan pembentukan insulin yang lebih banyak pada tikus diabetes yang diberi rosela karena peningkatan jumlah sel β penghasil insulin. Peningkatan jumlah sel β berkaitan dengan adanya faktor transkripsi pembentukan sel β dan *DNA repair* yang disebabkan oleh konsumsi sari rosela. Namun penelitian mengenai masalah ini juga belum dikaji. Peningkatan insulin yang tidak mampu menurunkan kadar glukosa darah mengindikasikan terjadinya resisten insulin yang menjadi ciri diabetes melitus tipe 2. Resisten insulin adalah penurunan kemampuan insulin untuk membawa glukosa pada sel otot dan sel adipose dan menurunkan kemampuan hati untuk menghasilkan glukosa (Oever *et al.* 2010).

Kejadian resisten insulin bisa disebabkan oleh kerusakan reseptor insulin atau kerusakan insulin sendiri (Draznin 2006). Resistensi insulin dapat terjadi melalui beberapa jalur. Pertama, kondisi diabetes melitus membuat tubuh mengalami proses lipolisis. Akibatnya terjadi peningkatan lemak intermediet seperti diasilgliserol, *ceramid* dan koenzim A asam lemak dan ini juga terjadi pada orang dengan kondisi obesitas. Resistensi insulin selalu dihubungkan dengan obesitas dan tingginya asam lemak bebas pada otot (Chang dan Chuang 2010).

Menurut Cefalu (2009) senyawa intermediat lemak seperti diasilgliserol dapat mengaktifkan protein kinase C yang mampu menghambat fosforilasi tirosin pada reseptor insulin (IR) dan substrat reseptor insulin (IRS) yang dapat menyebabkan resisten insulin. Secara normal, sinyal reseptor insulin terjadi melalui kaskade tirosin kinase. *Ceramid* dapat mengaktifkan protein fosfatase yang dapat menghilangkan fosforilase protein kinase β , yang menyebabkan penghambatan translokasi *Glut 4* dan sintesis glikogen.

Jalur kedua melalui peningkatan senyawa inflamasi sitokin seperti *IL-6* dan *TNF- α* yang meningkat pada penyakit diabetes. Menurut Sattar *et al.* (2003) *TNF- α* dan *IL-6* meningkat pada tikus dengan kondisi obesitas dan resisten insulin. *IL-6* menginduksi sejumlah reseptor *glukokortikoid*, meningkatkan sirkulasi konsentrasi glukagon dan efek parakrin pada adiposa untuk menurunkan aksi insulin. *TNF- α* dapat berfungsi sebagai mediator resisten insulin karena sitokin ini bisa merusak insulin reseptor (IR) dan insulin reseptor substrat (IRS) yang kemudian dapat menghambat sinyal insulin. *TNF- α* menstimulasi ekspresi *SOCS* (suppressor of cytokine signaling) yang mengikat *IRS1* dan *IRS2* dan memediasi kerusakannya (Virgolici *et al.* 2008). Akibatnya insulin tidak dapat mengambil glukosa ke dalam sel otot dan jaringan adipose lalu terjadi peningkatan kadar glukosa pada plasma darah. Sebagai kompensasinya, sel β pankreas akan memproduksi insulin secara berlebihan dan menyebabkan hiperinsulinemia, dan kondisi ini dapat menyebabkan inflamasi vaskuler dan selanjutnya terjadi resisten insulin (Oever *et al.* 2010; Badawi *et al.* 2010). Proinflamasi sitokin menghambat sinyal insulin melalui aktivasi reseptor kinase inhibitor. *TNF- α* menghambat sinyal transduksi insulin dan dapat menurunkan sekresi insulin (Yimagou *et al.*, 2013).

