

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDIAAN NANOPARTIKEL KITOSAN EKSTRAK ETANOL KELOPAK ROSELA (*Hibiscus sabdariffa* L) PADA TIKUS HIPERKOLESTEROL : PENGUKURAN KADAR MALONDIALDEHID (MDA)

Andi Wijaya, Laela Hayu Nurani, Nurkhasah

Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
andnisa.020410@gmail.com

ABSTRAK

Pemberian sediaan nanopartikel kitosan ekstrak rosela (NKER) dapat mencegah terjadinya stres oksidatif karena mengandung flavonoid antosianin yang berefek sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak bunga rosela terhadap aktivitas antioksidan dengan mengukur kadar MDA. Penurunan stres oksidatif dapat diketahui dengan mengukur kadar malondialdehid (MDA) yang dihasilkan oleh reaksi peroksidasi lipid. Penelitian ini menggunakan 25 ekor tikus dewasa galur Sprague Dawley yang dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok I diberikan diet pakan standar sebagai base line, kelompok II diinduksi dengan kolesterol murni. Kelompok III, IV dan V diinduksi kolesterol murni serta diberikan sediaan NKER dengan dosis berturut-turut 25mg/KgBB, 50 mg/KgBB dan 100 mg/KgBB. Perlakuan dilakukan selama 30 hari. Pada hari ke - 31 setiap tikus diambil darahnya untuk pengukuran kadar kolesterol total, serta pengukuran kadar MDA menggunakan metode Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). Hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan kadar MDA pada tikus yang diinduksi kolesterol murni (kelompok II) dengan rerata kadar $7,13 \pm 0,22$ nmol/ml berbeda bermakna dengan baseline dengan rerata kadar $0,87 \pm 0,77$ nmol/ml ($p \leq 0,05$). Rerata kadar MDA pada kelompok III, IV dan V berturut adalah $5,49 \pm 0,18$ nmol/ml; $4,18 \pm 0,37$ nmol/ml; dan $2,18 \pm 0,15$ nmol/ml, berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok baseline maupun dengan kelompok II ($p \leq 0,05$). Penurunan kadar MDA pada tikus hiperkolesterol yang diberikan sediaan NKER menunjukkan bahwa sediaan NKER memiliki aktivitas sebagai antioksidan, dimana aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh sediaan NKER dosis 100mg/KgBB.

Kata kunci : Antioksidan, Nanopartikel, Rosela, Malondialdehid

ABSTRACT

Hypercholesterolemia can induce oxidative stress and are associated with atherosclerosis and other cardiovascular disorders. Administration of a preparation of chitosan nanoparticles roselle extract (NKER) can prevent oxidative stress because it contains flavonoids which have an effect as an antioxidant anthocyanin. Decreased oxidative stress can be determined by measuring the levels of malondialdehid (MDA) produced by the reaction of lipid peroxidation. The purpose of this study was to determine the effect of administration of a preparation of chitosan nanoparticles roselle calyx ethanol extract of antioxidant activity by measuring the levels of MDA. This study used 25 adult rats of Sprague Dawley strain were divided into 5 groups. The first group was given a standard feed diet as baseline, group II was induced with pure cholesterol. Group III, IV and V induced pure cholesterol as well as the dosage given NKER with successive doses of 25 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/KgBB. The treatment was done for 30 days. On day - 31 each rat blood taken for measurement of total cholesterol, as well as the measurement of MDA using thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The results showed an increase in levels of MDA in mice induced pure cholesterol (group II) with a mean concentration of 7.13 ± 0.22 nmol / ml significantly different to the baseline with a mean concentration of 0.87 ± 0.77 nmol / ml ($p \leq 0,05$). The mean levels of MDA in group III, IV and V respectively was 5.49 ± 0.18 nmol / ml; 4.18 ± 0.37 nmol / ml; and 2.18 ± 0.15 nmol / ml, significantly different when compared with the baseline group and the group II ($p \leq 0,05$).

Decreased levels of MDA in mice given dosage NKER hypercholesterolemia showed that nker preparations have antioxidant activity, which is owned by the highest antioxidant activity NKER dosage dose 100mg/KgBB.

