

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Monosodium Glutamat

2.1.1. Pengertian Monosodium Glutamat

Monosodium glutamat (MSG) adalah garam sodium sodium *L-glutamic acid* yang merupakan hasil dari purifikasi glutamat atau gabungan dari beberapa asam amino dengan jumlah kecil peptide yang dihasilkan dari proses hidrolisa protein (*hydrolyzed vegetable protein/HVP*). Asam glutamat digolongkan pada asam amino essensial karena tubuh manusia juga dapat menghasilkan asam glutamat (Septadina, 2014).

Monosodium glutamat pertama kali diisolasi oleh Dr. Kikunae Ikeda pada tahun 1909. Monosodium glutamat sendiri sebenarnya sama sekali tidak menghadirkan rasa yang enak, bahkan sering menghadirkan rasa yang dideskripsikan sebagai rasa pahit, dan asin. Pemberian MSG pada bahan makanan yang sesuai dengan konsentrasi rendah, akan membuat makanan tersebut menjadi nikmat yang dapat diterima masyarakat (Kobayashi *et al.*, 2002).

Dalam bahasa Jepang, hasil rasa yang dimunculkan MSG dikenal dengan kata umami yang artinya gurih. Untuk menghasilkan rasa gurih konsentrasi optimal MSG hanya sekitar 0,2 – 0,8 %. *Food Drug Administration* (FDA) mengkatagorikan MSG sebagai *food additive* atau *food enhancer* (Sand, 2005).

Lolinger, 2000 mengatakan bahwa penggunaan MSG terbanyak banyak di jumpai pada masyarakat Korea yaitu 1,6 gr/hr. Penggunaan MSG di Indonesia sekitar 0,6 gr/hari, sedangkan di Negara industri penggunaan MSG sekitar 0.3-1.0 gr. Pemakaian MSG dapat menjadi tinggi tergantung pada jenis makanan dan pilihan rasa seseorang (Geha, *et al.*, 2000).

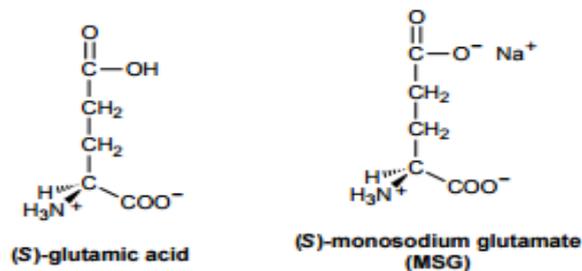
Penggunaan MSG yang berlebihan dapat menyebabkan timbulnya rasa mual dan pusing yang dikenal dengan *Chinese Restaurant Syndrome* (Sand, 2005), tetapi tidak semua manusia dewasa yang mengkonsumsi MSG berlebih mengalami *Chinese Restaurant Syndrome*. Walker and Lupien 2000 mengatakan hal ini dikarenakan setiap manusia memiliki intoleransi dalam tubuh yang berbeda-beda. *Food Drug Administration* (FDA) menyatakan MSG sebagai *Generally Recognized As Safe* (GRAS), dimana penggunaan MSG dalam kadar normal dan jangka waktu yang lama terbukti tidak menyebabkan masalah serius kesehatan. MSG untuk menghasilkan gejala, seperti kesemutan, kelemahan, memerah, berkeringat, rasa pusing dan sakit kepala, dimulai antara 10 menit dan 2 jam setelah mengkonsumsi MSG. Gejala ini dapat muncul hingga 4 jam (Farombi and Onyema, 2006).

Glutamat dalam MSG yang berasal dari hidrolisa protein tumbuhan merupakan glutamat dalam bentuk bebas. Konsumsi glutamat bebas akan meningkatkan kadar glutamat dalam plasma darah. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar puncak asam glutamat plasma adalah rute administrasi (oral, subkutan dan intraperitoneal), konsentrasi MSG dalam larutan (2%, 10%), dan usia (hewan baru lahir memetabolisme asam glutamat lebih rendah dari pada dewasa). Pertukaran asam glutamat setiap harinya dalam tubuh adalah sekitar 48 g (Megawati, 2008).

Asam glutamat adalah suatu asam amino yang di dalam tubuh akan dikonversikan menjadi glutamat. Glutamat berperan sebagai neurotransmitter yang menyebabkan sel-sel neuron yang ada di otak dapat berkomunikasi antara yang satu dengan lainnya. Asam glutamat biasanya terikat pada molekul protein yang terdapat di dalam makanan, kemudian protein tersebut secara perlahan akan dipecahkan dan kemudian diserap oleh tubuh. Glutamat didalam MSG tidak terikat pada molekul protein melainkan dalam bentuk bebas (Maya, 2010).

2.1.2. Sifat Kimia Monosodium Glutamat

Monosodium glutamat (MSG) berupa serbuk kristal putih dengan rumus molekul $C_5H_8NNaO_4$, berat molekul 187,13, mempunyai sifat kelarutan 74 g/100 ml air (sangat mudah larut dalam air), tetapi tidak bersifat higroskopis dan praktis tidak larut dalam pelarut organik umum seperti eter. MSG mengandung 77% asam glutamat, 22% sodium dan 1%, air (Eweka, 2011).



Gambar 2.1 Rumus Kimia Monosodium Glutamat (Kauffman, 2004)

Monosodium glutamat memiliki rumus molekul $C_5H_8O_4NaH_2O$ (13,6% Na, 35,5% C, 4,8% H, 8,3% N dan sisanya O) dan berat molekul 187,13. Bentuk kristal MSG mudah larut dalam air. MSG dapat membentuk pentahidrat jika dikristalkan dengan air dibawah 0°C.

MSG komponen utamanya adalah asam glutamat-L yang merupakan asam amino. Asam glutamat merupakan salah satu asam amino yang tergantung dalam makanan, yaitu sekitar 5-20% dari total kandungan asam amino, baik dalam bentuk bebas maupun terikat dengan peptide atau protein (Geha *et al*, 2000). Glutamat yang terdapat di dalam MSG merupakan salah satu asam amino yang banyak dijumpai pada beberapa makanan, kandungan glutamat 20% dari total asam amino pada beberapa makanan baik dalam bentuk bebas maupun terikat dengan peptide (Fernstrom, Garratini. 2000).

2.1.3. Sumber Asam Glutamat

Glutamat sering dijumpai dalam alam, tetapi ada juga yang terdapat dalam makanan dan tubuh manusia, baik dalam bentuk bebas maupun terikat sebagai

peptida maupun protein. Glutamat yang terikat dengan protein tidak mempunyai daya penyedap seperti bentuk bebas. Asam Glutamat merupakan unsur pokok dari protein yang terdapat pada bermacam-macam sayuran, daging, ikan dan air susu ibu. Protein hewani mengandung 11-22% asam glutamat sedangkan protein nabati mengandung 40% glutamat (Giacometti, 1979).

Jenis makanan yang mengandung banyak protein seperti ASI (air susu ibu), susu sapi, keju dan daging mengandung banyak glutamat sedangkan sebagian besar sayuran sedikit kandungan glutamatnya, tetapi ada sayuran atau buah tertentu yang mengandung banyak glutamat bebas seperti jamur-jamur, tomat, peas. Pada protein hewani seperti keju, daging banyak mengandung asam glutamat yang terikat dengan protein lain. Sedangkan pada sayuran seperti tomat, kacang polong dan kentang banyak mengandung asam glutamat dalam bentuk bebas.

2.1.4. Metabolisme MSG

Monosodium glutamat dimetabolisme di dalam tubuh. Metabolisme ini sama dengan seperti metabolisme asam glutamat. Asam amino dekarboksilat, glutamat dan aspartat berperan penting dalam metabolisme perantara, yaitu dalam produksi energi, sintesis urea, sintesis glutathion dan sebagai neurotransmitter. Asam amino ini merupakan asam utama yang diperoleh di dalam mitokondria sel (Giacometti, 1979).

Tubuh manusia dapat membuat sekitar 50 g glutamat bebas setiap hari. Sebagian besar glutamat yang terdapat dalam makanan akan dimetabolisme dengan cepat dan akan digunakan sebagai sumber energi. Asam glutamat merupakan metabolit yang penting dalam metabolisme asam amino dan merupakan sumber energi utama pada sel otot jantung. MSG ditambahkan dengan bentuk sediaan garam monosodium murni ataupun bentuk campuran komponen

asam amino dan peptida yang berasal dari asam atau enzim hidrolisa protein (Geha, *et al.*, 2000).

Glutamat yang terdapat dalam MSG merupakan asam amino yang banyak dijumpai pada makanan, kandungan glutamat 20% dari total asam amino pada beberapa makanan baik bebas maupun terikat dengan peptide maupun protein. Konsumsi glutamat dalam bebas akan meningkatkan kadar glutamat dalam plasma darah, kemudian glutamat di dalam mukosa usus halus akan diubah menjadi alanin lalu didalam hati akan diubah menjadi glukosa dan laktat. Kadar puncak tertinggi yang dicapai hewan dewasa setelah mengkonsumsi MSG secara oral 1 g/kg berat badan, kadar terendah dijumpai pada kelinci dan meningkat secara progresif pada monyet, anjing, mencit, tikus dan marmut. Adapun faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kadar puncak asam glutamat plasma pada saat pemberian secara oral lebih berpengaruh dibandingkan pemberian secara subkutan dan intraperitoneal, konsentrasi MSG dalam larutan (2% , 10%) dan usia (hewan baru lahir metabolisme asam glutamat lebih rendah dari pada dewasa) (Garattini, 2000).