Jalur ketiga adalah melalui pembentukan glikasi protein pada insulin yang menyebabkan resisten insulin. Glikasi protein terjadi melalui pengikatan metilglioksal dengan asam amino arginin pada insulin menyebabkan resisten insulin dan mengurangi pengambilan glukosa ke dalam sel terjadi (Song dan Schmidt 2012). Menurut Hunter *et al.* (2003) sekitar 10-20% insulin dan proinsulin yang disintesis dari sel pankreas maupun selama penyimpanan mengalami glikasi insulin. Glikasi insulin meningkat pada kondisi hiperglikemia maupun obesitas. Sekitar 9% insulin yang beredar pada pasien diabetes berada pada bentuk terglykasi. Glikasi insulin menyebabkan kerusakan aksi insulin.

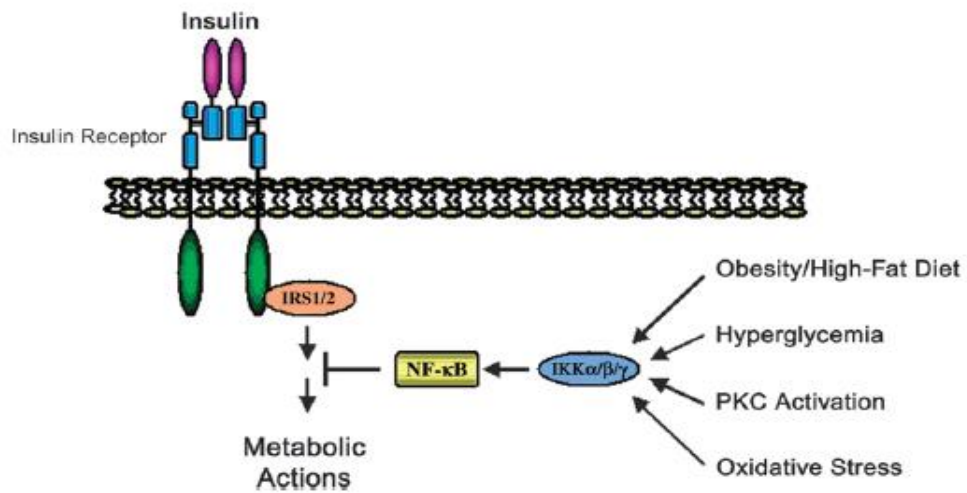
Kondisi hiperglikemia menyebabkan kerusakan respon imun yang dapat memicu inflamasi melalui aktivasi *Toll Like Receptor* (TLRs) 2 dan 4 yang dapat meningkatkan sekresi proinflamasi sitokin seperti interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), *tumor necrosis alpha* (TNF- α), *interferon γ* (IFN γ) (Mahardhika *et al.* 2004; Rytter *et al.* 2009). *TLRs* dan pelekatan sitokin pada reseptor dapat mengaktifasi *cJNK* (c Jun N terminal kinase) dan *IKK β* (inhibitor kB kinase β) dan selanjutnya mengaktifkan *NF- κ B* dan kaskade inflamasi yang dapat memblokir fosforilasi *IRS* pada residu tirosin dan menyebabkan resisten insulin (Yimagou *et al.* 2013). *TLRs* diekspresikan oleh sel makrofag, sel mastosit dan sel dendrite (Vidigal *et al.* 2012). Senyawa sitokin inflamasi yang dihasilkan ini dapat meningkatkan resisten insulin (Badawi *et al.* 2010).

Pada tikus diabetes (TNEG) jumlah insulin paling sedikit dan kadar senyawa inflamasi *TNF- α* dan *IL-6* paling tinggi diantar kelompok tikus lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan senyawa inflamasi *TNF- α* menyebabkan

