

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELLA
UNGU (*Hibiscus sabdariffa*, Lynn) PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL INDUKSI OKSIGEN
BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI
ORGAN PULMO**

SKRIPSI

Oleh :

ERNITA WIDYASARI

NIM. 155130107111007



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2019

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELLA
UNGU (*Hibiscus sabdariffa*, Lynn) PADA MENCIT
(*Mus musculus*) MODEL INDUKSI OKSIGEN
BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN
GAMBARAN HISTOPATOLOGI
ORGAN PULMO**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

**ERNITA WIDYASARI
NIM. 155130107111007**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

2019

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ROSELLA UNGU (*Hibiscus sabdariffa*,
Lynn) PADA MENCIT (*Mus musculus*) MODEL INDUKSI OKSIGEN
BERLEBIH TERHADAP KADAR MDA DAN GAMBARAN
HISTOPATOLOGI ORGAN PULMO**

Oleh :

ERNITA WIDYASARI

NIM. 155130107111007

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada Tanggal 14 Mei 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
sarjana kedokteran hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS

NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Herlina Pratiwi, M.Si

NIP. 19870518 201012 2 010

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ernita Widyasari

NIM : 155130107111007

Program studi : S1 Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

“Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa, lynn*) pada Mencit (*mus musculus*) Model Induksi Oksigen Berlebih Terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Organ Pulmo”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari Skripsi yang saya buat adalah benar –benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila kemudain hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 14 Mei 2019

Yang menyatakan,

(Ernita Widyasari)

NIM. 155130107111007

Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa, lynn*) pada Mencit (*Mus musculus*) Model Induksi Oksigen Berlebih Terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Organ Pulmo

ABSTRAK

Oksigen adalah salah satu komponen yang vital dalam proses metabolisme untuk kelangsungan hidup seluruh sel dalam tubuh. Paparan oksigen berlebih dapat menimbulkan *Reactive Oxygene Species* (ROS) atau radikal bebas yang menyebabkan stress oksidatif. Kelopak bunga rosella ungu diketahui memiliki tingkat antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan rosella merah. Antioksidan tambahan diperlukan tubuh untuk membantu menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang stabil. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu terhadap kadar MDA dan gambaran histopatologi organ pulmo pada mencit yang dipaparkan oksigen berlebih. Mencit yang digunakan adalah mencit jantan dengan berat 20-30 gram, dibagi menjadi 5 kelompok dengan perlakuan. Tiap kelompok diberi paparan oksigen berlebih sebanyak FiO_2 0,8 selama 8 jam selama 7 hari. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif tidak diberikan perlakuan. Kelompok kedua sebagai kontrol positif diberikan paparan oksigen berlebih tanpa diberikan terapi ekstrak rosella ungu. Kelompok ketiga sebagai perlakuan 1 diberikan paparan oksigen berlebih dengan ekstrak rosella ungu dosis 7,56 mg/20g BB. Kelompok keempat sebagai perlakuan 2 diberikan paparan oksigen berlebih dengan ekstrak rosella ungu dosis 15,12 mg/20g BB dan kelompok kelima sebagai perlakuan 3 diberikan paparan oksigen berlebih dengan ekstrak rosella ungu dosis 22,68 mg/20g BB. Data dianalisa menggunakan uji *one way anova*, sedangkan untuk histopatologi digunakan pewarnaan HE dan dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis bertingkat berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap penurunan kadar MDA namun belum dapat memperbaiki gambaran histopatologi pulmo mencit secara signifikan.

Kata Kunci : Oksigen, Rosella Ungu, Histopatologi Pulmo, Kadar MDA

The Effects of Purple Rosella Extract (*Hibiscus sabdariffa, lynn*) Towards MDA Levels and Histopathology of Lungs on Mice (*Mus musculus*) with Excess Oxygene Induction

ABSTRACT

Oxygen is a vital component in the metabolic process for the survival of all cells in the body. Excessive oxygen exposure can cause Reactive Oxygen Species (ROS) or free radicals that cause oxidative stress. Purple rosella petals are known to have higher antioxidant levels compared to red rosella. Additional antioxidants are needed for body to help inhibit oxidation by reacting with reactive free radicals to form stable free radicals. The purpose of this research is to determine the effect of purple rosella extract towards MDA levels and histopathology of lungs in mice that exposed to are excess oxygen. The tested animals that we used are male mice with weighing about 20-30 grams, are divided into 5 groups with different treatments. Each group got exposure to excess oxygen about FiO₂ 0.8 for 8 hours for 7 days. The first group as a negative control won't get any treatments. The second group as positive control got exposure to excess oxygen without purple rosella extract. The third group as treatment 1 got exposure of excess oxygen with the treatment of purple rosella extract with the dosage of 7.56 mg / 20g BW. The fourth group as treatment 2 got exposure to excess oxygen with the treatment of purple rosella extract with the dosage of 15.12 mg / 20g BW and the fifth group as treatment 3 got exposure to excess oxygen with the treatment of purple rosella extract with the dosage of 22.68 mg / 20g BW. The data is analyzed using one way ANOVA test, while for histopathology, for staining method, HE staining is used and analyzed descriptively. The results of this study indicate that the level of purple rosella extract with graded doses had a highly significant impact (P <0.01) on the decrease in MDA levels but has not been able to repair the pulmonary histopathological picture of mice significantly.

Key words : Oxygen, Purple Rosella, Histopathology of Lungs, MDA levels

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat dan anugerah-Nya penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa, lynn*) pada Mencit (*Mus musculus*) Model Induksi Oksigen Berlebih Terhadap Kadar MDA dan Gambaran Histopatologi Organ Pulmo”**.

Skripsi ini disusun berdasarkan literatur yang penulis peroleh dari berbagai referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas kepemimpinan dan dukungan demi kemajuan FKH UB.
2. Prof.Dr.Ir. Chanif Mahdi, MS dan drh. Herlina Pratiwi, M.Si yang telah menyempatkan dan menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan skripsi ini.
3. Drh. Ajeng Aeka, M.Sc dan drh. Rahadi Swastomo, M.Biomed sebagai dosen penguji yang telah meluangkan waktunya.
4. Keluarga penulis, Ayahanda tercinta Erhan Nurudin, Ibum tersayang Teguh Suryani, Mas Aan dan Vani saudara-saudariku yang senantiasa memberikan semangat dan doa yang tiada henti demi keberhasilan penulis.
5. Teman-teman Tim Rosella, Wia, Mirda dan Yohanes untuk segala waktu yang dilewati, kesusahan dan kesenangan bersama.
6. Teman-teman Nakdek/Nyinyir untuk segala kebersamaan dan pengertian selama tiga tahun ini, keluarga besar Improve Kelawar yang telah menjadi rumah dan keluarga selama tinggal di Malang serta teman-teman lain yang tidak bisa disebutkan satu persatu.
7. Teman-teman saya di kota asal saya, Alisya Leliani, Chilyah Said Basalamah, Thalia Febrianti, Meidiyana Visy, Mia Gustika Bisana, Ardhini Rizka, yang tidak pernah berhenti mendukung saya selama ini.
8. Kunto Aji dan lagu Rehat nya yang selalu ada dan mengingatkan untuk jangan berhenti dan bahwa apa yang saya takuti tidak akan terjadi.

9. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari sempurna. Penulis berharap ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Malang, 14 Mei 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Oksigen	6
2.2 MDA (<i>Malondialdehid</i>)	7
2.3 Rosella Ungu (<i>Hibiscus sabdariffa</i> , Lynn)	8
2.4 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	8
2.4.1 Pulmo	10
BAB III KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS PENELITIAN	12
3.1 Kerangka Teori	12
3.2 Hipotesis Penelitian	15
BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	16
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
4.2 Populasi dan Sampel	16
4.3 Pembagian Kelompok Mencit	16
4.4 Aklimatisasi	17
4.5 Rancangan penelitian	17
4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan	19
4.7 Karakteristik Sampel Penelitian	20
4.7.1 Kriteria Inklusi	20
4.7.2 Kriteria Eksklusi	20
4.8 Alat dan Bahan	20
4.9 Tahapan Penelitian	21

4.10 Variabel Penelitian	22
4.11 Prosedur Kerja.....	22
4.11.1 Pemberian Oksigen Berlebih	22
4.11.2 Terapi Rosella Ungu	22
4.11.3 Pengambilan Sampel Organ Pulmo	23
4.11.4 Pembuatan Preparat Histopatologi.....	23
4.11.5 Pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE)	24
4.11.6 Pengamatan Histopatologi Organ	26
4.11.7 Penentuan Kadar MDA.....	26
4.11.8 Analisis Data.....	27
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	28
5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu Terhadap Kadar MDA pada Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	28
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Pulmo pada Mencit	31
BAB VI PENUTUP	38
6.1 Kesimpulan.....	38
6.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	42