L-glutamic acid (GA) adalah asam amino yang ada di sebagian besar makanan baik dalam bentuk bebas maupun yang terikat dalam peptida dan protein. Pria dengan berat badan 70 kg memiliki asupan GA harian 20 g yang berasal dari pola makan dan pemecahan protein di usus. Pergantian GA dalam tubuh dalam tubuh adalah; 48 g. Terlepas dari pemasukkan yang besar ini total GA di dalam darah cukup kecil yaitu 20 mg, hal ini disebabkan karena pengambilan dan pemanfaatan yang cepat dari berbagai jaringan terutama otot dan hati (Garratini, 2000).

Menurut Stegink, *et al.* (1979) bahwa pemberian MSG secara parenteral akan memberikan reaksi yang berbeda dibandingkan dengan pemberian MSG per oral. Pemberian MSG secara parenteral tidak melalui usus dan vena portal,

Sedangkan pada pemberian MSG per oral, akan melalui usus ke sirkulasi portal dan hati. Hati mempunyai kesanggupan untuk metabolisme asam glutamat ke metabolit lain, sehingga jika pemberian glutamat melebihi kemampuan kapasitas hati untuk metabolismenya, maka dapat menyebabkan peningkatan glutamat plasma (Garratini, 2000).

Fungsi glutamat di dalam proses metabolisme di dalam tubuh menurut Septadina, 2014, yaitu:

2.1.4.1 Substansi untuk sintesa protein

Glutamat sebagai salah satu asam amino yang banyak terdapat di dalam sumber alami. Asam glutamat memiliki karakter fisik dan kimia yang dapat menjadi struktur sekunder dari protein yang disebut rantai α -*helix*.

2.1.4.2 Pasangan transaminase dengan α ketoglutarate

L-glutamat disintesa dari ammonia dan α -*ketoglutarate* dalam suatu reaksi yang dikatalisir oleh *L-glutamat dehydrogenhase* (siklus asam sitrat).

Glutamat yang telah diserap kemudian ditransaminasikan dengan piruvat dalam bentuk alanin. Alanin dari hasil transaminasi dari piruvat, oleh asam amino dekaboksilat menghasilkan aketoglutarat atau oksaloasetat. Glutamat yang lolos dari metabolisme mukosa, dibawa melalui vena portal ke hati. Sebagian glutamat dikonversikan oleh usus dan hati dalam bentuk glukosa dan laktat, kemudian dialirkan ke darah perifer.

1. Prekursor glutamin

Glutamin dibentuk dari glutamat oleh glutamin sintetase. Ammonia akan dikonversikan menjadi glutamin sebelum masuk ke dalam sirkulasi. Glutamat dan glutamin merupakan mata rantai karbon dan nitrogen di dalam proses metabolisme karbohidrat dan protein

2. Prekursor dari *N-acetylglutamat*

N-acetylglutamat merupakan allosterik yang penting untuk mengaktifkan *carbamyl - phosphate syntehtase I*, suatu enzim yang berperan penting di dalam siklus urea

3. *Neurotransmitter*

Glutamat adalah transmitter mayor di otak, berfungsi sebagai mediator untuk menyampaikan transmisi post sinaptik. Selain itu juga glutamat berfungsi sebagai prekursor dari neurotransmitter *Gamma Ammino Butiric Acid* (GABA).

2.1.5. Reseptor Glutamat

Reseptor merupakan suatu molekul protein yang dapat menerima signal dari luar sel sebagai pemandu dalam kegiatan sel. Reseptor berada pada membran sel, sitoplasma dan nukleus dimana masing-masing reseptor hanya dapat berikatan dengan molekul kimia tertentu yang sesuai dengan fungsinya. Ligan adalah molekul yang memberikan signal. Ligan tersebut berbentuk seperti protein atau molekul kecil lainnya seperti hormon, neurotransmitter, obat dan toksin. Reseptor glutamat adalah reseptor sinaptik yang terletak pada membran sel saraf yang bertindak sebagai neurotransmitter. Reseptor glutamat juga bertanggung jawab dalam komunikasi antar sel, pembentukan memori serta dalam regulasi fungsi hipotalamus (Meeker et al, 1994). Fungsi reseptor glutamat pada sistem reproduksi adalah sebagai mediator untuk terjadinya regulasi hormon steroid, pematangan gonad, pematangan serta motilitas sperma dan ovum, ovulasi, konsepsi, gerakan peristaltik tuba dan miometrium (Gill and Pulido, 2001)

Glutamat merupakan neurotransmitter yang memiliki peranan penting untuk proses komunikasi antar sel-sel otak. Normalnya, apabila terjadi kelebihan glutamat, glutamat akan dialirkan kembali ke dalam sel-sel glia yang mengelilingi neuron. Sebab, bila neuron tepapar dengan glutamat dalam jumlah

besar, maka sel tersebut akan mati. Glutamat membuka Ca^{2+} *channel* neuron sehingga Ca^{2+} dapat masuk ke dalam sel. Sejumlah reaksi kimia terjadi di dalam sel yang sering kali memicu pelepasan bahan-bahan kimia, menstimulasi neuron yang berhubungan dan seterusnya. Salah satu hasil dari reaksi kimia di neuron adalah asam arachidonat. Asam arachidonat kemudian bereaksi dengan 2 enzim yang berbeda, melepaskan radikal bebas seperti *hydroxyl radical*. *Hydroxyl radical* inilah yang dapat membunuh sel-sel otak. Bila kadar glutamat menjadi berlebih, Ca^{2+} *channel* akan tetap terbuka sehingga reaksi kimia yang terjadi juga akan semakin meningkat mengawali pengrusakan sel tersebut dan sel-sel yang berdekatan yang memiliki reseptor glutamat (Machrina, 2009)

Menurut Foran and Trotty (2009) menunjukkan bahwa sinyal glutamat melalui dua jenis reseptor, reseptor ionotropik (Iglu) dan reseptor metabotropik (mGlu) yaitu:

1. Reseptor Ionotropik (IgluR) bertindak sebagai saluran ion glutamat yang mengatur respon secara cepat pada saat aktivasi atau disebut juga suatu aktivasi reseptor secara langsung digabungkan ke saluran ion membran. Reseptor ionotropik itu sendiri diklasifikasikan menjadi 3 subtipe yaitu N-methyl-D-aspartate (NMDA), α -amino-3- hidroksi-5-metil-4 isoxazole propionic acid (AMPA) dan Kainate (Ka) reseptor. Saluran membran yang terkait dengan reseptor menunjukkan sifat farmakologis dan sifat elektrofisiologi bervariasi, termasuk selektivitas ionik saluran natrium (Na), kalium (K) dan kalsium (Ca^{2+}). Reseptor ionik ini juga memainkan peranan penting dalam penghantaran sinyal neurotransmitter eksitatorik. Eksitasi yang berlebihan dari reseptor N-methyl-D-aspartate (NMDA) oleh glutamat menyebabkan pembukaan kanal Ca^{2+} ke dalam neuron sehingga konsentrasinya melewati ambang batas.

2. Reseptor metabotropik (mGluR) merupakan reseptor G-protein-coupled modulasi transduksi sinyal kaskade atau disebut juga aktivasi reseptor digabungkan ke kaskade biokimia intraseluler yang mungkin akhirnya menyebabkan membuka atau penutupan saluran ion membran. Reseptor metabotropik berhubungan dengan protein G dan mengaktivasi metabolisme intraseluler, serta memainkan peranan penting dalam mengatur arus Ca^{2+} yang disebabkan aktivasi NMDA. Reseptor mGlu dibagi menjadi 3 subfamili yaitu kelompok I (mGlu1 dan mGlu5), kelompok II (mGlu2 dan mGlu3), dan kelompok III (mGlu4, mGlu6, mGlu7, dan mGlu8) (Niswender and Conn, 2010). Dalam CNS (*central nervous sistem*), aktivasi mGluR reseptor dari kelompok I merangsang hidrolisis phosphoinositide dengan formasi berikutnya inositol 1,4,5-trifosfat dan diasilgliserol, sedangkan reseptor dari kelompok II dan III menginduksi penurunan pada intraseluler tingkat cAMP pada saat aktivasi.

Tabel 2.1. Skema Klasifikasi Reseptor Asam Glutamat

| Kelas Reseptor | Kelompok | Efek |
|------------------------|-------------------------|--|
| Ionotropic receptors | | |
| AMPA | iGluR1; iGluR4y | influx of Na ⁺ |
| Kainate | iGluR5; iGluR7 KA1; KA2 | influx of Na ⁺ |
| NMDA | NR1; NR2A–D; NR3 | influx of Ca ²⁺ |
| Metabotropic receptors | | |
| | 1. mGluR1a–c; mGluR5 | phosphoinositide hydrolysis activation |
| | 2. mGluR 2; mGluR3 | cAMP inhibition |
| | 3. mGluR4,6,7,8 | cAMP inhibition |

Keterangan : Klasifikasi reseptor asam glutamat sesuai dengan kelas reseptor dan efek dari asam glutamat (Garratini, 2000).