Keywords : Antioxidant, Nanoparticles, Roselle, malondialdehyde

PENDAHULUAN

Hiperkolesterolemia merupakan faktor resiko tertinggi terjadinya aterosklerosis. Aterosklerosis adalah penumpukan lemak disepanjang saluran pembuluh darah yang dapat menyebabkan pembuluh darah menjadi kaku atau regid dan menyempit. Aterosklerosis merupakan salah satu faktor utama terjadinya penyakit jantung koroner (Hirunpanich, *et al*, 2005). Menurut data Kemenkes tahun 2012 penumpukan lemak merupakan salah satu penyebab terjadinya penyakit kardiovaskuler yang menyebabkan kematian sebesar 39%. Organisasi kesehatan dunia atau WHO melaporkan bahwa hiperkolesterolemia menyumbang kasus kardiovaskuler sebesar 56% dan menyebabkan kematian sebanyak 4,4 juta pertahun (Ochani dan D'Mello, 2009).

Penanganan hiperkolesterolemia dapat dilakukan dengan cara pengaturan pola makan atau diet rendah kolesterol, penurunan berat badan, dan menggunakan obat-obat penurun lemak. Dalam perkembangannya, terdapat permintaan produk obat penurun lemak yang lebih efektif dan rendah efek samping. Sebagaimana diketahui, efek atau khasiat obat-obat sintetik sebanding dengan efek samping yang dihasilkan. Artinya semakin tinggi efektifitas atau khasiat suatu obat, biasanya diiringi dengan efek samping yang tinggi pula. Hal ini perlu dicarikan alternatif pilihan untuk menjembatani adanya permintaan akan obat penurun lemak yang lebih efektif akan tetapi rendah efek samping (Ochani dan D'Mello, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Usoh *et al* (2012) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga kering *Hibiscus sabdariffa L.* memiliki efek sebagai antioksidan, hepatoprotektif dan hipolipidemik pada tikus yang diinduksi dengan CCl₄. Ochani dan D'Mello (2009) menyebutkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga dan daun rosela mengandung senyawa polifenol dan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai

antioksidan dan antihiperlipidemia. Ekstrak air kelopak rosela memiliki efek antioksidan dan hipolipidemik secara *in vivo* (Hirunphanich *et al*, 2005).

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol bunga rosela diduga dapat ditingkatkan dengan modifikasi teknologi sediaan nanopartikel. Menurut Mohanraj dan Chen (2006) nanopartikel telah digunakan sebagai pendekatan fisik untuk mengubah dan meningkatkan sifat farmakokinetik dan farmakodinamik dari berbagai jenis molekul obat. Nanopartikel telah digunakan secara *in vivo* untuk melindungi entitas obat dalam sirkulasi sistemik, mengantarkan pada sel target, serta memungkinkan pelepasan obat secara berkelanjutan.

METODE

Bahan. Kelopak rosela diperoleh dari daerah Kulonprogo DIY, Kitosan, TPP, Etanol 60% dan reagen untuk pemeriksaan kadar MDA. Tikus betina galus SD diperoleh dari UPHP Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

Alat. Stirrer, rotary evaporator, ultrasonifikator, spektrofotometer, alat-alat gelas. spuit 3 dan 5 cc, micropipet, jarum suntik sonde, pipet kapiler darah, evendof, reagen, box pendingin

Pembuatan Ekstrak Etanol Kelopak Rosella. Pembuatan ekstrak etanol kelopak rosella dilakukan di laboratorium Fitokimia Univeristas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Simplisia dikeringkan dalam oven dengan suhu 40 °C selama 7 jam. Sebanyak 1500 gram serbuk (yang telah diayak menggunakan ayakan no. 20) kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) diekstraksi dengan pelarut etanol 60% sebanyak 7,5 liter (1:5) menggunakan metode maserasi dengan pengadukan menggunakan stirrer selama kurang lebih 1 jam, kemudian didiamkan sampai 24 jam. Maserat dipisahkan dan disaring menggunakan kain flannel. Maserat

diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 60°C dan kecepatan 100 rpm. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya (Anonim, 2004).