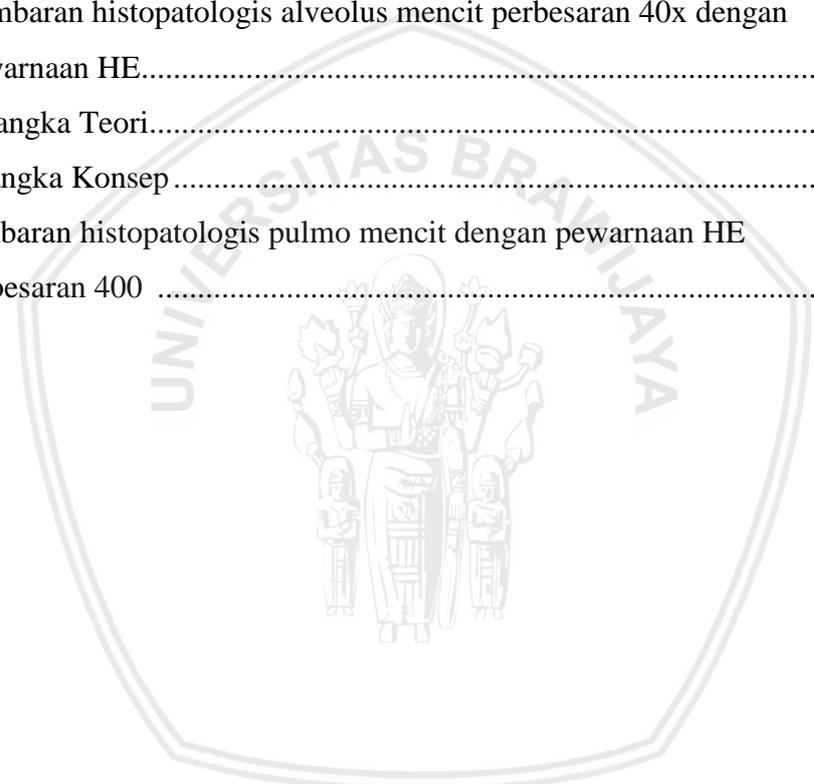
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian	18
4.2 Tabel ANOVA.....	19
5.1 Hasil rata-rata kadar MDA pada pulmo mencit.....	29
5.2 Tabel Perhitungan ANOVA.....	29



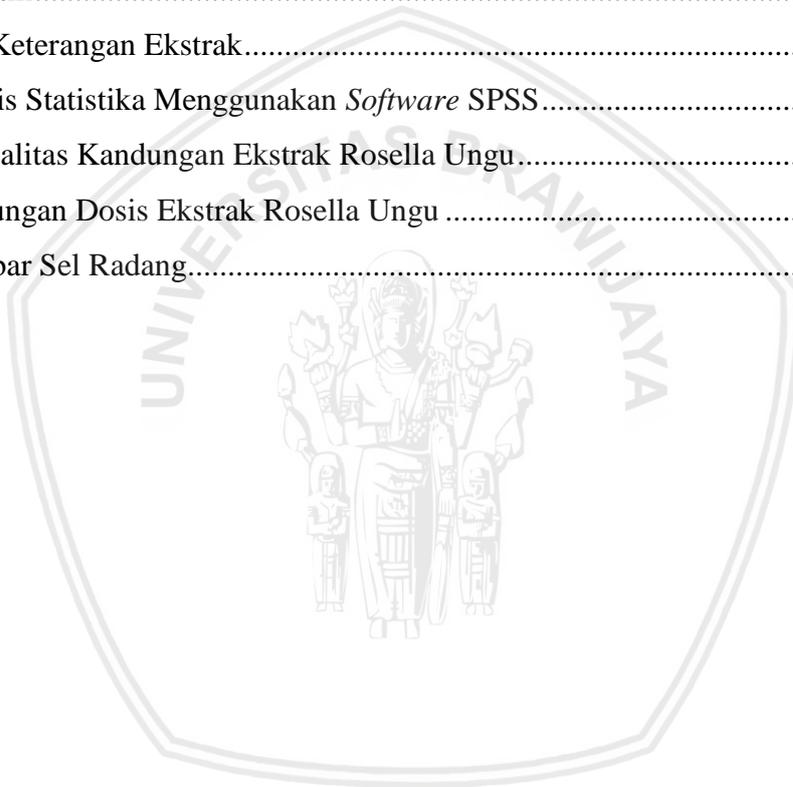
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Buah dan kelopak bunga rosella.....	9
2.2 Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	10
2.3 Gambaran histopatologis alveolus mencit perbesaran 40x dengan pewarnaan HE.....	11
3.1 Kerangka Teori.....	12
3.2 Kerangka Konsep.....	15
5.1 Gambaran histopatologis pulmo mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 400	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Penelitian	43
2. Pewarnaan HE.....	44
3. Uji MDA	45
4. Pembuatan Ekstrak Rosella Ungu.....	47
5. Laik Etik.....	48
6. Surat Keterangan Ekstrak.....	49
7. Analisis Statistika Menggunakan <i>Software</i> SPSS.....	50
8. Uji Kualitas Kandungan Ekstrak Rosella Ungu.....	52
9. Perhitungan Dosis Ekstrak Rosella Ungu	53
10. Gambar Sel Radang.....	55



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	: Persen
<	: Kurang dari
>	: Lebih dari
°	: Derajat
ATM	: Atmosfer
BB	: Berat Badan
FiO ₂	: <i>Fraction of Inspired Oxygen</i>
H ⁺	: Hidrogen
HCl	: hidrogen klorida
H ₂ O	: Air
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
LPM	: Liter Per Menit
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
Na-Thio	: <i>Natrium Thiosulfat</i>
O ₂	: Oksigen
OH	: Hidroksil Radikal
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TBA	: <i>Thiobarbituric acid</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Oksigen merupakan zat bebas yang berpengaruh penting dalam kehidupan tiap makhluk hidup di bumi. Dalam tubuh makhluk hidup, oksigen berperan dalam proses metabolisme sel. Oksigen merupakan salah satu komponen gas dan unsur vital dalam proses metabolisme untuk melangsungkan kehidupan seluruh sel tubuh. Secara normal, oksigen diperoleh dengan cara menghirup udara ruangan setiap kali bernafas. Penyampaian oksigen ke jaringan tubuh ditentukan oleh interaksi sistem respirasi, kardiovaskuler, dan keadaan hematologis. Kekurangan asupan oksigen ditandai dengan keadaan hipoksia yang dapat menyebabkan kematian jaringan dan bahkan mengancam kehidupan (Anggraini dan Hafifah, 2014).

Pemberian terapi oksigen dengan memasukkan oksigen tambahan ke pulmo dengan suatu alat khusus sesuai dengan kebutuhan merupakan salah satu cara dalam mencukupi kebutuhan oksigen. Terapi oksigen dapat bermanfaat apabila digunakan dengan tepat dan bahkan dapat membahayakan apabila tidak digunakan dengan tepat. Menurut Semedi dan Hardiono (2012), keberhasilan terapi oksigen dipengaruhi oleh kondisi pasien dan dosis oksigen yang diberikan dimana konsentrasi oksigen berlebih dapat bersifat toksik pada tubuh. Terapi menggunakan oksigen sudah dilakukan sejak dulu, pada bidang veteriner terapi oksigen diterapkan di tahun 1887 dimana dilakukan penelitian mengenai efek terapi oksigen hiperbarik pada kelinci (Edward and Melissa, 2010).

Paparan oksigen berlebih dapat menimbulkan *Reactive Oxygene Species* (ROS) atau biasa disebut radikal bebas dan menyebabkan peningkatan aktivitas metabolisme pada mitokondria yang dihasilkan dari tereduksi nya oksigen menjadi superoksida anion dan pada proses reduksi oksidasi akan berubah menjadi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut akan berikatan dengan Fe^{2+} dan menghasilkan hidroksil radikal. Superoksidan anion (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan hidroksil radikal (OH) ini disebut ROS. Organ pulmo merupakan salah satu organ yang terkena dampak dari tingginya aktivitas ROS dalam tubuh. Menurut Mason *et al.* (2005), paparan oksigen berlebih dapat menyebabkan kongesti, edema dan ateletaksis pada pulmo. Tingginya kadar ROS secara berkelanjutan dan tidak diimbangi dengan adanya enzim pereduksi akan menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel. Kandungan ROS yang tinggi akan memicu terbentuknya ikatan antara ROS dan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) dan menghasilkan peroksidasi lipid (Yunus, 2001). Hasil dari peroksidasi lipid akibat stres oksidatif tersebut dapat meningkatkan kadar MDA yang juga merupakan salah satu indikator untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif suatu sel (Mudassir, 2012).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron, secara biologis dapat diartikan bahwa antioksidan adalah senyawa yang dapat mengangkat atau meredam dampak negatif dari oksidan. Tubuh tidak memiliki cadangan antioksidan dalam jumlah besar, sehingga apabila terdapat banyak akumulasi radikal bebas dalam tubuh, tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Sayuti, 2015). Pada penelitian ini, antioksidan

tambahan yang ingin diteliti berasal dari kelopak bunga Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa*, Lynn). Rosella ungu mengandung vitamin C, vitamin A, dan 18 jenis asam amino lain yang diperlukan tubuh. Rosella ungu diketahui memiliki kandungan antioksidan berupa antosianin yang tinggi. (Herlinda, 2016). Radikal bebas secara normal ada dalam tubuh, tubuh pun secara alami memiliki antioksidan yang berperan menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang stabil. Apabila radikal bebas terlalu banyak, antioksidan tersebut tidak akan mampu mengatasinya, maka dari itu tubuh akan membutuhkan suplai antioksidan tambahan yaitu antosianin yang terkandung dalam rosella ungu (Ulilalbab, 2015).

Berdasarkan latar belakang diatas, perlu diadakan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu sebagai antioksidan yang diharapkan dapat menimbulkan pengaruh terhadap kadar MDA dan gambaran histopatologi pulmo pada mencit yang diberikan paparan oksigen berlebih.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang disampaikan diatas, dapat dirumuskan beberapa masalah seperti:

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu terhadap kadar MDA pada mencit yang diinduksikan oksigen berlebih?