2.1.6. Farmakokinetik MSG

Secara farmakokinetik, setiap obat yang masuk ke dalam tubuh akan mengalami proses absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi. Konsumsi MSG akan melalui proses absorpsi di usus, didistribusikan ke seluruh tubuh dan

mengalami proses metabolisme di hepar dan selanjutnya diekskresikan melalui feses maupun urin. Ginjal merupakan organ ekskresi utama yang sangat penting untuk mengeluarkan sisa-sisa metabolisme tubuh, termasuk zat-zat toksik yang tidak sengaja masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan keadaan stres oksidatif (Zulfi, 2013).

Pemberian MSG secara parenteral akan memberikan reaksi yang berbeda dengan pemberian MSG per oral karena pada pemberian secara parenteral, MSG tidak melalui usus dan vena portal. Sedangkan pada pemberian per oral, MSG akan melalui usus ke sirkulasi portal dan hati. Hati mempunyai kesanggupan untuk metabolisme asam glutamat ke metabolit lain. Oleh karena itu, apabila pemberian glutamat melebihi kemampuan kapasitas hati untuk metabolisme glutamat, sehingga akan meningkatkan kadar plasma glutamat. Glutamat diserap dari usus oleh sistem transportasi aktif ke dalam sel mukosa dan dimetabolisme sebagai sumber energi. Sangat sedikit glutamat yang benar-benar mencapai vena portal, efek dari hal ini adalah bahwa kadar plasma glutamat hanya dipengaruhi oleh konsumsi MSG (Onaolapo *et al.*, 2016).

2.1.7. Hubungan antar MSG dengan Sistem Reproduksi

Fungsi sistem reproduksi manusia diatur oleh hipotalamus. Hipotalamus mengatur pengeluaran hormon yang bekerja pada gonad karena hipotalamus bekerja sebagai pusat pengaturan homeostasis,. *Gonadotropin Releasing Hormone* (GnRH) yang disekresikan dari hipotalamus akan berikatan dengan reseptor *gonadotrophs* di hipofisis anterior yang merangsang pengeluaran *gonadotropine hormone* (LH dan FSH) masuk ke dalam aliran darah menuju gonad. Di gonad, LH dan FSH menstimulasi sekresi hormon steroid reproduksi seperti testosteron, estrogen dan progesteron. Hormon reproduksi menghambat

sekresi GnRH dan *gonadotropin hormone* melalui negatif *feed back* (Bowen, 2000).

Jumlah GnRH dan LH bervariasi dari beberapa hari ke satu jam atau lebih. Pada wanita, frekuensi pulsasi jelas berhubungan dengan tahapan siklus. Sejumlah hormon mempengaruhi sekresi GnRH, dan kontrol positif–negatif melalui sekresi GnRH dan gonadotropin biasanya lebih kompleks. Organ reproduksi wanita mensekresi setidaknya 2 tambahan hormon yaitu inhibin dan aktivin yang secara selektif menghambat dan mengaktifasi sekresi FSH dari pituitary (Sheerwood, 2011).

Menurut Olney, konsentrasi di atas 60 u Mol/dl dapat menyebabkan kerusakan pada otak, lesi dapat terjadi pada nukleus arkuata hipotalamus pada mencit muda oleh pemberian MSG secara per oral atau subkutan. Pada penyuntikan tunggal subkutan MSG, terjadi peningkatan kadar glutamat empat kali lipat pada nukleus arkuata hipotalamus, diikuti dengan kenaikan glutamat dalam plasma. Puncak dari kadar glutamat dalam plasma terjadi setelah 15 menit, dan kadar puncak di dalam nukleus arkuata dicapai setelah 3 jam. Hasilnya menunjukkan bahwa konsentrasi plasma setelah tingkat tertentu dapat menyebabkan lesi pada otak. Stegink dan kawan-kawan menetapkan bahwa kerusakan nukleus arkuata tidak terjadi pada tikus pada kadar MSG plasma di bawah 50 u Mol/dl. Selain itu beberapa peneliti lain mengatakan bahwa MSG dapat menyebabkan gangguan endokrin melalui mekanisme hipotalamus-hipofisis (Septadina, 2014).

Pemberian MSG 4 mg/g berat badan secara intraperitoneal pada tikus yang baru lahir selama 2 hari sampai usia 10 hari dan diperiksa pada usia pubertas dan dewasa, memperlihatkan pada usia pubertas terjadi hiperleptinemia, hiperadiposit dan peningkatan kadar kortikosteron, penurunan berat testis, jumlah sel Sertoli dan sel Leydig per testis, serta penurunan kadar *LH (Luteinizing Hormone)*, *FSH*

(*Follicle Stimulating Hormone*), *T* (*Thiroid*). Sementara pada saat dewasa memperlihatkan hiperleptinemia yang lebih tinggi dan penurunan kadar FSH dan lebih rendah tetapi kadar *T* normal, tanpa indikasi perubahan struktur testis (Miskowiak *et al.*, 1992).

Percobaan mengenai efek toksik MSG menunjukkan hasil yang kontroversial. Penelitian yang dilakukan pada hewan percobaan dalam periode neonatal atau *infant* dengan pemberian MSG dosis tinggi melalui penyuntikan, ditemukan beberapa bukti bahwa MSG dapat menyebabkan nekrosis pada *neuron hipotalamus* dan nukleus arkuata hipotalamus, kemandulan pada jantan dan betina, berkurangnya berat hipofisis anterior, adrenal, tiroid, uterus, ovarium, dan testis, kerusakan fungsi reproduksi, dan berkurangnya jumlah anak (Zulfi, 2013).

Pemberian MSG pada tikus Wistar dengan dosis 6 gr dapat menyebabkan perubahan pada gambaran histologis ovarium berupa hipertropi sel, dan degenerasi serta atrofi pada lapisan granulosa. Pemberian dosis yang tinggi akan memberikan pengaruh terhadap perkembangan oosit bahkan dapat menjadi infertilitas. Monosodium glutamat dapat memberikan efek toksik terhadap oosit dan folikel di dalam ovarium. Proses nekrosis sel melibatkan perusakan pada struktur dan integritas membran sel (Eweka and Om'Iniabohs, 2011).

Pemberian MSG pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) secara umum dapat mempersingkat fase diestrus, namun dapat memperpanjang fase proestrus dan estrus. Pemberian MSG juga menyebabkan kerusakan struktur histologis ovarium, yaitu: terlepasnya sel-sel granulosa dari lamina basal, terdapat banyak celah di antara sel-sel granulosa, terlepasnya sel-sel folikel dan masuk ke antrum, rusaknya jaringan teka dan sel telur berdegenerasi. Secara kuantitatif, pemberian MSG pada tikus putih tidak mempengaruhi jumlah folikel primer secara signifikan, tetapi menyebabkan penurunan yang signifikan pada jumlah folikel sekunder,

folikel tersier, korpus luteum, dan menyebabkan peningkatan jumlah folikel atresia (Megawati, 2008).

2.2. Radikal Bebas, ROS dan Stres Oksidatif

2.2.1. Pengertian Radikal Bebas, ROS dan Stres Oksidatif

2.2.1.1 Pengertian Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu atom, gugus, atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit paling luar, termasuk atom hidrogen, logam-logam transisi, dan molekul oksigen. Adanya 'elektron tidak berpasangan ini, menyebabkan radikal bebas secara kimiawi menjadi sangat aktif. Radikal bebas dapat bermuatan positif (kation), negatif (anion), atau tidak bermuatan (Halliwell dan Gutteridge, 2000).

Radikal bebas merupakan suatu unsur atau senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas dapat ditemukan dalam tubuh manusia, sebagian besar tergolong ke dalam kelompok Reaktif Oksigen Spesies (*reactive oxygen species*) (Shaban *et al.* 2003).

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, radikal bebas sangat reaktif dan tidak stabil, sebagai usaha untuk mencapai kestabilannya radikal bebas akan bereaksi dengan atom atau molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini dalam tubuh dapat menimbulkan reaksi berantai yang mampu merusak struktur sel, bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Inggrid, 2004).

2.2.1.2 Pengertian *Reactive Oxygen Species (ROS)*

ROS adalah molekul yang tidak berpasangan yang bersifat sangat tidak stabil dan sangat reaktif. ROS hanya dapat bertahan dalam hitungan *millisecond* (10^{-9} – 10^{-12}) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan dirinya. Diketahui berbagai macam ROS, yang paling banyak efeknya yang berbahaya dan merusak adalah superoksida ($\cdot O_2^-$), hydroxyl ($\cdot OH$), dan pehydroxyl (O_2H). Produksi ROS yang berlebihan akan mengganggu proses homeostasis, menstimulasi pertumbuhan sel, tergantung pada seberapa besar produksi ROS. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan, mengarahkan sel menuju stres oksidatif. Jika produksi ROS seimbang dengan kapasitas antioksidan, dapat mengarahkan sel pada pertumbuhan. Sumber lain ROS juga berasal dari reaksi oksidasi biologi dalam tubuh terutama dari mitochondria (Widayati, 2017).