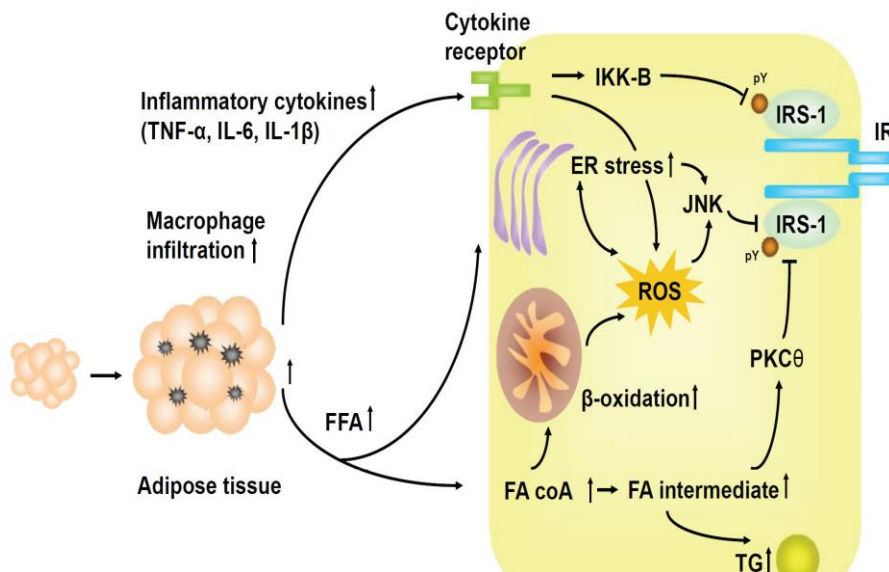
terjadinya apoptosis sel β . Konsentrasi inflamasi yang tinggi dapat menyebabkan apoptosis pada sel β yang dapat menyebabkan berkurangnya jumlah sel penghasil insulin dan menyebabkan insulin berkurang (Badawi *et al.* 2010; Donath *et al.* 2009). Sitokin mengaktifkan *IKK β* (inhibitor κ B kinase β) dan *NF- κ B* yang akan menginduksi kerusakan sel β dan menyebabkan sel β mengalami apoptosis (Lee and Simin Liu, 2008). Menurut Donath *et al.* (2009) diabetes melitus tipe 2 tidak selalu dicirikan oleh resisten insulin namun juga karena kerusakan sel β untuk memproduksi insulin. Pada tahap awal diabetes, dihasilkan sejumlah insulin untuk mencukupi kebutuhan. Namun ketika diabetes berlanjut terjadi proses inflamasi pada pulau langerhan pankreas yang dapat menginduksi apoptosis sel β . Peningkatan kadar gula juga menginduksi *IL-1 β* , senyawa inflamasi di sejumlah jaringan dalam tubuh yang berperan dalam apoptosis sel β . Demikian juga asam lemak rantai panjang juga menginduksi sitokin *IL-1 β* , *IL-6* dan *IL-8* (Cefalu 2009).

Jalur keempat, ROS yang dihasilkan dari metabolisme mitokondria juga dapat menyebabkan resisten insulin. ROS dapat mengaktifkan *cJNK* (c jun N terminal kinase) suatu *stres sensitive serin/treonin kinase*, yang mampu menyebabkan fosforilasi residu serin pada *IRS* dan hal ini menyebabkan menurunkan kemampuan untuk difosforilasi oleh tirosin kinase pada reseptor insulin dan memblokir langsung sinyal insulin dan menyebabkan resisten insulin. Selain itu oksidan juga dapat meningkatkan degradasi protein *IRS*. Lebih lanjut dinyatakan ROS dapat mengaktifkan *NF- κ B* dan meningkatkan ekspresi gen proinflamasi seperti *TNF- α* , *IL-6* dan *C reactive protein* (Wu dan Gourvey 2010)