2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu terhadap gambaran histopatologi organ pulmo pada mencit yang diinduksikan oksigen berlebih?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang disampaikan diatas, maka dalam penelitian ini memiliki batasan berupa:

1. Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih jantan yang didapatkan dari Laboratorium Uji Hewan Institut Biosains Universitas Brawijaya dengan berat badan 20-30 gram. Telah diajukan etik penelitian dari Komisi Etik.
2. Oksigen diberikan dengan jumlah FiO_2 0,8 selama 8 jam perhari selama 7 hari dengan menggunakan tangki oksigen 100% yang diberikan melalui kandang khusus.
3. Rosella ungu didapatkan dari kota Kediri dan di ekstrak di Balai Materia Medica Batu Malang.
4. Ekstrak rosella ungu yang diberikan yaitu dengan dosis 7,56 mg/20g BB dalam 1 mL air secara peroral pada perlakuan 1, dosis 15,12 mg/20g BB dalam 1 mL air secara peroral pada perlakuan 2, dan dosis 22,6 mg/20g BB dalam 1 mL air secara peroral pada perlakuan 3 yang diberikan pada hari ke-8 selama 14 hari
5. Variabel yang diamati adalah kadar MDA dengan uji TBA dan perubahan gambaran histopatolgi organ pulmo dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang disampaikan diatas, tujuan dari penelitian ini antara lain:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu terhadap kadar MDA pada mencit yang diinduksikan oksigen berlebih.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu terhadap gambaran histopatologi organ pulmo pada mencit yang diinduksikan oksigen berlebih.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk mendapatkan hasil berupa informasi mengenai pengaruh pemberian ekstrak rosella ungu pada mencit yang diinduksikan oksigen berlebih dengan konsentrasi FIO_2 0,8.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Oksigen

Oksigen merupakan salah satu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang “O” dan nomor atom delapan, merupakan unsur yang mudah bereaksi dengan hampir semua unsur lainnya. Oksigen berfungsi dalam proses pernapasan dan memiliki peran dalam pembentukan kolagen dan perbaikan jaringan sehingga dengan pemberian oksigen yang sesuai dapat membantu proses anti penuaan dan penyembuhan luka (Asali, 2010). Menurut Pham-Huy *et al.* (2008), oksigen dibutuhkan oleh mitokondria untuk pembentukan ATP yang melibatkan transpor elektron. Transpor elektron pada ikatan oksigen merubah oksigen menjadi ionik yang dapat digunakan dalam pembentukan ATP. Pada proses tersebut, radikal bebas akan terbentuk.

Radikal bebas merupakan molekul yang tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas akan mencari pasangan untuk berikatan dan mencapai kestabilan. Sifat dari oksigen (O_2) pada dasarnya adalah akseptor elektron sehingga akan menerima elektron bebas walaupun sudah mencapai kestabilan, sehingga akan membentuk superoksida (O_2^-), radikal bebas yang berikatan dengan oksigen disebut dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Danasantoso, 2003).

Radikal bebas ada yang bersifat internal yaitu dari dalam tubuh dan ada yang bersifat eksternal. Radikal bebas internal berasal dari oksigen yang kita hirup. Oksigen merupakan penopang kehidupan karena

menghasilkan banyak energi, namun hasil samping reaksi tersebut akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Khaira, 2010). Oksigen yang tereduksi akan kehilangan satu elektron dan berubah menjadi superoksida anion (O_2^-) yang pada proses reduksi oksidasi akan berubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen peroksida yang berikatan dengan Fe^{2+} akan menghasilkan hidroksil radikal (OH) yang sangat toksik dalam sistem biologikal (Halliwell, 2006). Superoksida anion (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan hidroksil radikal (OH) ini disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Mach *et al.*, 2011).

Oksigen sebagai sumber untuk bernafas pada makhluk hidup dapat digunakan dengan keadaan $FiO_2 < 0,5$ dengan tekanan 1 ATA, apabila FiO_2 lebih dari 0,5 dapat muncul gejala keracunan oksigen. Pada beberapa penelitian menggunakan paparan oksigen dengan $FiO_2 \geq 0,8$ dapat menyebabkan kematian pada hewan coba setelah beberapa hari karena dapat mengakibatkan distres pada saluran pernafasan dan kegagalan respirasi (Kallet *et al.*, 2013).

2.2 MDA (*Malondialdehid*)

Peningkatan kadar MDA dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan oksidatif, sementara MDA sendiri adalah produk akhir dari peroksidasi lipid PUFA yang tergolong sebagai metabolit reaktif dan bersifat toksik terhadap sel (Inal *et al.*, 2001). Selain peroksidasi lipid, tingginya kadar MDA dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti terjadinya dekomposisi asam amino, kompleks karbohidrat, pentosa, heksosa dan biosintesis prostaglandin (Wojciech *et al.*, 2002). Menurut

Mudassir dan Punagi (2012) peningkatan kadar MDA merupakan indikator terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh peroksidasi lipid yang terjadi karena adanya ikatan antara ROS dengan PUFA. Kadar MDA diukur dengan menggunakan uji TBA.

2.3 Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa*, Lynn)

Rosella Ungu (*Hibiscus sabdariffa*, Lynn) adalah tanaman yang berasal dari Asia dan Afrika yang dapat tumbuh di lingkungan tropis. Rosella ungu diketahui memiliki khasiat untuk menetralkan darah rendah dan memiliki kandungan antioksidan berupa antosianin yang lebih tinggi dari rosella merah. Rosella ungu mengandung vitamin C, vitamin A, 18 jenis asam amino yang diperlukan oleh tubuh, protein, karbohidrat, tianin, kalsium, antosianin, niacin, flavonoid, alkaloid dan asam stearat (Herlinda dkk., 2016). Antosianin merupakan salah satu jenis pigmen yang memiliki fungsi sebagai antioksidan sebagai penangkal radikal bebas. Tubuh secara alami memiliki antioksidan yang berfungsi sebagai inhibitor yang bekerja dengan cara menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas yang stabil. Kondisi tubuh yang memiliki kadar radikal bebas yang terlalu banyak, maka antioksidan intraseluler tidak dapat mengatasi sendiri dan membutuhkan suplai antioksidan ekstraseluler yaitu antosianin yang terkandung dalam rosella ungu (Ulilalbab dkk., 2015).



Gambar 2.1 Buah dan Kelopak bunga Rosella (Setyobudi, 2017).

2.4 Mencit (*Mus musculus*)

Mencit (*Mus musculus*) termasuk mamalia pengerat (rodensia) yang cepat berkembang biak, mudah dipelihara dalam jumlah banyak, variasi genetiknya cukup besar serta sifat anatomisnya dan fisiologinya terkarakteristik dengan baik. Klasifikasi mencit dapat dilihat sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia	
Phylum	: Chordata	
Sub Phylum	: Vertebrata	
Class	: Mammalia	
Ordo	: Rodentia	
Family	: Muridae	
Genus	: Mus	
Spesies	: <i>Mus musculus</i>	(Akbar, 2010).

Mencit memiliki ciri-ciri bentuk tubuh kecil, berwarna putih, memiliki siklus estrus teratur yaitu 4-5 hari. Kondisi ruang untuk pemeliharaan mencit harus bersih, kering dan jauh dari kebisingan

(Akbar, 2010). Mencit memiliki karakteristik jinak, aktif pada malam hari, mudah berkembang biak, siklus hidup yang pendek dan tergolong poliestrus. Mencit memiliki banyak keunggulan sebagai hewan percobaan, yaitu siklus hidup yang relatif pendek, jumlah anak perkelahiran banyak, variasi sifat-sifatnya tinggi dan mudah penanganannya. Berat badan bervariasi, tetapi umumnya pada umur empat minggu, berat badan mencit mencapai 18-20 g sementara mencit jantan dewasa memiliki berat 20-40g (Fransius, 2008).

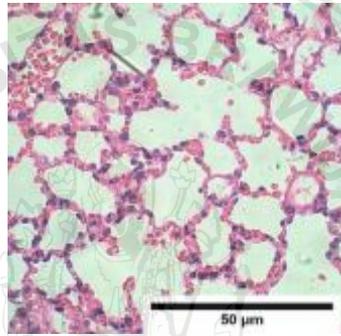


Gambar 2.2 Mencit (*Mus musculus*) (Akbar, 2010).