Senyawa oksigen reaktif akan terbentuk setiap saat dalam setiap kegiatan, bahkan pada saat kita sedang bernafas. Terbentuknya senyawa oksigen dipicu oleh beberapa faktor lingkungan (Winarsi, 2007), yaitu

1. Pestisida atau karbon tetraklorida (CCl_4). Setelah senyawa ini masuk kedalam tubuh akan bereaksi dengan sitokrom P_{450} monooksigenase dan menghasilkan radikal triklorometil (CCl_3) dan triklorometilperoksil (CCl_3O_2).
2. Senyawa hasil pemanggangan daging berlemak (benzoapirene) masuk kedalam tubuh berubah menjadi senyawa radikal 7.8-diol-9-10-epoksida.
3. Bahan aditif pangan (Red E_{120} dan asam karmiat) berperan sebagai inisiator dalam proses peroksidasi lipid sehingga menimbulkan kerusakan jaringan.

Tabel 2.2. Reaktif Oksigen Spesies (ROS)

| No | Radikal | |
|----|---|---|
| 1 | O ₂ [*] superoxide | H ₂ O ₂ Hydrogen peroxide |
| 2 | HO [*] hydroxyl radical | ¹ O ₂ singlet oxygen |
| 3 | hydroperoxyl radical LO ₂ [*] | LOOH lipid hydroperoxide |
| 4 | Lipid peroxy radical LO [*] | Fe=O iron-oxygen complexes |
| 5 | Lipid alkoxy radical | HOCl hypochlorite |
| 6 | NO ₂ nitrogen dioxide | |
| 7 | NO [*] nitric oxide | |

Keterangan : Pembagian kelompok Reaktif Oksigen Spesies sesuai dengan sifat radikal (Sayuti 2015).

2.2.1.3 Pengertian Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan antara produksi ROS dengan antioksidan. Stress oksidatif dapat berasal dari mutasi yang terjadi pada enzim yang berperan sebagai antioksidan sehingga menyebabkan antioksidan berkurang atau tidak ada. Selain itu ROS dapat disebabkan karena kurangnya asupan antioksidan dari luar tubuh. Peningkatan produksi ROS disebabkan karena adanya paparan berlebih terhadap O₂, akibat dari metabolisme penghasil ROS yang bersifat toksin atau over aktivasi dari sistem alami ROS (Halliwell and Gutteridge, 2015).

2.2.2. Sumber-Sumber Radikal Bebas

Sumber-sumber radikal bebas semakin banyak dijumpai seiring dengan gaya hidup, kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi. Sumber radikal bebas bisa berasal dari proses metabolisme dalam tubuh (internal) dan dapat berasal dari luar tubuh (eksternal) (Ramadhan, 2015).

Radikal bebas di dalam tubuh manusia berasal dari 2 sumber yaitu (Ramadhan, 2015):

1. Sumber Endogen

Sumber yang berasal dari proses metabolik normal dalam tubuh manusia, lebih dari 90% oksigen diproduksi dari proses metabolik tubuh, yang melalui

proses oksidasi makanan dalam menghasilkan tenaga di mitokondria, sel darah putih menghancurkan pathogen yang menyerang, proses oksidasi xanthin, reaksi yang melibatkan besi dan logam lain, olah raga. Sumber endogen lainnya yaitu :

- a. Autoksidasi
- b. Oksidasi enzimatis
- c. *Respiratory burst*

2. Sumber Eksogen

Sumber yang berasal dari luar dan dapat meningkatkan kadar radikal bebas secara mendadak, seperti penipisan lapisan ozon, sumber radiasi, bahan kimia, toksin, asap rokok, mikroorganisme yang patologik, sinar UV, obat anestesia, pestisida.

2.2.3. Tipe-Tipe Radikal Bebas

Jenis-jenis radikal bebas yang dapat merusak sel terdiri dari (Setiati,2003) :

1. *Reactive Oxygen Species (ROS)*,

Reaktif Oksigen Spesies (ROS) bisa dibagi menjadi dua kelas, yaitu *oxygen-centered radicals* dan *oxygen-centered non-radicals*. Adapun yang termasuk *oxygen-centered radicals* adalah anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^*), radikal alkoksil (RO^*) dan radikal peroksil (ROO^*). Sedangkan yang tergolong kedalam *oxygen-centered non-radicals* adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), dan singlet oxygen (O_2^*). Senyawa reaktif lainnya adalah nitrit oksida (NO^*), nitric dioksida (NO_2^*) dan peroksinitril (OONO^*). ROS dalam sistem biologi berkorelasi dengan radikal bebas walaupun ROS tidak tergolong radikal bebas, seperti oksigen tunggal dan hidrogen peroksida. Radikal bebas dan ROS dapat dibentuk oleh sistem prooksidatif, oksidasi lipid, irradiasi, inflamasi, merokok dan polusi udara (Sayuti, 2015). Senyawa yang mudah mengalami perubahan

menjadi radikal bebas seperti hidrogen peroksida (HP), ozon (O₃) dan HOCl (Setiati, 2003).

Di antara senyawa-senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil (OH[•]) merupakan senyawa yang paling berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, DNA, yang merupakan piranti genetik dari sel, protein, yang memegang berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2. *Reactive Nitrogen Species (RNS)*,

Spesies nitrogen reaktif (RNS) adalah golongan keluarga dari molekul antimikroba yang berasal dari oksida nitrat (\bullet NO) dan superoksida (O₂ \bullet -) yang dihasilkan melalui aktivitas enzimatis yang diinduksi nitrat oksida sintase 2 (NOS2) dan NADPH oksidase masing-masing. NOS2 dinyatakan terutama dalam makrofag setelah induksi oleh sitokin dan produk mikroba, khususnya interferon-gamma (IFN- γ) dan lipopolisakarida (LPS). [2]. spesies nitrogen reaktif bertindak bersama-sama dengan Reaktif Oksigen Spesies (ROS) untuk merusak sel, menyebabkan stres nitrosative. Oleh karena itu, dua spesies ini sering kolektif disebut sebagai ROS / RNS. Misalnya nitrogen dioksida (NO₂) dan peroksinitrit (ONOO⁻) dan bukan radikal bebas seperti HNO₂ dan NP₄

Di antara senyawa-senyawa oksigen reaktif, radikal hidroksil (OH[•]) merupakan senyawa yang paling berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel, DNA, yang merupakan piranti genetik dari sel, protein, yang memegang berbagai peran penting seperti

enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton (Halliwell and Gutteridge, 2007).

2.2.4. Mekanisme Kerja Radikal Bebas

Secara biokimia oksidasi merupakan pelepasan elektron dari suatu senyawa. Sedangkan reduksi adalah proses penangkapan elektron. Senyawa yang dapat menarik atau menerima elektron di sebut oksidan atau oksidator, sedangkan senyawa yang dapat melepaskan atau memberikan elektron disebut reduktan atau reduktor (Winarsi, 2007).

Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat ditunjukkan oleh rendahnya aktivitas enzim antioksidan dan tingginya kadar Malondialdehid (MDA) dalam plasma. Meningkatnya usia seseorang, sel-sel tubuh mengalami degeneratif, proses metabolisme terganggu, dan respons imun juga menurun sehingga dapat menimbulkan penyakit degeneratif (Winarsi, 2007).

Menurut Giriwijoyo, 2004 tubuh manusia mengandung molekul oksigen yang stabil dan yang tidak stabil. Molekul oksigen yang stabil untuk memelihara kehidupan sel. Radikal bebas di dalam tubuh dalam jumlah tertentu diperlukan untuk menjaga kesehatan seperti untuk melawan radang, membunuh bakteri dan mengatur tonus otot polos dalam organ dan pembuluh darah. Namun apabila dalam jumlah berlebih radikal bebas dapat merusak dan sangat berbahaya bagi tubuh (Sayuti, 2015).

Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dengan cara tiga cara yaitu (Kumar *et al.* 2015) :

1. Peroksidasi komponen lipid dari membran sel dan sitosol.

Menyebabkan serangkaian reduksi asam lemak (otokatalisis) yang mengakibatkan kerusakan membran dan organel sel.

2. Kerusakan DNA

Kerusakan DNA ini mengakibatkan mutasi DNA bahkan dapat menimbulkan kematian sel.

3. Modifikasi protein teroksidasi oleh karena terbentuknya *cross linking protein*, melalui mediator sflidril atas beberapa atas beberapa asam amino labil seperti sistein, metionin, lisin dan histidin.

Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari elektron. Dampak kerja radikal bebas maka akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Apabila dua senyawa radikal bertemu elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil, sebaliknya bila senyawa radikal bebas bertemu dengan senyawa bukan radikal bebas maka akan terjadi (Winarsi, 2007):

1. Radikal bebas akan memberikan elektron yang tidak berpasangan (reduktor) kepada senyawa bukan radikal bebas
2. Radikal bebas menerima elektron (oksidator) dari senyawa bukan radikal bebas
3. Radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas

2.2.5. MSG dan Radikal Bebas

Farombi dan Onyema (2006), pemberian MSG 4 mg/g BB secara interperitoneal dapat menyebabkan keadaan stres oksidatif yang menimbulkan senyawa oksigen reaktif (ROS).

Glutamat merupakan neurotransmitter asam amino utama yang berada dalam otak manusia dan berperan penting dalam komunikasi sinaptik, jika jumlahnya berlebihan maka glutamat tersebut akan di alirkan kembali ke dalam sel glia sekitar neuron dan akan menyebabkan sel tersebut mati. Glutamat akan

membuka saluran kalsium neuron sehingga kalsium dapat masuk ke dalam sel. Efek neurotoksik dari glutamat berhubungan dengan *overactivation* reseptor asam amino yang menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler yang memicu *cascade* kegiatan enzimatik sehingga dapat mengakibatkan kematian sel (Onalapo, 2016).