Resisten insulin dapat diminimalkan dengan perlakuan antioksidan. Menurut Chang dan Chuang (2010) perlakuan tikus yang diberi diet lemak tinggi dan diberi antioksidan, terjadi peningkatan ekspresi katalase dan SOD pada mitokondria dan menyebabkan penurunan ROS dan resisten insulin. Pemberian rosela dosis 1 dan dosis 2 pada tikus diabetes cenderung menurunkan kadar senyawa inflamasi (*TNF- α*) yang merupakan salah satu penyebab resisten insulin. Pada Gambar 1 Bab 4 gula darah tidak turun namun produksi insulin meningkat. Hal ini menunjukkan adanya resisten insulin. Sehingga diharapkan dengan adanya penurunan senyawa inflamasi, maka terjadi peningkatan sensitifitas reseptor insulin dan perbaikan pengambilan gula darah ke dalam sel. Penurunan inflamasi dalam sel β pankreas erat hubungannya dengan peningkatan sintesis proinsulin menjadi insulin dan meningkatkan sensitivitas insulin dan massa sel β pankreas (Donath *et al.* 2009).

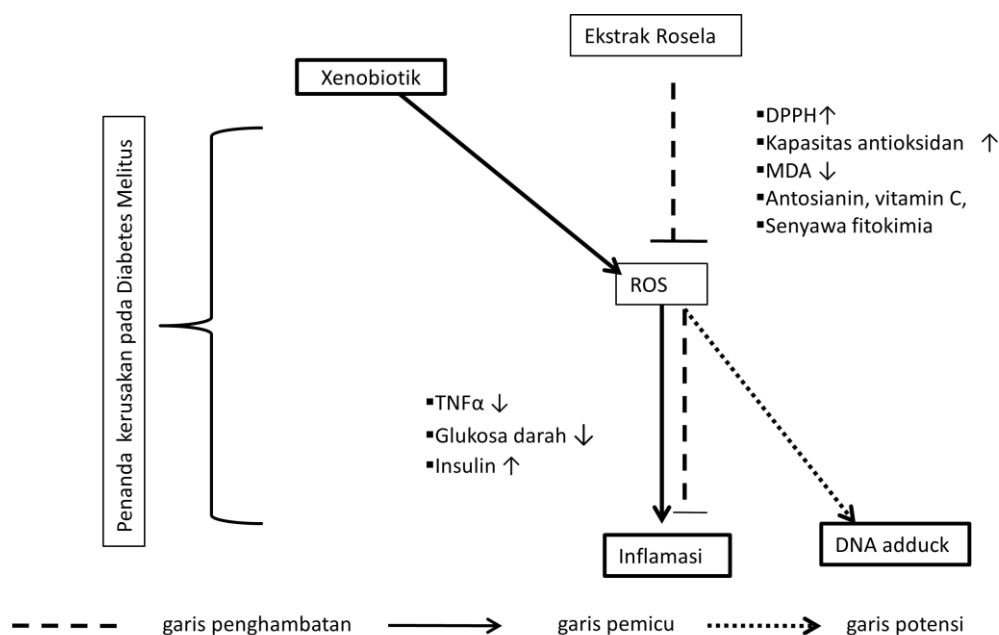


Gambar 3. Jalur penghambatan insulin melalui kerusakan reseptor insulin (King G.L. 2008)



Gambar 4. Mekanisme terjadinya resistensi insulin (Chang dan Chuang 2010).

Dari beberapa tanda stres oksidatif yang diuji pada penelitian ini maka dapat digambarkan pengaruh sari rosela dalam menurunkan penanda keparahan diabetes melitus pada tikus percobaan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh sari rosela dalam menurunkan penanda penyakit diabetes melitus pada tikus percobaan

Rosela ungu memiliki sejumlah antioksidan seperti antosianin, vitamin C, tannin, saponin, fenol hidroquinon seperti terlihat pada Bab 3 Tabel 1 dan Tabel 2, yang mampu meningkatkan antioksidan DPPH dan total antioksidan status yang diamati pada Bab 4 Tabel 1, dan menurunkan MDA pada ginjal dan hati sebagai marker adanya kerusakan lemak akibat stres oksidatif. Rosela mampu memperbaiki kerusakan sel β pankreas yang dapat dibuktikan dengan peningkatan jumlah insulin sebesar 0.4433 ± 0.1802 ng/ml untuk sari rosela 72 mg/hari/200 g BB dan 0.2918 ± 0.1083 ng/ml untuk sari rosela 288 mg/hari/200 g BB dan penurunan kadar gula pada pemberian sari rosela 288 mg/hari/200 g BB. Rosela juga cenderung menurunkan senyawa inflamasi $TNF-\alpha$ yang juga menjadi salah satu penyebab resisten insulin penanda penyakit diabetes melitus tipe 2.