2.4.1.1 Pulmo

Pulmo (paru-paru) merupakan salah satu organ yang berbentuk kantung dan merupakan kumpulan rongga udara yang kecil. Fungsi utama pulmo adalah untuk mencukupi kebutuhan oksigen yang digunakan di dalam tubuh dan untuk mengeluarkan karbondioksida yang merupakan sisa pembakaran tubuh (Anindyajati, 2007). Pulmo mencit terdiri dari pulmo bagian kanan dan bagian kiri. Pulmo kanan terbagi menjadi empat lobus dan pulmo kiri hanya memiliki satu lobus. Pulmo memiliki hilus yang dibentuk oleh arteri dan vena pulmonalis, bronkus, arteri bronkialis, vena bronkialis, pembuluh limfe, kelenjar limfe dan persarafan (Counter, 2012). Gambaran histopatologi pulmo mencit

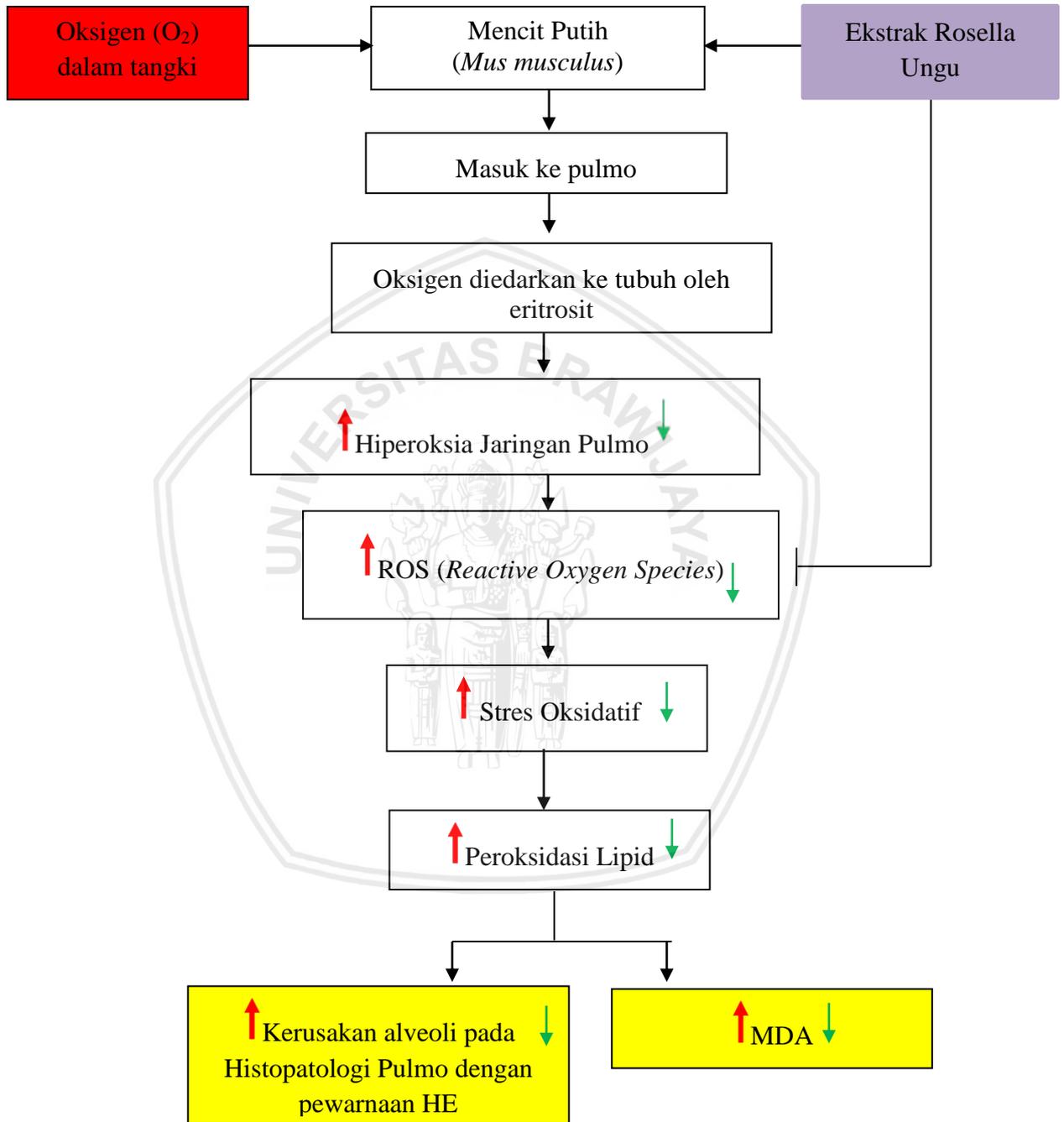
dapat dilihat pada **Gambar 2.3** yang terdiri dari ductus alveolus, bronkiolus, saccus alveolus dan pleura. Alveolus merupakan salah satu bagian pulmo yang memiliki fungsi sebagai tempat pertukaran udara. Alveolus tersusun oleh sel pneumosit tipe I memiliki bentuk sel epitel skuamus yang berfungsi menjadi tempat pertukaran udara dan sel pneumosit tipe II memiliki bentuk sel kuboid sebagai tempat produksi surfaktan dan pengganti sel pneumosit tipe I apabila mengalami kerusakan (Treuting *et al.*, 2010).



Gambar 2.3 Gambaran histopatologis alveolus menciit perbesaran 40x dengan pewarnaan HE (Novitasari, 2017).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka teori

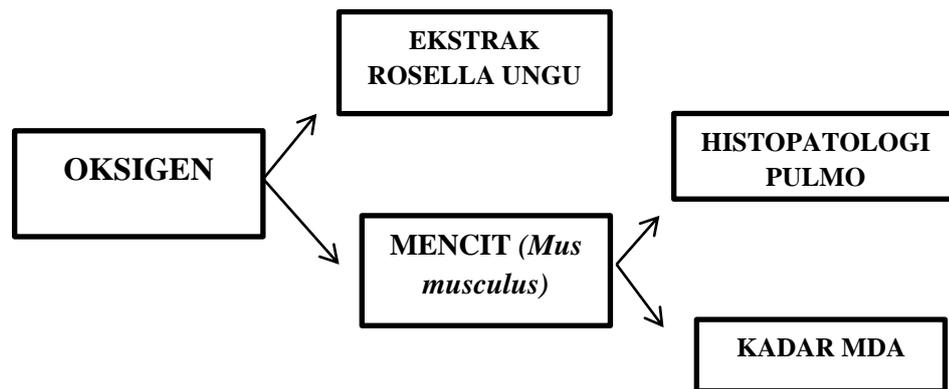
<p>Keterangan:</p> <p>↑ : Peningkatan</p> <p>↓ : Penurunan</p>	<p>■ : Paparan</p> <p>■ : Parameter yang diamati</p> <p>■ : Terapi</p>
--	--

Hewan coba berupa mencit diinduksi oksigen dengan konsentrasi FIO_2 0,8 pada tekanan 1 ATM pada kandang yang kedap udara. Oksigen kemudian masuk ke pulmo yang lalu diedarkan ke seluruh tubuh oleh sel darah merah melalui pembuluh darah. Oksigen berlebih yang berada dalam pulmo akan menimbulkan hiperoksia jaringan. Paparan oksigen berlebih mengakibatkan peningkatan ROS dalam jaringan dan membuat stres oksidatif. Proses pertukaran oksigen terjadi di alveolus, sebagian oksigen berdifusi ke pembuluh darah dan berikatan dengan hemoglobin sementara oksigen yang tersisa pada pulmo dapat menyebabkan hiperoksia jaringan. Oksigen tersebut akan menjadi radikal bebas pada proses fosforilasi oksidatif pada mitokondria pulmo dimana pada proses reduksi oksidasi superoksida anion (O_2^-) akan berubah menjadi H_2O_2 atau hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida yang berikatan dengan Fe^{2+} akan menghasilkan OH atau hidroksil radikal yang bersifat toksik untuk tubuh. Superoksida, hidrogen peroksida dan hidroksil radikal inilah yang disebut ROS.

Tingginya kadar ROS dalam pulmo akan menyebabkan sel pulmonar memberikan respon inflamasi ditandai dengan migrasi sel leukosit menuju sel pulmo. Kerusakan akibat ROS tersebut akan mempengaruhi pulmo, seperti edema, hemoragi, fibrosis dan lainnya. Stres oksidatif pada pulmo mengakibatkan timbulnya peroksidasi lipid sebagai indikator adanya perubahan PUFA atau *Poly*

Unsaturated Fatty Acid menjadi MDA dan meningkatkan kadar MDA pada pulmo.

Umumnya, beberapa enzim antioksidan seperti superoksida dismutase dan glutathio peroksidase akan melindungi tubuh dari radikal bebas seperti ROS, tapi pada kondisi hiperoksia produksi radikal bebas yang terlalu banyak akan membuat sistem enzim pelindung melemah dan tidak dapat membantu inaktivasi ROS. Pemberian antioksidan diharapkan mampu menurunkan ROS dalam jaringan sebagai antioksidan eksogen. Pada penelitian ini digunakan ekstrak kelopak bunga rosella ungu yang memiliki kandungan antosianin sebagai antioksidan yang tinggi. Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan elektron untuk menstabilkan elektron bebas. Proses peroksidasi lipid dapat berkurang dengan tambahan antioksidan dari pemberian ekstrak rosella ungu untuk membantu menginaktivasi ROS dan memperbaiki pulmo karena antioksidan yang terdapat pada ekstrak rosella ungu dapat menetralkan reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas dalam merusak sel-sel normal pada pulmo. Antioksidan tersebut juga dapat melindungi membran PUFA dengan menyumbangkan ion H^+ pada peroksil lipid radikal yang dapat menghentikan reaksi radikal selanjutnya, dengan tidak terjadinya peroksidasi lemak maka diharapkan juga dapat menurunkan kadar MDA pada pulmo.



Gambar 3.2 Kerangka Konsep

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diterangkan diatas, maka didapatkan hipotesis penelitian yaitu:

- a. Ekstrak rosella ungu dapat menurunkan kadar MDA pada mencit yang diinduksi oksigen berlebih.
- b. Ekstrak rosella ungu dapat memperbaiki gambaran histopatologi organ pulmo mencit yang telah diinduksi oksigen berlebih.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai dengan Januari 2019 yang bertempat di laboratorium Uji Hewan Institut Biosains Universitas Brawijaya, laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pembuatan histopatologi pulmo, pembacaan kadar MDA di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 20-30 gram.

4.3 Pembagian Kelompok Mencit

Mencit yang digunakan sebanyak 20 ekor, dimana terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ekor mencit. Pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok pertama sebagai kontrol negatif. Mencit tanpa paparan oksigen berlebih.
2. Kelompok kedua sebagai kontrol positif. Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO₂ 0.8 selama 8 jam dalam waktu 7 hari.