Glutamat membuka Ca^{2+} channel neuron sehingga Ca^{2+} dapat masuk ke dalam sel dan memicu pelepasan bahan-bahan kimia serta menstimulasi neuron. Hasil reaksi kimia di neuron adalah asam arachidonat. Asam arachidonat kemudian beraksi dengan enzim sehingga melepaskan radikal bebas seperti *hydroxyl radical*. Radikal bebas ini dapat membunuh sel-sel otak. Bila kadar glutamat berlebih, Ca^{2+} channel akan tetap terbuka sehingga reaksi kimia yang terjadi juga akan semakin meningkat sehingga mengawali pengrusakan sel tersebut dan sel-sel yang berdekatan yang memiliki reseptor glutamat (Gill S. S., dan Pulido, M.O., 2001).

Pada otak terdapat asam amino glutamat yang berfungsi sebagai neurotransmitter, namun apabila kadar glutamat terlalu tinggi maka akan terakumulasi di sinaps (celah antar sel syaraf) dan akan bersifat eksitotoksik bagi otak. Untuk itu diperlukan *glutamat transporter protein* untuk menyerap cairan ekstraseluler dan untuk sintesis GABA oleh kerja enzim *Glutamic Acid Decarboxylase (GAD)*. GABA merupakan neurotransmitter dan memiliki fungsi lain sebagai reseptor *glutamatgik*, sehingga dapat menjadi target dari sifat toksik glutamat (Ardyanto, 2004)

Reseptor glutamat banyak terdapat di daerah hipotalamus ventromedial dan medial yang berperan penting dalam meregulasi neuroendokrin dan otonom. Pada saat konsentrasi tinggi Glu berperan sebagai neurotoxin yang mampu merangsang kerusakan saraf. Oleh karena itu Glu bisa mempunyai peran ganda yang bertolak belakang yaitu bisa mengalami transisi dari neurotransmitter ke

neurotoxin. Glutamat yang berasal dari dalam tubuh (endogen) memiliki sifat excitatory dan berpotensi excitotoxic (Gill dan Pulido, 2001).

Farombi dan Onyema (2006), pemberian MSG 4 mg/g BB secara interperitoneal dapat menyebabkan keadaan stres oksidatif yang menimbulkan senyawa oksigen reaktif (ROS).

2.3. Apoptosis

2.3.1. Pengertian Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terjadi pada sel tunggal secara terencana yang ditandai dengan gambaran morfologi dan biokimiawi yang diakibatkan oleh stimuli fisiologis maupun patologis tanpa menimbulkan reaksi radang (Allison dan Saraf, 1992).

2.3.2. Penyebab Apoptosis

Apoptosis biasanya terjadi baik yang terjadi biasanya baik dalam perkembangannya hingga masa dewasa, dan berfungsi untuk sel yang berpotensi merugikan, tidak diinginkan, tua, atau dihilangkan. Apoptosis dapat menjadi patologis ketika sel-sel yang sakit menjadi rusak, tidak bisa diperbaiki dan dihilangkan (Kumar, Abbas, Aster, 2015).

Proses kematian sel terprogram, atau apoptosis, ditandai dengan karakteristik morfologi yang berbeda dan mekanisme biokimia yang tergantung energi. Apoptosis merupakan komponen penting dari berbagai proses termasuk pergantian sel normal, pengembangan yang tepat dan fungsi sistem kekebalan tubuh, atrofi tergantung pada hormon, perkembangan embrio dan kematian sel kimia yang diinduksi. Terjadinya apoptosis dipengaruhi oleh kondisi manusia termasuk penyakit neuro degeneratif, kerusakan iskemik, gangguan autoimun dan berbagai jenis kanker (Elmore, 2007).

Apoptosis terjadi secara normal selama pengembangan dan penuaan dan sebagai mekanisme homeostatis untuk mempertahankan populasi sel di jaringan. Apoptosis juga terjadi sebagai mekanisme pertahanan diri seperti dalam reaksi imun atau ketika sel-sel yang rusak oleh penyakit atau agen berbahaya (Norbury dan Hickson, 2001). Meskipun terdapat rangsangan dan kondisi, baik fisiologis dan patologis, yang dapat memicu apoptosis, tidak semua sel akan mati dalam merespon rangsangan yang sama. Radiasi atau obat yang digunakan dapat menyebabkan kematian apoptosis melalui jalur p53-dependent. Beberapa hormon, seperti kortikosteroid, dapat menyebabkan kematian apoptosis dalam beberapa sel (misalnya, thymocytes) meskipun sel lain tidak terpengaruh (Elmore, 2007).

2.3.3. Fungsi Apoptosis

Fungsi apoptosis menurut Rahim, 2015 adalah :

1. Terminasi sel, keputusan untuk melakukan apoptosis dapat berasal dari sel itu sendiri, dari jaringan sekitarnya ataupun dari sel yang berasal dari imun sistem. Fungsi apoptosis adalah untuk mengangkat sel yang rusak, mencegah sel menjadi lemah atau kurangnya nutrisi dan mencegah penyebaran virus.
2. Mempertahankan terjadinya homeostasis, artinya jumlah sel dalam suatu organ atau jaringan harus berada dalam keadaan yang relatif konstan, hal ini dapat dicapai jika kecepatan mitosis seimbang dengan kematian sel.
3. Perkembangan embrional, pada masa embrio perkembangan suatu jaringan atau organ didahului oleh pembelahan dan diferensiasi sel dan kemudian dikoreksi melalui apoptosis.
4. Interaksi limfosit, perkembangan limfosit B dan limfosit T pada tubuh manusia merupakan suatu yang kompleks, yang akan membuang sel-sel

yang berpotensi menjadi rusak. Sitotoksik T dapat menginduksi apoptosis secara langsung pada sel melalui terbukanya suatu celah pada target membran dan pelepasan zat-zat kimia untuk mengawali proses apoptosis.

5. Involusi hormonal pada usia dewasa

Ada 2 jenis mekanisme terjadinya kematian sel yaitu nekrosis dan apoptosis. Nekrosis adalah suatu perubahan morfologi sel yang diikuti dengan kematian sel pada jaringan yang hidup, disebabkan oleh aksi degradasi enzim pada kerusakan sel yang letal. Nekrosis secara histologi biasanya terjadi pada apabila terdapat kerusakan yang disebabkan oleh karena lingkungan eksternal yang ireversibel. Ciri-ciri sel yang mengalami kerusakan ini ditandai dengan rusaknya sel dan organelnya seperti mitokondria membengkak (oleh karena rusaknya kemampuan membran plasma untuk mengatur pengeluaran ion dan cairan), cairan sel keluar, dan inflamasi disekitar jaringan (Kauffmann, *et al.* 2001; Kumar, *et al.*, 2005).

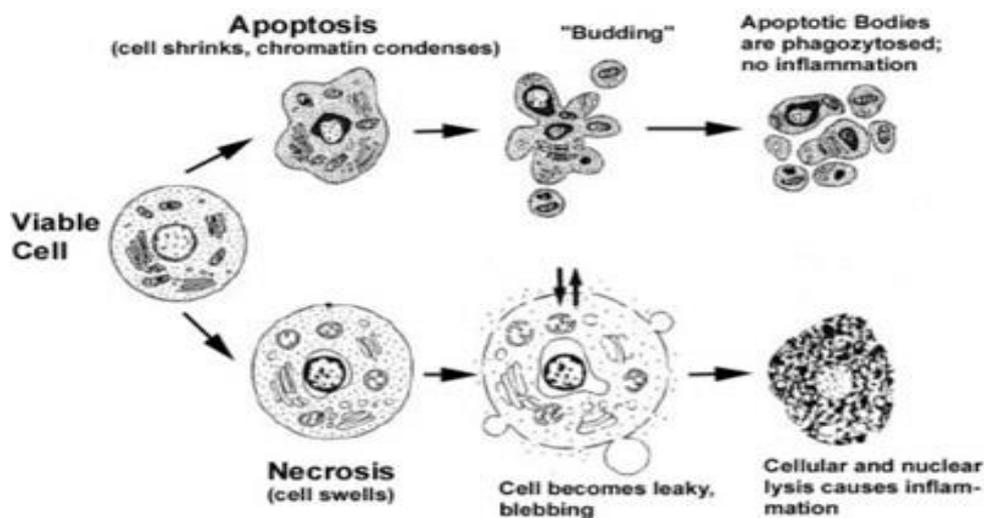
Apoptosis merupakan jalur kematian sel yang dipacu oleh mekanisme pengaturan intraseluler dimana sel yang akan mati mengaktifkan enzim yang akan mendegradasi DNA nukleus sel dan protein sitoplasma. Proses apoptosis berlangsung didalam proses nekrotik yang mencakup penurunan ketersediaan caspases dan ATP intraseluler.

Suatu sel dikatakan rusak atau mati yang disebabkan oleh nekrosis atau apoptosis biasanya tergantung pada sifat sinyal kematian sel, jenis jaringan, tahap perkembangan jaringan dan lingkungan fisiologis (Elmore, 2007).