Daftar Pustaka

- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi SH, Farhangi A, Verdi AA, Mofidian SMA, Lame Rad B. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22 (2) :60-64.
- Arora S, Ojha SK, Vohora D. 2009. Characterisation of streptozotocin induced diabetes melitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology*. 3 (2): 81-84.
- Badawi A, Klip A, Haddad P, Bailo BG, El-Soheymy A, Karmali M. 2010. Type 2 diabetes melitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Journal Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 3: 173-186.
- Bartels M, Vilsendorff AM, Kassahun WT, Gerstenbergk BV, Engelhart K, Vilsendorff EMZ, Fabers S, Biesalski H. 2007. Protective effect of

- antioxidative vitamins against lipid peroxidation in liver ischemia and reperfusion – an animal experimental study. *EXCLI Journal*. (6):152-166.
- Bhardwaj S, Gupta D. 2012. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. *IJARPB*. 1(2):103-129.
- Cefalu WT. 2009. Inflammation, Insulin Resistance, and Type 2 diabetes: Back to the Future?. *Diabetes*. 58 : 307-308.
- Chang YC, Chuang LM. 2010. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res*. 2(3):316-331.
- Clifford MN. 2000. Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 :1063–1072.
- Dahiru D, Obiand H, Umaru H. 2003. Effect of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract on carbon tetrachloride induced liver damage. *Biokemistri*. 15(1): 27-33.
- Donath, Marc Y, Marianne BS, Helga E, Jan AE. 2009. Islet inflammation impairs the pancreatic β -Cell in Type 2 diabetes. *Physiology*. 24: 325–331.
- Draznin B. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85_the two sides of a coin. *Diabetes*. 55: 2392- 2397
- Gayathri M, Kannabiran K. 2009. The Effects of oral administration of an aqueous extract of *Ficus bengalensis* stem bark on some hematological and biochemical parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Turk J Biol*. 33: 9-13.
- Giriwono PE, Shirakawa H, Hokazono H, Goro T, Komai M. 2011. Fermented barley extract supplementation maintained antioxidative defense suppressing lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 75(10):1971-1976.
- Hunter SJ, Boyd AC, O'Harte FPM, McKillop AM, Wiggam MI, Mooney MH, McCluskey JT, Lindsay JR, Ennis CN, Gamble R, *et al.* 2003. Demonstration of glycated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans. *Diabetes*. 52:492-498.
- Jakus V, Šandorova E, Kalninova J, Krahulec B. 2012. Monitoring of glycation, oxidative stress and inflammation in relation to the occurrence of vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. Report of research. Faculty of Medicine Comenius University. Slovak Republic
- King GL. 2008. The Role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*. 79 (8):1527-1534.
- Kusano C, Ferrari B. 2008. Total antioxidant capacity: a marker in biomedical and nutritional studies. *J. of Cell and Molecular Biology*. 7(1):1-15.
- Lee CC, Simin Liu. 2008. Role of inflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Review of Endocrinology*. Hal. 19 -21.
- Luisa M, Monroy L de la V, Mejia CF. 2013. Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant actions. <http://dx.doi.org/10.5772/51788>
- Mahardhika E, Dharmana R, Djokomoeljanto. 2004. Status zinc dan imunitas selular pada pasien DM Tipe 2 regulasi glukosa darah baik dan buruk: Fokus pada jumlah limfosit dan fungsi fagositosis. *M. Med Indonesiana*, 39(2): 80-85.