3. Kelompok ketiga sebagai perlakuan 1. Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO₂ 0.8 selama 8 jam dan 7,56 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu
4. Kelompok keempat sebagai perlakuan 2. Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO₂ 0.8 selama 8 jam dan 15,12 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu
5. Kelompok kelima sebagai perlakuan 3. Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO₂ 0.8 selama 8 jam dan 22,68 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu

4.4 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungannya yang baru. Pada tahap ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba. Mencit diberikan ransum berbentuk pelet dan diberikan air mineral secara *ad libitum* serta dipelihara pada ruang bersuhu 26-27⁰C dengan kelembapan 50-60% (Lina, 2003).

4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana dengan membagi 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari 4 ekor hewan coba. Kelompok 1 adalah mencit yang tidak diberi perlakuan, hanya diberi pakan berupa ransum basal berbentuk pellet serta diberikan air minum aquadest. Kelompok 2 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih

dengan tekanan FiO_2 0.8 selama 8 jam dalam waktu 7 hari. Kelompok 3 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dan 7,56 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu. Kelompok 4 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dan 15,12 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu. Kelompok 5 adalah mencit yang diberi paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dan 22,68 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu.

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian.

Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
K-	K-1	K-1	K-3	K-4
K+	K+1	K+2	K+3	K+4
P1	P1.1	P1.2	P1.3	P1.4
P2	P2.1	P2.2	P2.3	P2.4
P3	P3.1	P3.2	P3.3	P3.4

Keterangan:

K-: Mencit tanpa paparan oksigen berlebih.

K+: Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dalam waktu 7 hari.

P1: Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dan 7,56 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu

P2: Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO_2 0.8 selama 8 jam dan 15,12 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu

P3: Kelompok kelima sebagai perlakuan 3. Mencit dengan paparan oksigen berlebih dengan FiO₂ 0.8 selama 8 jam dan 22,68 mg/20g BB ekstrak Rosella Ungu

Tabel 4.2 Tabel ANOVA

S.V	Df ^x	SS	MS ^{xx}	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%
Treatment	4	SST	MST	$\frac{MST}{MSE}$	3,06	4,89
Error	15	SSE	MSE			
Total	19					

Keterangan :

$$x). \text{ d.f varietas (treatment) } = t - 1 = 5 - 1 = 4$$

$$\text{d.f total} = nt - 1 = 20 - 1 = 19$$

$$\text{d.f error} = \text{df total} - \text{df varietas} = 19 - 4 = 15$$

$$xx). \text{ MS varietas} = \frac{ss \text{ varietas}}{df \text{ varietas}}$$

$$\text{MS error} = \frac{ss \text{ error}}{df \text{ error}}$$

$$xxx). \text{ F Calculaed} = \frac{MS \text{ varietas}}{MS \text{ error}}$$

4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit putih (*Mus musculus*) jantan berumur 8-12 minggu dengan berat badan rata-rata 20-30 gram. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dan besar sampel ditentukan dengan rumus Federer (Kusrianingrum, 2010) :

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka perlakuan dibagi menjadi 5 macam diperlukan jumlah minimal 4 kali pengulangan dalam setiap kelompok sehingga total mencit yang diperlukan adalah 20 ekor. Perlakuan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu K-, K+, P1, P2, dan P3.

4.7 Karakteristik Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- a. Mencit putih (*Mus musculus*) dengan umur 8-12 minggu
- b. Berat badan rata-rata 20-30 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Sehat, ditandai dengan gerakan yang aktif, tidak cacat, dan matanya jernih.

2. Karakteristik Eksklusi

Mencit putih yang mati saat penelitian.

4.8 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Pada kelompok kontrol negatif kandang mencit memiliki ukuran 30x20x20 cm. Kandang ini terbuat dari bahan polyvinyl dan tutup jaring terbuat dari bahan *stainless steel*

- b. Pada kelompok kontrol positif dan perlakuan kandang mencit memiliki ukuran 30x20x20 cm, semua bagian sisi kandang ditutup rapat dan dibuat dua lubang disalah satu sisi sebagai jalur induksi untuk masuknya oksigen dari tabung oksigen, serta lubang lainnya disatu sisi lainnya untuk keluarnya udara. Kandang perlakuan digunakan untuk K+, P1, P2, dan P3. Peralatan yang lain seperti botol minum, tempat pakan, dan lampu. Peralatan tambahan seperti sonde, dan gunting bedah.
- c. Alat untuk pengukuran kadar MDA yaitu spektrofotometer.
- d. Peralatan untuk pembuatan preparat histologis adalah bak paraffin, kertas label, botol flako, *dissecting kit*, *cover glass*, *object glass*, oven, *staining kit*, *rotary microtome*, *base molt*, *holder*, cawan petri, *hot plate*, pipet tetes, micrometer objektif, mikroskop cahaya, dan micrometer okuler.

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi:

Mencit putih (*Mus musculus*) jantan, pakan mencit, oksigen 100%, aquadest, NaCl fisiologis, PFA 4%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), xylol bertingkat, alkohol bertingkat, blok paraffin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), dan balsam kanada.

4.9 Tahapan Penelitian

1. Pemberian oksigen berlebih pada mencit putih (*Mus musculus*).
2. Terapi Rosella Ungu
3. Pengambilan organ pulmo
4. Pengukuran kadar MDA
5. Pembuatan preparat histopatologi pulmo

6. Analisis data.

4.10 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dari penelitian ini meliputi:

Variabel bebas : Pemberian oksigen berlebih dan induksi terapi rosella ungu

Variabel tergantung : Kadar MDA dan Histopatologi Paru

Variabel kontrol : Mencit putih (*Mus musculus*) jantan, pakan, suhu dan kelembaban kandang.

4.11 Prosedur Kerja

4.11.1 Pemberian Oksigen Berlebih

Oksigen yang digunakan untuk perlakuan pada hewan coba berbentuk gas yang akan dialirkan dari tabung oksigen masuk ke selang menuju ke dalam kandang perlakuan mencit putih. Pada K+, P1, P2, dan P3 akan diberi paparan oksigen dengan konsentrasi FiO_2 0,8 selama 8 jam yang dikonversikan pada alat yang menunjukkan angka 8 LPM. Paparan akan diberikan selama 7 hari.

4.11.2 Terapi Rosella Ungu

- a. Terapi Rosella Ungu diberikan secara per oral selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari dengan dosis 7,56 mg/20g BB yang akan diencerkan dengan akuades sebanyak 0,2 mL dan diberikan pada kelompok perlakuan 1.

- b. Terapi Rosella Ungu diberikan secara per oral selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari dengan dosis 15,12 mg/20g BB yang akan diencerkan dengan akuades sebanyak 0,2 mL dan diberikan pada kelompok perlakuan 2.
- c. Terapi Rosella Ungu diberikan secara per oral selama 14 hari sebanyak 1 kali sehari dengan dosis 22,68 mg/20g BB yang akan diencerkan dengan akuades sebanyak 0,2 mL dan diberikan pada kelompok perlakuan 3.

4.11.3 Pengambilan Sampel Organ Pulmo

Pengambilan sampel organ pulmo mencit putih (*Mus musculus*) dilakukan pada hari ke-15. Mencit di euthanasia dengan cara *dislocatio os cervicalis* dan diletakkan di atas papan bedah dengan posisi rebah dorsal. Pembedahan dilakukan pada bagian thorax dan dilanjutkan dengan pengambilan organ pulmo sebelah dexter. Setelah diambil, organ pulmo dibilas dengan larutan fisiologis dan dimasukkan kedalam larutan PBS pH 7,4. Sebagian pulmo dimasukkan kedalam larutan *paraformadehyde* 4% untuk pemeriksaan kadar MDA dan histopatologi.

4.11.4 Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu organ pulmo telah dipotong kecil dan direndam dalam larutan PFA 4% selama 24 jam. Tujuan melakukan fiksasi adalah mencegah kerusakan jaringan, menghentikan proses metabolisme, dan mengeraskan materi yang lunak agar dapat diwarnai. Proses pembuatan preparat histopatologi terdiri dari dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, dan *mounting* (Junqueira, 2015).

- a. *Dehidrasi* adalah mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan dapat diisi oleh larutan paraffin untuk mempermudah pengirisan jaringan secara tipis. Organ pulmo selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing selama 5 menit.
- b. *Clearing* adalah proses penjernihan organ jaringan. Organ pulmo dimasukkan ke dalam larutan *xylol* I selama 1 jam, *xylol* II selama 30 menit, dan *xylol* III selama 30 menit.
- c. *Embedding* adalah organ pulmo dimasukkan kedalam paraffin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan ke paraffin blok.
- d. *Sectioning* adalah proses pemotongan paraffin blok dengan alat *microtome*. Ketebalan pemotongan adalah $5\ \mu\text{m}$ agar cahaya dapat tembus ketika pemeriksaan dibawah mikroskop, kemudian direndam dalam *water bath* dengan suhu 40°C .
- e. *Mounting* adalah penempelan blok paraffin yang sudah dipotong ke object glass. Kemudian dikeringkan diatas hot plate suhu $38-40^{\circ}\text{C}$ hingga kering dan disimpan dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam dan dilanjutkan dengan pewarnaan HE (Wati, 2013).