Tabel 2.3. Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

| Apoptosis | Necrosis |
|---|--|
| Penyebab : Fisiologi dan patologi Sel-sel tunggal atau kelompok kecil sel Sel menyusut atau terdapat lilitan Pyknosis dan karyorrhexis Membran sel utuh Sitoplasma dipertahankan dalam tubuh Tidak terjadi peradangan Pada saat sel mati, sel diserap atau difagosit oleh sel tetangga | Patologi Sel-sel yang saling berdekatan Sel membengkak Karyolisis, pyknosis dan karyorrhexis Membran sel terganggu Sitoplasma dikeluarkan Terdapat peradangan Pada saat sel mati, sel diserap oleh netrofil, PMN dan makrofag |

Keterangan : Perbedaan morfologi apoptosis dan nekrosis (Elmore, 2007)



Gambar 2.2. Perbedaan Apoptosis dan Nekrosis

Keterangan : Apoptosis meliputi penyusutan seluler, kondensasi kromatin dan marginasi di periferal dengan pembentukan badan apoptosis terikat membran yang mengandung organel, sitosol dan fragmen inti dan bersifat fagositosis tanpa memicu proses inflamasi. Sel nekrotik membengkak, menjadi bocor dan akhirnya terganggu dan melepaskan isinya ke jaringan di sekitarnya yang mengakibatkan peradangan., Sumber : Gewies, 2003

2.3.4. Mekanisme Terjadinya Apoptosis

Mekanisme terjadinya apoptosis sangat kompleks. Terdiri dari 3 tahapan yaitu :

1. Adanya signal kematian (penginduksi apoptosis)

Signal apoptosis bisa terjadi secara intrinsik (internal) diinisiasi melalui pelepasan faktor signal dari mitokondria dalam sel. Sedangkan jalur ekstrinsik (eksternal) diinisiasi melalui stimulasi dari reseptor kematian (*death receptor*).

Kedua signal penginduksi tersebut lalu bertemu didalam sel, kemudian berubah menjadi famili protein pengeksekusi utama yang dikenal caspase, yang merupakan mediator sebenarnya kematian sel (Taylor, 2008).

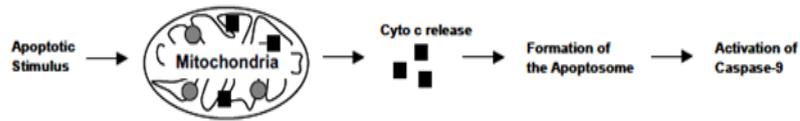
a. Jalur Intrinsik (*Mitochondria Pathway*)

Gangguan yang terjadi pada internal sel akan menyebabkan BAX melakukan penetrasi dalam membran mitokondria yang menyebabkan keluarnya sitokrom c. Sitokrom c dan Apaf-1 akan mengikat molekul caspase-9 dan membentuk kompleks yang disebut apoptosom. Kompleks tersebut akan menginisiasi urutan aktivasi caspase sampai pada fagositosis sel tersebut. Selain terjadi pelepasan sitokrom c, ada mekanisme alternatif yang melibatkan pelepasan protein mitokondrial lain yaitu *apoptosis-inducing factor* (AIF). AIF terbukti memiliki aktivitas proteolitik yang bisa dihambat oleh inhibitor caspase spektrum luas, tetapi tidak bisa dihambat oleh inhibitor spesifik untuk caspase-1 dan caspase- 7 (Susin *et al.*, 1996).

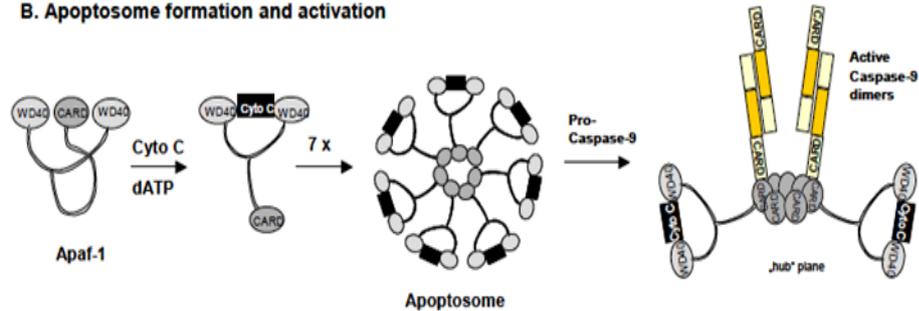
Mitokondria mengandung protein seperti sitokrom c yang penting bagi kehidupan, tetapi bila beberapa protein yang serupa terlepas ke dalam sitoplasma (merupakan indikasi bahwa sel tersebut tidak sehat), akan menginisiasi program “bunuh diri” dari apoptosis. Pelepasan protein mitokondria ini dikontrol secara seimbang melalui anggota keluarga protein Bcl antara pro dan antiapoptosis. Salah satu yang utama adalah Bcl-2, Bcl-x dan Mcl-1. Protein ini terdapat pada sitoplasma dan membran mitokondria, dimana protein ini mengontrol permeabilitas mitokondria dan mencegah kebocoran protein mitokondria yang nantinya memiliki kemampuan untuk mencetuskan kematian (Daniel dan krosmeier, 2004; Cory dan Adam 2002)

Inti dari jalur intrinsik adalah keseimbangan antara molekul proapoptosis dan molekul protektif yang mengatur permeabilitas mitokondria (Fausto, 2006; Kumar, Abbas, Aster., 2015).

A. Mitochondrial pathway of caspase activation



B. Apoptosome formation and activation



Gambar 2.3. Jalur Intrinsik (Mitochondria Pathway)

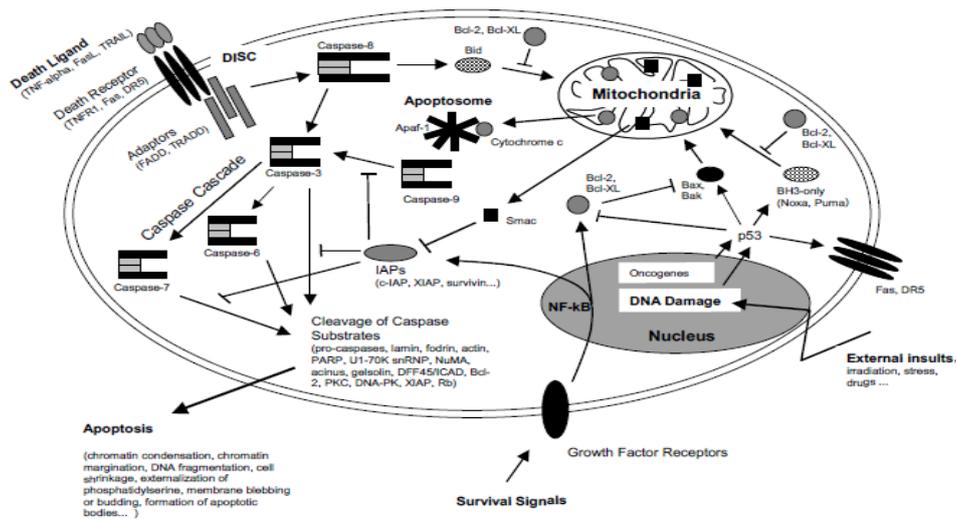
Keterangan : A. Mitochondria memediasi aktivasi caspase pada apoptosis. Rangsangan apoptotik memicu timbulnya faktor apoptogenik dari ruang antar sel mitokondria ke sitosol, seperti sitokrom c yang menginduksi pembentukan apoptosom dan aktivasi procaspase-9. B. Dengan tindakan sitokrom c (Cyto C) dan dATP, protein Apaf-1 mengadopsi konformasi yang memungkinkan terbentuknya struktur heptamerik, seperti roda, apoptosom. Molekul pro caspase-9 dapat berikatan dengan daerah "hub" dalam apoptosom dan diaktifkan oleh diformat. Aktif caspase-9 dimer selanjutnya memediasi aktivasi caspases efektorA. Rangsangan apoptotik memicu timbulnya faktor apoptogenik dari ruang antar sel mitokondria ke sitosol, seperti sitokrom c yang menginduksi pembentukan apoptosom dan aktivasi procaspase-9. B. Dengan tindakan sitokrom c (Cyto C) dan dATP, protein Apaf-1 mengadopsi konformasi yang memungkinkan terbentuknya struktur heptamerik, seperti roda, apoptosom. Molekul pro caspase-9 dapat berikatan dengan daerah "hub" dalam apoptosom dan diaktifkan oleh diformat. Aktif caspase-9 dimer selanjutnya memediasi aktivasi caspases efektor (Gewies 2003).

b. Jalur Ekstrinsik

Inisiasi apoptois melalui jalur ekstrinsik melibatkan ikatan antara protein sinyal kematian ekstraseluler seperti TNF- α , Fas-Ligand (Fas-L), *TNF-related apoptosis including ligand* (TRAIL) dan Apo-3 ligand (Apo-3L) dengan reseptor permukaan sel sasaran. Sampai saat ini telah dikenal untaian cDNA yang berasal dari 8 macam *death receptor*. Diantara ke 8 macam reseptor permukaan tersebut CD95 merupakan reseptor yang paling banyak diketahui. Reseptor-reseptor permukaan sel sasaran tersebut diantaranya adalah TNF- α *receptor* 1 (TNF-R1),

TNF- α receptor 2 (TNF-R2), Fas, death receptor 3 (DR-3). Setelah berikatan dengan ligand yang sama, death receptor membentuk kompleks homotrimerik yang menyebabkan protein adaptor intraseluler tertarik ke membran sel seperti TNF-R1 dan DR-3 yang disebut *TNFR-associated death domain protein* (TRADD). Sedangkan Fas dan DR-4 berinteraksi dengan *Fas-associated death domain protein* (FADD). FADD dan TRADD tidak berinteraksi dengan DR-5 sehingga diduga ada protein lain yang terlibat. Sinyal yang diaktivasi oleh TNF-R1 atau DR-3 terpecah pada tingkat TRADD. Translokasi inti faktor transkripsi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan aktivasi c-Jun N-terminal Kinase (JNK) dimulai. Sinyal TNF- α akan berikatan dengan sinyal jalur Fas menyebabkan interaksi antara TRADD dengan FADD (Chen dan Goeddel, 2002). Ikatan-ikatan tersebut mengirimkan sinyal ke sitoplasma untuk mengaktivasi caspase-8 selanjutnya terjadi kaskade caspase untuk apoptosis (Hadi, 2011).