Pembuatan Sediaan Nanopartikel. Sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak rosella dibuat menggunakan metode gelas ionik yang telah dioptimasi sesuai dengan cara Rizki (2014).

Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Kelopak Rosella.

1. Penyiapan hewan uji

Tikus betina galur SD sebanyak 25 ekor dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Seluruh hewan uji diadaptasi selama 1 minggu, dalam kandang individu dengan siklus gelap dan terang masing-masing 12 jam.

Kelompok I adalah kelompok *base line* yaitu tikus hanya diberi pakan standar sebanyak 20g/hari/ekor. Kelompok II adalah kelompok dengan induksi hiperkolesterol. Kelompok III, IV, dan V adalah kelompok dengan induksi hiperkolesterol serta diberikan sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak bunga rosella (NKER) dengan variasi dosis yaitu masing-masing 25 mg/Kg BB, 50 mg/Kg BB, dan 100 mg/Kg BB, diberikan setiap hari selama 30 hari. Induksi hiperkolesterol dilakukan dengan cara pemberian kolesterol murni 2% dan asam kolat 1% yang dilarutkan dengan aquades ad 2ml, diberikan 1 × sehari selama 30 hari secara peroral.

Tikus ditimbang pada hari ke 1, 7, 14, 21, dan 28 untuk mengetahui perkembangan berat badan. Pada hari ke-30 setelah perlakuan, semua tikus diambil darahnya melalui *medial canthus sinus orbitalis* untuk pengamatan kadar kolesterol total dan aktivitas antioksidan dengan pengukuran kadar MDA

2. Pengukuran kadar MDA

Pengukuran kadar MDA menggunakan metode *Thiobarbituric acid reactive substance* (TBARs). Pengambilan darah melalui *medial canthus sinus orbitalis*. Pemeriksaan dilakukan di laboratorium Pusat Antar Universitas (PAU) UGM Yogyakarta. Sebanyak 0,75 ml asam fosfat dimasukkan

ke dalam tabung polypropylene yang telah berisi 0,25 ml larutan (TBA). Selanjutnya 0,05 ml sampel plasma darah ditambahkan ke dalam tabung, diikuti dengan 0,45 ml air. Campuran dikocok selama 2 menit. Setelah dipanaskan dalam *water bath* selama 60 menit dengan suhu 100°C, campuran selanjutnya didinginkan selama 1-2 jam sehingga suhunya mencapai 30°C. Kemudian dimasukkan ke dalam *sep-park C 18* dan dicuci dengan 5 ml methanol dan air. Kedalam campuran kemudian ditambahkan 4 ml methanol dan ditampung dalam kuvet. Kepekatan warna dibaca dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 532 nm (Suwandi, 2012)

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella.

Maserasi atau perendaman dipilih sebagai metode ekstraksi kelopak bunga rosella. Pelarut organik yang digunakan adalah etanol 60%. Hal ini karena etanol merupakan senyawa yang polar sehingga pigmen antosianin dapat mudah larut. Antosianin merupakan senyawa yang paling dominan terdapat dalam kelopak bunga rosella yang merupakan flavonoid dan tergolong senyawa polifenol yang berperan sebagai antioksidan (Setiawan, 2010). Selain itu, etanol bersifat lebih selektif, kapang sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air dalam segala perbandingan, memerlukan panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan dan zat pengganggu yang larut terbatas (Anonim, 1986). Bobot ekstrak kering yang diperoleh sebesar 476g dari 1500g simplisia, sehingga rendemen diperoleh sebesar 31,73%.

Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Kelopak Rosella.

Pembuatan sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak rosella menggunakan metode gelas ionik. Menurut penelitian Rizki (2014), hasil optimasi formulasi terbaik sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol rosella memiliki perbandingan penggunaan ekstrak rosella:kitosan:tripolifosfat adalah 2:1:0,1. Kitosan adalah jenis polimer alami yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin.