- Mardiah, Noli N, Irwan. 2010. Potential of roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) as antidiabetic. Prosiding dalam seminar International Pangan Fungsional, Bali
- Middleton EC, Kandaswami, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52:673–751.
- Oever I, Raterman A, Nurmohamed MT, Simsek S. 2010. Endothelial dysfunction, inflammation and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*. hal 1-15. Doi:10.1155/2010/792393.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. 2003. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*. 544. 210–213.
- Pazdro, Burgess JB. 2010. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mechanism of Ageing and Development*. 131 : 276-286.
- Rytter E, Vessby B, Rikard A, Johansson C, Sjödin A, Abramsson-Zetterberg L, Möller L, Basu S. 2009. Glycaemic status in relation to oxidative stress and inflammation in well-controlled type 2 Diabetes subjects. *British Journal of Nutrition*. (101):1423–1426.
- Rytter E. 2011. Effect of dietary antioxidants on oxidative stress, inflammation and metabolic factors. [Disertasi]. Fakultas Kedokteran Uppsala Universitet, Swedia.
- Sattar N, Perry C, Petrie JR. 2003. Type 2 diabetes as an inflammatory disorder. *Br J Diabetes Vasc Dis*. 3:36–41.
- Shrivastava D. 2012. Transdermal approach of antidiabetic drug glibenclamide: A review. *World Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences*. 1(2):532-544
- Song F, Schmidt AM. 2012. Glycation and insulin resistance: Novel mechanisms and unique targets? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32:1760-1765. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241877.
- Suwandi T. 2012. Pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) terhadap streptococcus sanguinis penginduksi gingivitis menuju obat herbal terstandar. [Disertasi]. Fakultas Kedokteran Gigi UI, Jakarta.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. 50(6):537-546.
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenol. *Nutrients*. 2:1231-1246.
- Valverde LF, Cedillo FD, Ramoz ML, Cervera EG, Gomez EP, Arredondo CC, Leon GA. 2012. Glibenclamide-pregnenolone derivative has greater hypoglycaemic effects and biodistribution than glibenclamide-OH in alloxan rats. *Biomed Pap Med Fac. Univ palacky Olomouc Czech Repub*. 156(2):122-127.
- Vidigal FC, Cocate G1, Pereira LG, Alfnas CG. 2012. The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process. *Nutr Hosp*. 27(5):1391-1398.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*. 25(4):612-628.

- Virgolici B, Mohora M, Gaman L, Lixandru D, manolescu B, Coman A, Stoian I. 2008. Relation between inflammation and oxidative stres markers in diabetic foot patients. *Romanian J.Biophys.* 18(4): 273–282.
- Wu X, Gourvey WT. 2010. Insulin Action. Didalam: Holt RIG, Cokram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ,editor. Textbook of Diabetes. Ed ke-4. UK:A John Wiley&Sons, Ltd.
- Yimagou EL, Songwi E, Matsha TE, Kengne AP. 2013. Diabetes mellitus and Inflammation. *Curr Diab Rep.* DOI 10.1007/s11892-013-0375-y
- Zozulińska D, Wysocka BW. 2005. Hyperglycaemia and inflammation are culprits of late diabetic complications. *Arch Med Sci.* 1(2): 115-118.