Fas dan reseptor TNF adalah protein membran integral dengan domain reseptornya yang terdapat pada permukaan sel. Pengikatan aktivator kematian komplementer (FaSL dan TNF) membentuk kompleks yang dikenal dengan *Death-inducing signaling complex* (DISC). Molekul adaptor kemudian mengaktivasi beberapa molekul prokaspase-8 untuk DISC. Konsentrasi dari beberapa molekul prokaspase-8 kemudian memproses kaspase eksekutor lalu membelah substrat yang dapat mengakibatkan kematian sel (Fausto, 2006; Robins and Cotran, 2009).



Gambar 2.4. Skema Representasi dari Beberapa Jalur Sinyal Utama Apoptosis

Keterangan: Skema representasi beberapa jalur sinyal apoptosis mayor. Apoptosis dapat diinduksi untuk merespon berbagai sinyal dari dalam dan luar sel, Sinyal yang berasal dari reseptor kematian pada awalnya mengaktifkan Death Inducing Signaling Complex (DISC) yang memediasi pengaktifan caspase-8 inisiator. Caspase aktif-8 memulai kaskade kaspase dengan memproses caspases efektor-3, -6, dan -7 yang kemudian membelah sejumlah substrat protein. Sinyal mitokondrial apoptotik mencakup pelepasan sitokrom c dari ruang intermembran mitokondria ke sitosol dimana ia berkontribusi terhadapformasi apoptosom yang terdiri dari sitokrom c, Apaf-1 dan dATP. Apoptosome mengaktifkan caspase-9 yang merupakan inisiator caspase lain dan dengan demikian mampu menengahi caspase cascade dengan mengaktifkan caspase-3. Sinyal apoptosis yang berasal dari dalam sel sering berawal di dalam nukleus, akibat kerusakan DNA yang disebabkan oleh iradiasi, obat-obatan atau jenis tekanan lainnya. Kerusakan DNA dalam banyak kasus akhirnya menghasilkan aktivasi faktor transkripsi p53 yang mendorong ekspresi anggota Bcl-2 proapoptotik dan menekan antipoptotik Bcl-2 dan Bcl-XL. Organel lain selain mitokondria dan nukleus, seperti ER dan lisosom juga telah terlibat dalam jalur sinyal apoptosis, dan harus diingat bahwa kira-kira ratusan protein adalah bagian dari jaringan pengatur yang sangat halus yang terdiri dari faktor pro-andantiapoptosis (Gewies 2003)

2. Tahap pelaksanaan apoptosis (Fase degradasi atau eksekusi)

Sel yang sudah mengalami apoptosis, maka secara mikroskopis akan mengalami perubahan: sel akan mengerut dan lebih besar, sitoplasma menjadi lebih padat, kromatin menjadi kondensasi dan fragmentasi yang padat pada membran inti (pyknotik), kromatin berkelompok dibagian perifer, DNA yang ada didalamnya pecah menjadi fragmen-fragmen, membran sel memperlihatkan

tonjolan – tonjolan yang ireguler (*membrane blebbing*), sel yang terpecah menjadi beberapa fragmen (*apoptotic bodies*) (Gewies, 2003)

3. Tahap Fagositosis

Apoptotic bodies ini akan difagosit oleh sel yang berada disekitarnya. Adanya sel – sel fagosit ini dapat menjamin tidak menimbulkan respon inflamasi setelah terjadinya apoptosis. Sel yang mati pada tahap akhir apoptosis memiliki sifat fagositik molekul pada permukaannya. Molekul ini sebagai penanda sel untuk fagositosis sel yang mempunyai reseptor yang sesuai. Dua jenis fagosit dalam proses fagositosis yaitu fagosit profesional dalam bentuk makrofag dan fagosit semi profesional dalam bentuk sel tetangga dari sel yang mengalami fagositosis (Gewies 2003; Lumongga, 2008).

2.3.5. Pemeriksaan Apoptosis

Pemeriksaan apoptosis dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain (Elmore, 2007):

1. Perubahan cytomorphological/ *Cytomorphological Alterations*

Metode ini mampu mendeteksi sel apoptosis tunggal, namun diperlukan pemeriksaan lain. Efek biologis yang timbul pada mikoptosis terjadi cepat dan fragmennya cepat terpapar fagositosis, Apoptosis yang terjadi pada jaringan secara histologis dapat terlihat. Metode ini juga mendeteksi kejadian apoptosis selanjutnya, sehingga fase awal apoptosis pada sel tidak akan terdeteksi. Metodologi ini tergantung pada kondensasi nuklir dan sitoplasma yang terjadi selama apoptosis. Keuntungan dari metode ini dapat diketahui rincian jaringan dan sel yang dipelihara serta dapat dilakukan survei di daerah jaringan besar. Namun, kerugian dari metode ini adalah tidak dapat terdeteksi kejadian apoptosis pada lebih kecil dan sel sehat serta dapat terjadi hilang antigenitas selama pemrosesan sehingga tes imunohistologis atau enzim tidak dapat dilakukan pada

jaringan yang sama. Karakteristik ini metode ini, yaitu: (1) inti padat elektron (marginalisasi pada fase awal); (2) fragmentasi nuklir; (3) membran sel utuh yang berada di dalam matriks integrase; (4) organel sitoplasma yang tidak terorganisir; (5) vakuola besar yang jelas; Dan (6) blebs pada permukaan sel.

2. Fragmentasi DNA/*DNA Fragmentation*

Teknik *laddering* DNA digunakan untuk memvisualisasikan produk pembelahan endonuklease apoptosis. Pengujian ini melibatkan ekstraksi DNA dari homogenat sel lisis yang diikuti elektroforesis gel agarosa. Hal ini menghasilkan "*DNA Ladder*" yang khas dengan masing-masing band di tangga yang dipisahkan menurut ukuran sekitar 180 bp. Metodologi ini mudah dilakukan, memiliki sensitivitas 1×10^6 sel (yaitu, tingkat deteksi hanya 100.000 sel), dan berguna untuk jaringan dan kultur sel dengan jumlah sel apoptotik dalam jumlah tinggi per volume jaringan atau volume. Metode ini tidak disarankan pada kasus dengan jumlah sel apoptotik yang rendah. Ada kelemahan dari metode adalah fragmentasi DNA terjadi pada fase apoptosis selanjutnya, tidak adanya *DNA Ladder* tidak menghilangkan potensi sel yang mengalami apoptosis dini. Selain itu, fragmentasi DNA dapat terjadi selama masa persiapan sehingga sulit menghasilkan tangga nukleosom dan sel nekrotik juga dapat menghasilkan fragmen DNA.

Metode TUNEL (*Terminal dUTP Nick End-Labeling*) digunakan untuk menguji produk pembelahan endonuklease dengan pelabelan akhir enzim pelepasan rantai DNA. Terminal transferase digunakan untuk menambahkan label UTP ke 3-end fragmen DNA. DUTP kemudian dapat diberi label dengan berbagai pemeriksaan untuk melakukan deteksi dengan menggunakan mikroskop cahaya, mikroskop fluoresensi atau *flowcytometry*. Kelemahan dari metode ini adalah biaya dan parameter yang tidak diketahui dari berapa banyak rangkaian DNA yang diperlukan untuk deteksi. Metode ini juga dikenai false positive dari sel nekrotik dan sel dalam proses perbaikan DNA dan transkripsi gen.

3. Deteksi Caspase, Pembelahan Substrat, Regulator dan Inhibitor/ *Detection of Caspases, Cleaved Substrates, Regulators, and Inhibitors*

Terdapat lebih dari 13 caspase yang diketahui (procaspases atau active cysteine caspases) yang dapat dideteksi dengan menggunakan berbagai jenis uji aktivitas caspase. Pemeriksaan *immuno histochemistry* dapat mendeteksi substrat seperti PARP seperti PARP dan modifikasi sel yang dikenal seperti histon yang terfosforilasi. *Fluorescent inhibitor caspase* terkonjugasi juga dapat digunakan untuk label *caspase* aktif di dalam sel. Aktivasi *Caspase* dapat dideteksi dengan berbagai cara termasuk *western blot*, *immuno precipitation* dan *immuno histochemistry*.