Kitosan bersifat tidak larut dalam air, namun kitosan mampu larut dalam asam dengan konsentrasi 1-3%. Kitosan bersifat biokompatibel, *biodegradable*, tidak bereaksi secara kimia dengan senyawa aktif yang dibawa, dan tidak toksik (Lusianawati 2013). Pencampuran polimer kitosan dan tripoliposfat (TPP) akan menghasilkan interaksi antara muatan positif pada gugus amino kitosan dengan muatan tripoliposfat (Mohanraj & Chen 2006). Penambahan TTP bertujuan untuk membentuk ikatan silang ionik antar molekul kitosan sehingga dapat digunakan sebagai bahan penjerap (Rahmania 2011). TTP dianggap sebagai zat pengikat silang yang paling baik (Mohanraj dan Chen 2006).

Aktivitas Antioksidan Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Kelopak Rosella.

1. Perhitungan kadar kolesterol total

Perhitungan kadar kolesterol total dilakukan setelah perlakuan induksi kolesterol selama 30 hari. Berdasarkan penelitian Savitri (2014) Rerata kadar kolesterol total disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Rerata kadar kolesterol total setelah perlakuan 30 hari

Kelompok	Kadar kolesterol total (mg/dl)
I	102,25 ± 0,44
II	223,46 ± 4,3
II	150,74 ± 0,67 ^{*)}
IV	129,11 ± 0,41 ^{*)}
V	112,35 ± 0,58 ^{*)}

Keterangan : ^{*)} nilai berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok II

Berdasarkan tabel 1, diketahui bahwa kadar kolesterol total tikus yang diinduksi kolesterol adalah sebesar 223,46 ± 0,44 mg/dl. Kadar ini berarti tikus kelompok II mengalami hiperkolesterolemia menurut kriteria Hirunpanich *et al* (2005) yang menyebutkan kriteria hiperkolesterol pada tikus apabila kadar kolesterol totalnya > 140 mg/dl. Pemberian sediaan NKER pada kelompok III, IV dan V mampu menurunkan kadar kolesterol total berbeda bermakna jika

dibandingkan kelompok II (p=0,05). Hal ini dikuatkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Pratama dan Kusmiyati (2010) yang menyebutkan bahwa seduhan kelopak rosella menurunkan kolesterol darah tikus secara in vivo.

Sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak rosella memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan senyawa oksigen reaktif (SOR), membentuk hidroperoksida. Peroksidasi lipid digunakan sebagai indikator dari stres oksidatif pada sel dan jaringan. Endoperoksida lipid yang berasal dari asam lemak tak jenuh ganda bersifat tak stabil dan terurai membentuk beberapa senyawa kompleks, termasuk senyawa karbonil reaktif, terutama *malondialdehyde* (MDA) sehingga pengukuran MDA sering digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid jaringan (Kang *et al*, 1998).

2. Hasil perhitungan kadar MDA

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode TBARS. Kadar MDA yang terdapat pada hati dapat terdeteksi karena MDA jika direaksikan dengan TBA (*Tiobarbiturat Acid*) akan menghasilkan warna merah muda yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 532 nm. Jumlah MDA yang terbentuk menggambarkan proses peroksida lipid. MDA merupakan produk hasil peroksidasi lipid dalam tubuh dan terdapat dalam bentuk bebas atau terkompleks dengan jaringan di dalam tubuh. (Kang, *et al*, 1998).

Hasil pengukuran kadar MDA (tabel 2) menunjukkan bahwa rerata kadar MDA paling tinggi pada kelompok II (tikus hiperkolesterolemia) dengan rerata kadar 7,13±0,22 nmol/ml. Sedangkan pada kelompok *base line* memiliki kadar paling rendah sebesar 0,87±0,71 nmol/ml. Kadar MDA pada tikus kelompok II berbeda bermakna dengan *baseline* (p=0,05). Rerata kadar MDA pada kelompok III, IV dan V berturut adalah 5,49±0,18 nmol/ml; 4,18±0,37 nmol/ml; dan 2,18±0,15 nmol/ml, berbeda bermakna jika dibandingkan dengan

kelompok baseline maupun dengan kelompok II ($p=0,05$). Penurunan kadar MDA pada tikus yang diberikan sediaan NKER paling tinggi terjadi pada kelompok V (dosis NKER 100mg/BB).

Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Suwandi (2012) menyimpulkan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosela dosis 250 mg/kg BB menurunkan malondialdehid yang merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid (peroksidasi lipid merupakan stres oksidasi yang timbul akibat adanya pemecuan dari radikal bebas) sebesar 28,0% pada tikus yang diberi minyak goreng jelantah dan pemberian ekstrak kelopak bunga rosela dosis 500 mg/kg BB menurunkan malondialdehid sebesar 50,2%.

Tabel 2. Rerata kadar MDA setelah perlakuan 30 hari

Kelompok	Kadar MDA (nmol/ml)
I	0,87 ± 0,77
II	7,13 ± 0,22
III	5,49 ± 0,18
IV	4,18 ± 0,37
V	2,18 ± 0,15

Penurunan kadar MDA pada tikus hiperkolesterol yang diberikan sediaan NKER ini dikarenakan kandungan dari senyawa antosianin pada kelopak bunga rosella yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Olusola, 2011). Kandungan antosianin menghasilkan aktivitas antioksidasi, antikarsinogenik serta perlindungan terhadap aterosklerosis (Sawabe, *et al*, 2005).

KESIMPULAN

Pemberian sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol kelopak rosella (NKER) pada tikus hiperkolesterol mampu menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Anonim, 2004, Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia Volume 2, Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia
- Hirunpanich, V., Anocha U., Noppawan P.M., Nuntavan B., Hitoshi S., Angkana H., dan Chuthamanee S., 2005, Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (rosela) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biol. Pharm. Bull.*, 28(3) 481-484.
- Kang BPS, Bansal M, Mehta U, 1998, Selenium Supplementation and Diet Induced Hypercholesterolemia in the Rat: Changes in Lipid Levels, Malonyldialdehyde Production and the Nitric Oxide Synthase Activity, *Gen. Physiol. Biophys.* 17, 71—78
- Lusianawati, 2013, Aktivitas ekstrak dan nanopartikel ekstrak kulit kayu mahoni sebagai inhibitor enzim hmg-koa reduktase : Skripsi, Departemen Biokimia, FMIPA, IPB, Bogor
- Mohanraj VJ, Chen Y. 2006. Nanoparticles- A review. *J Pharm Res* 5:561-573.
- Ochani PC, and D'Mello P, 2009, Antioxidant and antihiperlipidemic activity of *Hibiscus sabdariffa*, L. Leaves and calyces extract in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol 47 April 2009 pp 276-282
- Olusola AO, 2011, Evaluation of the Antioxidant Effects of *Hibiscus Sabdariffa* Calyx Extracts on 2,4-Dinitrophenylhydrazine-Induced Oxidative Damage in Rabbits, http://www.webmedcentral.com/article_view/2283
- Pratama, M., F., R. 2010, Pengaruh pemberian seduhan kelopak kering bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kadar kolesterol HDL tikus Sprague Dawley hiperkolesterolemik, *Skripsi*, Pendidikan Kedokteran UNDIP.

- Rahmania D. 2011. Karakterisasi nano kitosan cangkang udang vanamei dengan metode gelasi ionic: Skripsi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB, Bogor
- Rizki.I, 2014, Formulasi nanopartikel kitosan ekstrak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*, L) dan uji aktivitas antioksidan pada sel darah merah domba, Thesis : Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- Safitri,M. 2014, Pengaruh pemberian sediaan nanopartikel kitosan ekstrak etanol rosella pada tikus hiperkolesterol terhadap profil lipid. Thesis: Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- Sawabe, A., Nesumi. C., Morita. M., Matsumoto. S., Matsubara. Y., Komemushi. S., 2005, Glycosides in African Dietary Leaves, *Hibiscus sabdariffa*, *J. Olei. Sci*, Vol. 54, No. 3, 185-191.
- Setiawan, R., 2010, Pengaruh pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap penurunan kadar gula darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Suwandi T, 2012, Pemberian ekstrak kelopak bunga rosella menurunkan malondialdehid pada tikus yang diberi minyak jelantah, Thesis : Program Pascasarjana Universitas Udayana, Bali
- Usuh I.F, Akpan E.J., Etim E.O, Farombi E.O, 2012, Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Dried Flower Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. on Rats Treated with Carbon Tetrachloride, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (08); 2012: 156-159