8 SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Penelitian tahap pertama menghasilkan rosela kering dari dua varietas yaitu rosela ungu dan rosela merah yang menggunakan dua alat pengering yaitu *fluidized bed dryer* dan *cabinet dryer*. Rosela kering yang dihasilkan memiliki kapasitas antioksidan, vitamin C, dan kandungan antosianin lebih kecil dari rosela segar. Dari dua alat pengering yang digunakan, varietas rosela ungu dengan pengering *cabinet dryer* memiliki kandungan antosianin (95.41 ± 1.76 ppm) lebih tinggi dari rosela ungu yang menggunakan *fluidized bed dryer* (75.99 ± 1.85 ppm). Namun rosela ungu yang dikeringkan dengan *fluidized bed dryer* memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan menggunakan *cabinet dryer*. Varietas rosela terpilih dalam penelitian ini adalah rosela ungu dimana kandungan antosianin dan kapasitas antioksidan lebih tinggi dari kelopak rosela merah. Pemilihan alat pengering yang digunakan adalah *cabinet dryer* karena alat pengering ini operasionalnya mudah dan biayanya relatif lebih murah dibanding *fluidized bed dryer*. Hasil penapisan fitokimia secara kualitatif rosela merah dan rosela ungu memiliki kandungan flavonoid, fenol hidroquinon, steroid, triterpenoid, tanin dan saponin, bedanya pada rosela ungu tidak terdeteksi adanya senyawa alkaloid, sementara pada rosela merah ada senyawa alkaloid.

Tahap kedua penelitian menggunakan tikus *Sprague Dawley* untuk menguji sari rosela sebagai antidiabetik. Pengujian pada kadar gula darah menunjukkan pemberian rosela 288 mg/hari/200 g BB mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes. Namun pada kelompok tikus yang diberi rosela 72 mg/hari/200 g BB mengalami penurunan pada satu minggu setelah tikus mengalami diabetes dan mengalami peningkatan kadar gula lagi pada minggu ketiga dan keempat. Hal yang sama terjadi pada kelompok tikus yang diberi *glibenklamid*. Kelompok tikus negatif (TNEG) yang mengalami diabetes cenderung banyak makan, namun berat badan cenderung menurun. Sementara kelompok tikus diabetes yang diberi rosela cenderung stabil pertumbuhan berat badannya.

Tahap ketiga adalah untuk mengetahui peran rosela dalam memperbaiki penanda pada penyakit diabetes melitus. Parameter pengujian insulin adalah untuk mengetahui adanya perbaikan pada sel β pankreas. Kelompok tikus diabetes yang diberi rosela 1 memiliki kandungan insulin 0.4433 ± 0.1802 ng/ml berbeda nyata dengan kelompok tikus negatif yaitu 0.1286 ± 0.0337 ng/ml. Pengujian parameter stres oksidatif pada lemak yaitu pembentukan malonaldehid (MDA) dilakukan pada organ hati dan ginjal. Rosela memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar malonaldehid pada ginjal dengan kadar MDA 3.5558 ± 0.1190 nmol/g (TROS1) dan 3.6188 ± 0.1936 nmol/g (TROS2). Sementara MDA ginjal untuk kelompok tikus negatif adalah sebesar 5.1952 ± 0.3789 nmol/g. MDA ginjal untuk kelompok tikus preventif sebesar 3.8166 ± 0.5866 nmol/g. Kadar malonaldehid pada hati tidak berbeda signifikan namun terdapat kecenderungan bahwa sari rosela dapat menurunkan kadar MDA pada hati. Kelompok tikus rosela mampu menaikkan total antioksidan dengan kadar 0.2655 ± 0.0016 mM pada TROS1 dan 0.1868 ± 0.0962 mM pada TROS2 berbeda signifikan dengan kelompok tikus negatif yaitu 0.0893 ± 0.0134 mM.

Penanda lain pada penyakit diabetes adalah senyawa inflamasi. Sari rosela yang diberikan pada tikus diabetes tidak memberikan data berbeda secara signifikan namun terdapat kecenderungan dapat menurunkan kadar senyawa inflamasi *TNF- α* . Pengujian terhadap kadar *DNA adduct* N7 metilguanin menunjukkan sari rosela tidak memberikan pengaruh pada kadar senyawa ini.

Konsumsi sari rosela 72 mg/hari/200 g BB yang setara dengan konsumsi 1% rosela kering, 2 kali/hari pada manusia memiliki dampak positif dalam menurunkan tingkat keparahan patogenesis penyakit diabetes melalui peningkatan jumlah antioksidan dalam tubuh, menurunkan pembentukan malonaldehid, meningkatkan insulin, dan menurunkan pembentukan senyawa inflamasi *TNF- α* .