4.11.5 Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) memiliki dua fungsi, yaitu *Hematoxylin* untuk memberi warna biru pada inti sel, sedangkan *Eosin* untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Menurut (Jusuf, 2009) prosedur pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) adalah:

- a. *Deparafinisasi* adalah proses melarutkan dan menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan organ. Preparat dimasukkan kedalam *xylol* bertingkat I, II, dan III masing-masing selama 5 menit.
- b. *Rehidrasi* adalah preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 95%, 90%, 80%, dan 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian direndam dalam aquadest selama 5 menit.
- c. Pewarnaan I adalah proses pewarnaan dengan menggunakan *hematoxylin* selama 10 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna biru pada inti sel.
- d. *Differensiasi* adalah proses dimana preparat dimasukkan dalam *Hydrochloric acid* (HCl) 0,6% selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan *differensiasi* adalah untuk menghilangkan warna biru yang pekat pada inti sel dan sitoplasma.
- e. *Blueing* adalah proses dimana preparat dimasukkan kedalam *Lithium carbonat* 0,5% selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir. Tujuan *blueing* adalah untuk memperjelas warna biru pada inti sel.
- f. Pewarnaan kedua adalah preparat dimasukkan dalam *eosin* selama 3 menit. Tujuan dari pewarnaan ini adalah untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma.
- g. *Dehidrasi* adalah proses menghilangkan air dari jaringan. Preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, dan 95% masing-masing 5 menit.
- h. *Clearing* adalah proses dimana preparat dimasukkan dalam *xylol* I dan II selama 1 menit dan ditunggu sampai kering.

- i. *Mounting* adalah preparat diberi entelan atau balsam canada dan ditutup dengan *cover glass*. Hal ini bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang sudah diwarnai.

4.11.6 Pengamatan Histopatologi Organ

Pengamatan histopatologi pulmo dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop. Pengamatan histopatologi pulmo diutamakan pada bagian alveolus dengan perbesaran 40x.

4.11.7 Penentuan Kadar MDA

Larutan MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 mg/mL masing-masing diambil 100 μ L dan dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambahkan 550 μ L aquades. Setiap tabung ditambahkan 100 μ L TCA 100%, 250 μ L HCl 1N dan 100 μ L Na-Thio 1%. Kemudian dihomogenkan dengan vortex dan tabung ditutup dengan plastik. Inkubasi tabung tersebut dalam penangas air dengan suhu 100 °C selama 30 menit. Setelah itu, didinginkan pada suhu ruangan. Larutan standar kemudian dibaca pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer. Kurva standar MDA dihasilkan dari persamaan regresi antara absorbansi (y) dan konsentrasi MDA (x) (Amin, 2009).

Organ pulmo sebanyak 0,1 gram dipotong kecil-kecil, kemudian digerus dengan mortar yang diletakkan diatas balok es. Ditambahkan NaCl fisiologis 0,9%, lalu homogenat dipindah ke dalam *microtube* dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Supernatan diambil dan dimasukkan kedalam *microtube*, ditambahkan 550 μ L akuades, 100 μ L TCA lalu dihomogenkan dengan *vortex* dan ditambahkan 100 μ L

Na-Thio 1% kemudian dihomogenkan kembali dengan *vortex*. Kemudian, *microtube* disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk, dipisahkan ke *microtube* baru, kemudian diinkubasi dalam *waterbath* dengan 100°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan pada suhu ruang lalu sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel.

4.11.8 Analisa Data

Parameter yang diamati adalah tingkat kadar MDA dan gambaran perubahan histopatologi organ pulmo pada mencit. Kadar MDA diamati dengan uji TBA. Kemudian dilakukan analisis statistika dengan uji ANOVA dan dilanjutkan dengan uji BNJ atau *Tukey Test*. Hasil pengamatan histopatologi pulmo dianalisa dengan cara deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu Terhadap Kadar MDA Pada Mencit (*Mus musculus*)

Malondialdehida atau yang biasa yang disebut MDA adalah produk akhir dari peroksidasi lipid PUFA yang tergolong sebagai metabolit reaktif dan bersifat toksik terhadap sel. Peningkatan kadar MDA dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan oksidatif (Inal *et al.*, 2001). Peningkatan kadar MDA merupakan indikator terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh peroksidasi lipid yang terjadi karena adanya ikatan antara ROS dengan PUFA (Mudassir dan Punagi, 2012).

Kadar MDA dapat dijadikan *biomarker* adanya kerusakan pada jaringan. Pengukuran kadar MDA pada organ pulmo dilakukan untuk mengetahui tingkat kerusakan oksidatif yang ditimbulkan dari pemberian paparan oksigen berlebih. Data diolah menggunakan uji *one way* ANOVA yang sebelumnya dilakukan pengujian normalitas dengan tujuan mengetahui apakah data terdistribusi secara normal dan pengujian homogenitas untuk mengetahui apakah data telah homogen. Hasil uji tersebut dapat dilihat pada **Lampiran 7**. Setelah dilakukan analisis menggunakan uji *one way* ANOVA, dilanjutkan menggunakan *Tukey test* untuk mengetahui apakah perbedaan data pada setiap kelompok signifikan. Hasil rata-rata pengujian kadar MDA organ pulmo dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil rata-rata kadar MDA pada pulmo mencit

Kelompok	Rata-rata kadar MDA ng/mL \pm SD	Kadar MDA (%)	
		Peningkatan Terhadap K(-)	Penurunan Terhadap K(+)
Kontrol (-)	129.150 \pm 2.75 ^b	-	-
P1 (7,56 mg/20g)	143.150 \pm 2.33 ^d	-	7,9%
P2 (15,12 mg/20g)	137.350 \pm 3.08 ^c	-	11,6%
P3 (22,68 mg/2g)	122.100 \pm 2.76 ^a	-	33,35 %
Kontrol (+)	155.450 \pm 2.76 ^e	20,36%	-

Tabel 5.2 Tabel perhitungan ANOVA

S.V	Df ^x	SS	MS ^{xx}	F ^{xxx} Calc	F5%	F1%
Treatment	4	244.048	661.012	99.650	3,06	4,89
Error	15	99.50	6.633			
Total	19	243.548				

Berdasarkan hasil analisis menggunakan metode statistik *one way* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan pada setiap kelompok perlakuan ($p < 0,01$). Hasil uji lanjutan menggunakan *Tukey test* menunjukkan adanya perbedaan notasi pada setiap perlakuan terhadap masing-masing perlakuan (**Lampiran 7.3**).

Rata-rata pada kelompok kontrol digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya perubahan pada kadar MDA yang terjadi pada setiap kelompok perlakuan. Pada kontrol negatif (K-) diketahui rata-rata kadar MDA

pada pulmo mencit sebesar $129.150 \pm 2.75 \mu\text{g/mL}$. Pada kontrol negatif tetap ditemukan adanya kadar MDA karena adanya proses metabolisme pembentukan ATP dimana pada proses tersebut mitokondria menghasilkan ROS (Liu and Chen, 2017).

Kelompok kontrol positif (K^+) yang telah diberikan paparan oksigen berlebih dengan dosis FiO_2 0,8 selama tujuh hari tanpa diberikan terapi ekstrak rosella ungu menunjukkan hasil rata-rata kadar MDA pada organ pulmo sebanyak $155.450 \pm 2.76 \mu\text{g/mL}$. Hal tersebut menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA sebanyak 20,36% apabila dibandingkan dengan rata-rata kadar MDA pada kelompok K^- . Pada kondisi pemberian oksigen dengan konsentrasi tinggi dapat menimbulkan adanya peningkatan aktivitas metabolisme pada mitokondria yang melibatkan oksigen sebagai akseptor elektron pada proses fosforilasi oksidatif. Peningkatan aktifitas metabolisme pada mitokondria akan menyebabkan terbentuknya ROS (Battacharya, 2015).

Perbedaan notasi antara kelompok K^+ dengan kelompok perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan baik antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan maupun antara tiap perlakuan. Hal tersebut disebabkan adanya pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis bertingkat dimana P1 dengan pemberian dosis 7,56 mg/20g BB dengan rata-rata kadar MDA sebanyak $143.150 \pm 2.33 \mu\text{g/mL}$ dan menunjukkan adanya penurunan kadar MDA sebanyak 7,9% apabila dibandingkan dengan kadar MDA pada kelompok K^+ . Pada P2 dengan pemberian dosis 15,12 mg/20g BB dengan rata-rata kadar MDA sebanyak $137.350 \pm 3.08 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan

adanya penurunan kadar MDA sebanyak 11,6% serta pada P3 dengan dosis 22,68 mg/20g BB dengan rata-rata kadar MDA sebanyak $122.100 \pm 2.76 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan adanya penurunan kadar MDA sebanyak 33,35%. Kadar rata-rata MDA pada mencit kelompok P3 lebih rendah dibandingkan dengan kadar rata-rata MDA pada K-. Hal tersebut kemungkinan dikarenakan adanya stres psikososial antara mencit di kandang kelompok K- sehingga dapat memicu stres oksidatif dan meningkatkan kadar MDA, dimana hal ini di dukung dengan adanya penelitian yang dilakukan Wiryanthini (2012) Bahwa terjadi kenaikan kadar MDA pada tikus setelah pemberian stres psikososial selama 14 hari sebanyak 5,9 kali apabila dibandingkan pada kadar MDA awal sebelum diberi stres psikososial.

Oksigen merupakan komponen utama respirasi seluler pada metabolisme glukosa, dibutuhkan oleh mitokondria untuk pembentukan ATP, dimana proses pembentukan ATP pada mitokondria melibatkan transpor elektron yang terdapat pada oksigen. Pada proses tersebut, oksigen bebas yang tidak stabil, reaktif dan memiliki elektron bebas akan berikatan dengan molekul disekitarnya (Pham-Huy *et al.*, 2008). Oksigen yang kehilangan satu elektron akan berubah menjadi superoksida anion dimana superoksida anion merupakan salah satu ROS. Tingginya kadar ROS yang terjadi dapat meningkatkan kadar MDA yang merupakan indikator terjadinya kerusakan jaringan akibat peroksidasi lipid yang terjadi akibat adanya ikatan antara ROS dengan PUFA (Mudassir dan Punagi, 2012).

Dalam penelitian ini, rosella ungu yang mengandung antioksidan tinggi berupa antosianin tinggi sebagai terapi. Menurut Ulilalbab (2015), rosella banyak mengandung antosianin yang dapat menetralsir radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan elektron untuk menghasilkan molekul yang lebih stabil. Hal tersebut dapat memberikan kesimpulan bahwa pemberian ekstrak rosella ungu yang mengandung antosianin sebagai antioksidan dapat membantu mengurangi kadar ROS yang secara tidak langsung dapat menurunkan kadar MDA dengan cara memutus rantai reaksi radikal melalui proses donor atom H pada PUFA agar molekul menjadi lebih stabil.

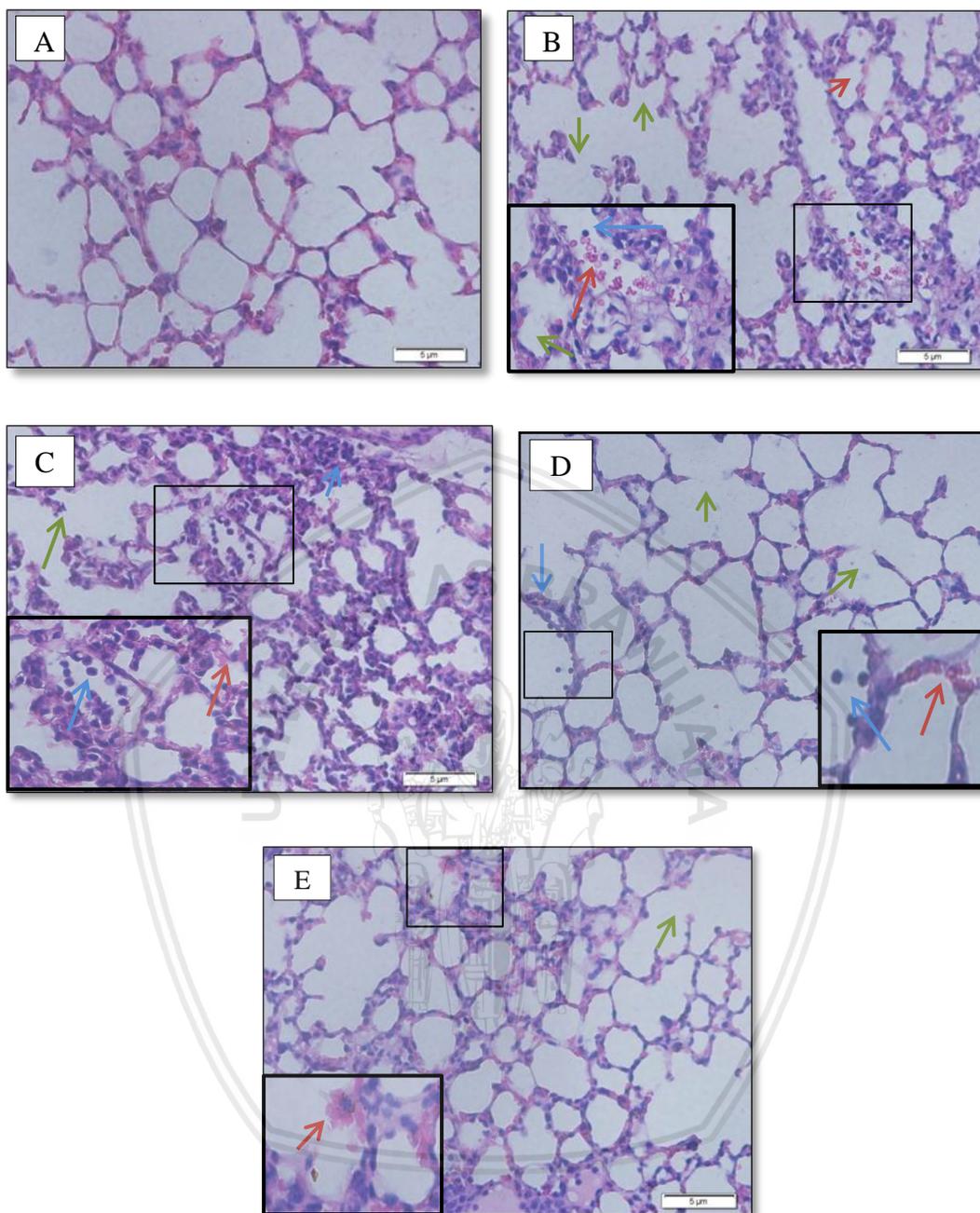
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Rosella Ungu Terhadap Gambaran Histopatologi Organ Pulmo pada Mencit

Gambaran perubahan histopatologi organ pulmo pada mencit digunakan sebagai parameter untuk mengetahui perbandingan tingkat kerusakan pada sel – sel pneumosit pada pulmo mencit yang diberikan oksigen berlebih dengan tingkat kerusakan serta kesembuhan pada sel – sel pneumosit pada pulmo mencit yang diberikan oksigen berlebih dan diberikan ekstrak rosella ungu dengan dosis bertingkat.

Gambar 5.1 (A) merupakan gambaran histopatologis pulmo mencit pada kelompok K- dimana struktur alveolus terlihat normal. Alveolus merupakan salah satu bagian pulmo yang memiliki fungsi sebagai tempat pertukaran udara. Alveolus tersusun oleh sel pneumosit tipe I memiliki bentuk sel epitel skuamus yang berfungsi menjadi tempat pertukaran udara dan sel pneumosit tipe II

memiliki betuk sel kuboid sebagai tempat produksi surfaktan dan pengganti sel pneumosit tipe I apabila mengalami kerusakan (Treuting *et al.*, 2010). Gambaran histopatologis pulmo mencit pada kelompok K+ dapat dilihat pada **Gambar 5.1 (B)** dimana pada gambar tersebut ditemukan adanya hemoragi, akumulasi sel radang dan emfisema pada alveolus pulmo, bentuk dinding-dinding alveoli pada kelompok ini terlihat rusak dilihat dari pecahnya dinding alveolar sehingga terjadi variasi bentuk dan ukuran alveoli. Pada gambar tersebut juga terlihat banyaknya kumpulan sel radang pada dinding-dinding alveoli yang menunjukkan bahwa adanya reaksi inflamasi yang terjadi pada pulmo mencit. Gambar kumpulan sel radang yang ditemukan dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Oksigen pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan inflamasi dan hemoragi pada pulmo. Menurut Mach *et al* pada tahun 2011, terdapat empat fase yang menyebabkan rusaknya pulmo akibat tingginya ROS, yaitu fase inisiasi, fase inflamasi, fase proliferasi dan fase fibrosis. Inisiasi merupakan fase dimana terjadinya peningkatan ROS dan menurunnya antioksidan sehingga pulmo gagal dalam upaya menghilangkan ROS. Fase inflamasi ditandai dengan adanya migrasi sel leukosit dan mediator inflamasi menuju tempat dimana adanya kerusakan. Fase proliferasi ditandai dengan adanya hipertrofi seluler, peningkatan sekresi surfaktan oleh sel pneumosit tipe II dan peningkatan monosit. Fase fibrosis yaitu fase yang menimbulkan perubahan permanen pada pulmo.



Gambar 5.1 Gambaran histopatologis pulmo mencit dengan pewarnaan HE perbesaran 400; Keterangan: (A) Gambaran histopatologi pulmo mencit kelompok k-; (B) Gambaran histopatologi pulmo mencit kelompok k+; (C) Gambaran histopatologis pulmo mencit kelompok P1; (D) Gambaran histopatologi pulmo mencit kelompok P2; (E) Gambaran histopatologi pulmo mencit kelompok P3; (↑) hemoragi; (↑) emfisema. (↑) akumulasi sel radang.

Paparan oksigen dosis tinggi yang menimbulkan tingginya ROS dapat menimbulkan gangguan keseimbangan oksidan dan antioksidan, dimana hal tersebut dapat menyebabkan perubahan homeostatis dan mengakibatkan kerusakan pada sel maupun jaringan. Hemoragi merupakan kondisi dimana sel darah merah keluar dari pembuluh darah ke jaringan. Tingginya ROS pada pulmo akan menyebabkan kerusakan pada pembuluh darah kapiler yang mengakibatkan terjadinya hemoragi pada jaringan pulmo (Mach *et al.*, 2011). Menurut McGain dan Zachary (2007), terjadinya emfisema alveolar ditandai dengan adanya distensi dan pecahnya dinding alveolar sehingga terbentuk gelembung udara dengan ukuran dan bentuk yang bervariasi. Emfisema terjadi karena sel epitel elveolar merupakan target utama kerusakan yang diakibatkan oleh tingginya ROS.