Saran

Saran yang dapat dikemukakan berdasarkan hasil penelitian ini adalah :

1. Ukuran bahan untuk pengeringan sebaiknya seragam
2. Melakukan pengujian *DNA adduct* menggunakan standar *DNA adduct* yang teroksidasi (8 hydroxy 2-deoxyguanosine (OH8DG))
3. Melakukan pengujian antidiabetes pada sari rosela ungu segar
4. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh rosela pada kejadian glikasi protein pada insulin dan reseptor insulin pada kondisi diabetes melitus

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Banda Aceh pada tanggal 8 Oktober 1968, sebagai anak kedua dari empat bersaudara dari pasangan A.Djalil Harun dan Rohani. Riwayat pendidikan mulai dari SD PERSIS Jakarta, dilanjutkan SMP 33 Jakarta dan melanjutkan ke SMA 8 Jakarta. Pendidikan sarjana ditempuh di program Studi Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, lulus pada tahun 1992. Pada tahun 1998 penulis diterima di Program Studi Ilmu Pangan, Program Magister Pascasarjana IPB dengan program beasiswa BPPS Dikti dan menamatkannya pada tahun 2002. Tahun 2009 penulis mendapatkan kesempatan untuk melanjutkan Program Doktor pada program studi dan perguruan tinggi yang sama. Beasiswa pendidikan pascasarjana diperoleh penulis dari BPPS Dikti.

Penulis bekerja sebagai dosen PNS Kopertis Wilayah IV Bandung diperbantukan di Universitas Djuanda Bogor sejak tahun 1994. Selain sebagai dosen, penulis juga bekerja sebagai auditor di LPPOM (Lembaga Pengkajian Pangan, Obat dan Kosmetik) MUI dalam bidang audit pangan halal. Penulis aktif melakukan penelitian di bidang rosela sejak tahun 2006. Penelitian dimulai dari dana VMT Dikti (2006) tentang '*Pemanfaatan rosela dalam olahan juice, tea dan tepung*'. Tahun 2008 dan 2010 penulis mendapat dana penelitian Dosen Muda Dikti mengenai rosela dalam minuman yogurt dan pembuatan kopi dari biji rosela, Tahun 2009-2010 penulis mendapat Hibah Fundamental dengan judul '*Ekstraksi dan pengeringan pewarna alami dari rosela*', Tahun 2012-2013 mendapat dana Hibah Bersaing Dikti dengan judul penelitian '*Minuman fungsional berkarbonasi yang kaya antioksidan berbasis kelopak bunga rosela (Hibiscus sabdariffa Linn.)*', dan tahun 2014 mendapat penelitian fundamental '*Potensi minuman rosela (Hibiscus sabdariffa Linn.) dalam meningkatkan kapasitas enzim antioksidan dan detoksifikasi pada tikus yang diinduksi dengan streptozotosin*'.

Selama mengikuti program S3, penulis membuat karya ilmiah yang berjudul '*Perubahan kandungan kimia sari rosela merah dan (Hibiscus sabdariffa Linn.) dengan alat pengering cabinet dryer dan fluidized bed dryer*', yang akan diterbitkan pada Jurnal Teknologi Industri Pertanian Vol.24 pada tahun 2014. Artikel lain yang berjudul '*The effect of roselle extract (Hibiscus sabdariffa Linn.) on blood glucose and total antioxidant level on diabetic rat induced by streptozotosin*' sudah dikirim ke Journal of Functional Foods. Artikel lain berjudul '*Anti-inflammatory of roselle extract in diabetic rats induced by streptozotosin*', akan dipresentasikan pada seminar Internasional ISFA (International symposium Food and Biodiversity) di Semarang tanggal 16-17 September 2014. Karya-karya ilmiah tersebut merupakan bagian dari program S-3 penulis.