Gambaran perubahan histopatologis pulmo mencit pada kelompok P1 dapat dilihat pada **Gambar 5.1 (C)** dimana pada gambar tersebut ditemukan adanya hemoragi, emfisema dan banyak ditemukan akumulasi sel radang, gambaran yang terlihat hampir sama dengan gambaran histopatologi pulmo mencit pada kelompok K+ dimana banyak variasi bentuk dan ukuran alveoli akibat pecahnya dinding alveolar. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rosella ungu pada dosis 7,56 mg/20 g BB tidak dapat memperbaiki jaringan yang rusak pada pulmo mencit yang diberikan oksigen berlebih.

Gambaran histopatologis pulmo mencit pada kelompok P2 (**Gambar 5.1 (D)**) ditemukan adanya hemoragi, emfisema, dan akumulasi sel radang, apabila dibandingkan dengan gambaran histopatologis pulmo mencit pada kelompok P1,

sel-sel radang yang ditemukan pada kelompok P2 lebih sedikit dan ditemukan pula emfisema yang lebih sedikit dilihat dari berkurangnya variasi bentuk dan ukuran pada alveoli. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis 15,12 mg/20 g BB belum dapat mengurangi kerusakan jaringan yang terjadi pada organ pulmo mencit yang diinduksi oksigen berlebih.

Gambar 5.1 (E) merupakan gambaran histopatologis pulmo mencit pada kelompok P3, dimana pada gambar tersebut masih ditemukan adanya hemoragi. Variasi bentuk dan ukuran alveoli pada gambar tersebut terlihat lebih normal mendekati gambaran pada kelompok K- dimana dinding alveoli terlihat normal. Akumulasi sel radang yang juga terlihat jauh lebih sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis 22,68 mg/20 g BB belum dapat mengatasi kerusakan yang terjadi pada pulmo secara signifikan, namun memiliki hasil yang lebih baik dibandingkan dosis 7,56 mg/20 g BB dan 15,12 mg/20 g BB.

Tingginya kadar antosianin yang merupakan senyawa dari famili flavanoid dalam rosella ungu yang berperan sebagai antioksidan mampu menetralkan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom pada molekul yang tidak stabil. Senyawa flavanoid memiliki gugus hidroksil fenolik (OH) berfungsi sebagai pereduksi yang dapat menampung hidroksil radikal dan superoksida yang merupakan ROS, sehingga mampu melindungi membran lipid dari kemampuan ROS dalam merusak jaringan. Reaksi gugus OH pada flavanoid juga mampu menghambat penggumpalan keping darah dan merangsang nitrit oksida yang

dapat merelaksasi pembuluh darah (Nurliani dkk., 2012). Dari hal tersebut, dapat dinyatakan bahwa antosianin dapat membantu menekan aktivitas ROS dalam merusak jaringan pada pulmo dengan kemampuan pereduksi dari senyawa flavanoid, membantu mencegah terjadinya kerusakan pada jaringan pulmo dengan menghambat penggumpalan darah dan merelaksasi pembuluh darah, serta membantu pulmo dalam memperbaiki dan meregenerasi sel-sel pulmo.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil pada penelitian yang telah kami lakukan ialah:

1. Pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis bertingkat mampu menurunkan kadar MDA secara signifikan pada mencit yang diinduksi oksigen berlebih terutama dengan dosis 22,68 mg/20 g BB.
2. Pemberian ekstrak rosella ungu dengan dosis bertingkat dapat memperbaiki gambaran histopatologis pulmo mencit mendekati normal namun belum signifikan.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap tingkat dosis optimum ekstrak rosella ungu terhadap mencit yang dipaparkan oksigen berlebih.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar dan Budhi. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Penerbit Adabia Press, UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Amin, M.H.F., A.P.W. Marhendra, dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap Kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma. Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang*. 437-447
- Anggraini dan Hafifah. 2014. *Hubungan Antara Oksigenasi dan Tingkat Kesadaran Pada Pasien Cedera Kepala Non Trauma di ICU RSUD Ulin Banjarmasin*. Semarang: Program Studi Ilmu Keperawatan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Anindyajati, E.A. 2007. *Pengaruh Asap Pelelehan Lilin Batik (malam) Terhadap Struktur Histologis Trakea dan Alveoli Pulmo, Jumlah Eritrosit Serta Kadar Hemoglobin Mencit*. Skripsi. Surakarta: UNS.
- Asali, A.R. 2010. *Terapi Oksigen Hiperbarik: Solusi Baru Hidup Sehat*. [Online] Available at: <http://www.tanyadok.com/teknoterapi-oksigen-hiperbariksolusi-baru-hidup-sehat>.
- Bhattacharya, S. 2015. *Reactive Oxygen Species and Cellular Defense*. India : Jaye Institute of Information Technology.
- Counter, W. 2012. *Modeling Lung Structure in Rodents*. Hmlton: McMaster University.
- Danusantoso, H. 2003. Peran Radikal Bebas Terhadap Beberapa Penyakit Baru. *Jurnal Kedokteran Trisakti*, 22(1), 31-36.
- Edward and Melissa L. 2010. *Hyperbaric Oxygen Therapy. Part 1: History And Principles. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. Veterinary Emergency and Critical Care Society. California.
- Fransius, P.S., Mangaratua. 2008. *Penampilan Reproduksi Mencit (Mus musculus) yang Diberi Daun Torbangung Kering*. Program Studi Teknologi Produksi Ternak, Fakultas Peternakan. Bogor: IPB.
- Halliwell, B. 2006. *Reactive Species and Antioxidant Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life*. *Plant Physiology*, 141 (2), 312-322.
- Herlinda, Andi. Abd. Malik. Ahmad, Najib. 2016. *Penetapan Kadar Fenolik Total dari Ekstrak Etanol Bunga Rosella (Hibiscus Sabdariffa L.) Berwarna*

Ungu Menggunakan Spektrofotometri UV-VIS. Fakultas Farmasi. Universitas Muslim Indonesia. Makassar. Vol 3 No.1.

- Inal, M.E., K. Gungör., and S. Emine. 2001. *Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Levels Related to Aging.* *Clinica Chimica Acta.* 305. 75-80.
- Junqueira, L. C., J. Carneiro. 2005. *Basic Histology Text & Atlas: Female Reproductive System. 11th ed.* United States of America: McGraw Hill.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar.* Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Kallet, Richard H., Michael A. Matthay. 2013. *Hyperoxic Acute Lung Injury.* National Institute of Health.
- Khaira, Kuntum. 2010. *Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan.* Jurnal Sainstek Vol II No.2: 183-187.
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan: Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan, Farmasi.* Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lina, H.S., S. Listyawati, dan Sutarno. 2003. *Analisis Kimia – Fisika Urin Tikus Putih (Rattus norvegicus) Setelah Pemberian Daun Seledri (Apium graveolenslinn).* *Journal of Biosmart* 1 (5): 43 – 46.
- Liu X. and Z. Chen. 2017. *The Pathophysiological Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Lung Disease.* Liu and Chen J Trans Med (2017) 15:207.
- Mach, William J., 2011. *Consequences of Hyperoxia and the Toxicity of Oxygen In the Lung.* Hindawi Publishing Corporation
- Mason R., C. Broaddus, and J. Murray. 2005. *Textbook of Respiratory Medicine.* Murray and Nadel's Vol.2 Second Edition.
- McGavin, M.D., and Zachary. 2007. *Respiratory System dalam Pathologic Basic of Veterinary Disease 4th Edition.* USA: Elsevier
- Mudassir, A. Aziz, dan A.Q. Punagi. 2012. *Analisis Kadar Malondialdehid (Mda) Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi Pada Pemeriksaan Histopatologi.* Makasar: Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

- Novitasari, Made Oka. 2017. *Analisis Histopatologi Organ Paru-Paru Mencit yang Diberi Pretreatment untuk Penyiapan Penelitian Biomedis*. Bogor: IPB
- Nurliani A., Santoso HB., dan Rusmiati. 2012. *Efek Antioksidan Ekstrak Bulbus Bawang Dayak pada Gambaran Histopatologis Paru-Paru Tikus yang Dipapar Asap Rokok*. Jurnal Bioscientiae, Vol.9, Nomor 1.
- Pham-Huy,L., H. He, and C. Pham-Huy. 2008. *Free Radical, Antioxidant in Disease and Health*. International Journal of Biomedical Science, Vol. 4, No.2, pp. 89-96.
- Sayuti, Kesuma. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press. Padang.
- Semedi, B., dan Hardiono. 2012. *Pemantauan Oksigenasi*. Majalah Kedokteran Terapi Intensif Volume 2 Nomor 2.
- Setyo-Budi, Untung. 2009. *Biologi Tanaman Kenaf*. Malang: Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat.
- Treuting, P. And S. Dintziz. 2012. *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas*. USA: Elsevier Inc.
- Ulilalbab, Arya. Bambang, Wirjatmadi. Merryana, Adriani. 2015. *Ekstrak Kelopak Rosella Merah Mencegah Kenaikan Malondialdehid Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok*. Universitas Airlangga. Hlm. 215-220.
- Wiryanthini IA, Dewi. IGM, Aman. NA, Bagiada. 2012. *Pemberian Ekstrak Biji Kakao (Theobroma cacao L.) Menurunkan Kadar Malondialdehide dan Meningkatkan Kadar Nox Darah Tikus Putih Yang Diinduksi Stres Psikososial*. Bali: Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana.
- Wojciech W., Teresa W., Bozena P. 2002. *F₂ – Isoprostanes Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility In Evaluation of Oxidative Stress Induced By Toxic Agents*. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, Vol. 15, No. 1, 19-27.
- Yunus, M. 2001. *Pengaruh Antioksidan Vitamin C Terhadap MDA Eritrosit Tikus Wistar Akibat Latihan Anaerobik*. Jurnal Pendidikan Jasmani, (1): 9-16.