Kedua antibodi poliklonal dan monoklonal yang tersedia untuk kedua procaspases dan caspases aktif. Salah satu metode deteksi caspase membutuhkan lisis sel untuk melepaskan enzim ke dalam larutan, lapisan *microwell* dengan anti caspase diikuti oleh deteksi dengan substrat neon berlabel. Deteksi aktivitas caspase dengan metode ini biasanya membutuhkan sel 1×10^5 . Teknik ini memungkinkan pemilihan untuk inisiator individu atau caspases eksekusi, kuantifikasi sel apoptosis dengan cepat dan konsisten. Kerugian utama dari metode ini adalah integritas sampel dirusak sehingga dapat menghilangkan kemungkinan pelokalisasi kejadian apoptosis di dalam jaringan atau menentukan jenis sel yang mengalami apoptosis. Kelemahan lain dari teknik ini adalah aktivasi caspase tidak selalu mengindikasikan terjadinya apoptosis. Selain itu, terdapat tumpang tindih dalam preferensi substrat anggota keluarga caspase, mempengaruhi spesifisitas pengujian.

4. Perubahan Membran/*Membrane alteration*

Eksternalisasi residu phosphatidylserine pada membran plasma luar sel apoptosis memungkinkan deteksi melalui Annexin V di jaringan, embrio atau sel kultur. Setelah sel apoptosis terikat dengan FITC-label Annexin V, dan dapat

divisualisasikan dengan mikroskop fluorescent. Keuntungan adalah sensitivitas yang tinggi (dapat mendeteksi sel apoptosis tunggal) dan kemampuan untuk mengkonfirmasi aktivitas caspases inisiator. Kelemahannya adalah bahwa membran sel yang mengalami nekrotik juga diberi tanda.

5. *Detection of apoptosis in whole mounts*

Apoptosis dapat dilihat di seluruh permukaan embrio atau pewarna dengan menggunakan *acridine orange* (AO), *Nile blue sulfate* (NBS), and *neutral red* (NR). Ketiga jenis pewarna ini bersifat acidophilic (dapat tumbuh dengan baik di media asam), mereka terkonsentrasi di daerah lysosomal dan dengan aktifitas fagositosis tinggi. Hasil dari metode ini perlu disesuaikan dengan metode pemeriksaan apoptosis yang lain, karena pewarna ini tidak bias membedakan lisosom yang mengalami apoptosis atau sisa dari nekrosis seperti microorganism. Meskipun metode ini cepat dan murah metode ini memiliki kelemahan yaitu AO beracun, mutagenik dan Meski semua pewarna ini cepat dan murah, mereka memiliki kelemahan tertentu. AO adalah Beracun dan mutagenik dan hasilnya tidak memuaskan (dibawah standar), sedangkan NBS dan NR tidak dapat menembus jaringan kental dan dapat hilang pada saat persiapan untuk melakukan pembelahan.

Lyso Tracker Red adalah pewarna lain yang dapat digunakan dan bekerja dengan cara yang sama; namun pewarna ini dapat digunakan dengan mikroskop confocal laser untuk memberikan pencitraan 3 dimensi sel apoptosis. Pewarna ini lebih stabil selama pemrosesan, menembus jaringan kental dan tahan terhadap proses pendinginan. Pewarna ini dapat digunakan untuk kultur sel serta seluruh jenis embrio, jaringan, atau organ.

6. *Pengujian Mitokondria /Mitochondrial Assays*

Uji mitokondria dan pelepasan sitokrom c memungkinkan pendeteksian perubahan pada fase awal jalur intrinsik. *Laser scanning confocal microscopy*

(LSCM) menciptakan irisan optik tipis submikron melalui sel hidup yang dapat digunakan untuk memantau beberapa kejadian mitokondria dalam sel tunggal utuh dari waktu ke waktu.

Metode ini dapat memantau membran mitokondria bagian dalam, fluks Ca^{2+} , status redoks mitokondria, dan reaktif oksigen spesies. Kerugian utama dari metode adalah parameter mitokondria yang dilihat dengan metode ini juga dapat terjadi selama nekrosis.

2.3.6. Hubungan antara ROS dan Apoptosis

Apoptosis diinduksi oleh berbagai rangsangan baik itu rangsangan fisiologis maupun rangsangan patologis. Mitokondria dan Caspase 3 memiliki peran dalam proses apoptosis. ROS merupakan penyebab apoptosis jalur intrinsik melalui interaksi dengan protein di luar membran mitokondria (Ryter, 2007).

Menurut Argawal 2012, apoptosis terjadi melalui peningkatan ROS. Mekanisme terjadinya apoptosis, yaitu :

a. Membuka Saluran Ion

ROS merangsang Ca^{2+} dari retikulum endoplasma yang mengakibatkan membran mitokondria menjadi tidak stabil sehingga produksi ATP menjadi terhenti.

b. *Lipid Peroksidase*

Peningkatan *peroksidase lipid* pada daerah dengan ikatan asam lemak *polyunsaturated*. Ikatan rantai ini kemudian bereaksi dengan O_2 yang menghasilkan peroxy yang radikal dan menyebabkan kerusakan sel.

c. Modifikasi Protein

Modifikasi protein melalui proses oksidasi asam Amino. Asam amino mengalami kerusakan akibat oksidasi yang menyebabkan pembentukan gugus karbonil.

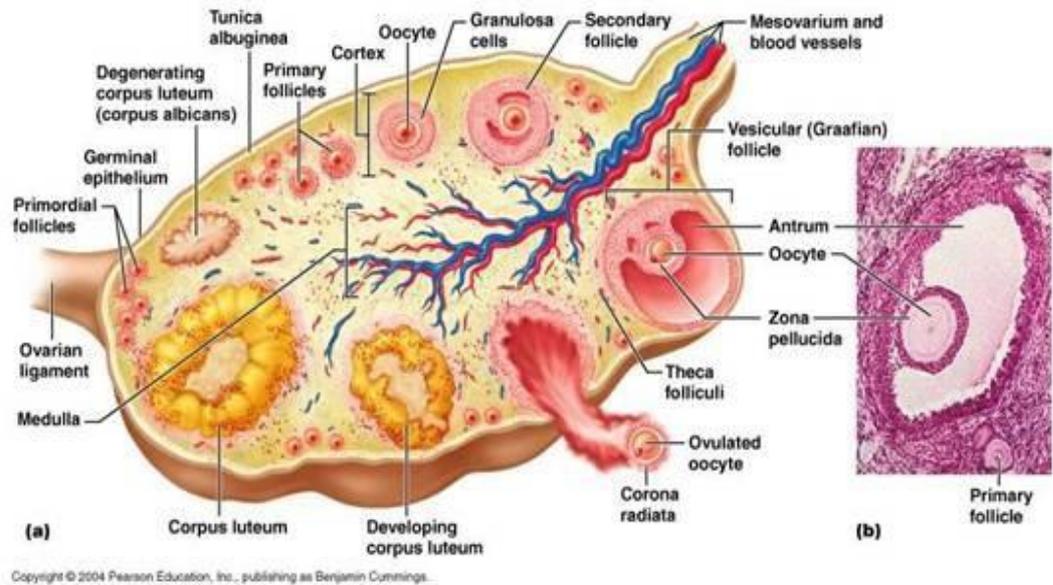
d. Oksidasi DNA Mitokondria

DNA mitokondria sangat rentan terhadap serangan dari ROS karena terdapatnya O_2 di *elektron transport chain* (ETC), kurangnya perlindungan histon, dan tidak adanya mekanisme perbaikan DNA.

2.4. Ovarium

2.4.1. Anatomi Ovarium

Ovarium adalah organ berbentuk buah almond. Ukuran ovarium setiap wanita berbeda-beda. Selama masa reproduksi ovarium berukuran panjang 2.5-5 cm, lebar 1.5-3 cm, dan tebal 0.6-1.5 cm. Setelah menopause ukuran ovarium menjadi sangat mengecil. Ovarium terletak di bagian atas rongga panggul dan bertumpu di dalam lekukan dangkal pada dinding lateral panggul di antara pembuluh darah iliaka eksterna dan hipogastrika-fosa ovarika dari Waldeyer. Permukaan lateral ovarium menempel pada fosa ovarika sedangkan permukaan medialnya menghadap uterus. Tepi ovarium melekat pada mesovarium, sedangkan tepi yang bebas cembung menghadap ke bawah dan ke dalam ke arah rectum. Ovarium menempel ke ligamen latum melalui mesovarium. Ligamen utero-ovarika membentang dari bagian lateral dan posterior uterus, tepat di bawah insersi (Pritchard, MacDonald, Gand., 1992). Sel-sel ovarium terbagi menjadi sel-sel interstisial, teka dan luteal. Elemen kelenjar interstisial dibentuk oleh sel-sel teka interna dari folikel yang mengalami degenerasi atau folikel yang mengalami atresi; sel-sel kelenjar teka dibentuk dari teka interna dari folikel yang masak; sel-sel luteal yang sesungguhnya berasal dari sel-sel granulosa folikel yang mengalami ovulasi dan dari stroma yang belum mengalami diferensiasi (Pritchard, MacDonald, Gand., 1992; Mossman, 1994).



Gambar 2.5.Ovarium

Keterangan : Ovarium dewasa dapat dibagi menjadi 3 bagian, yaitu korteks, medulla dan hilus. Korteks terdiri dari epitelium permukaan, tunica albuginea, folikel-folikel ovarium (primordial, primer, sekunder, folikel de Graaf, dan korpus luteum). Medula terdiri dari pembuluh darah besar dan saraf. Hilus terdiri dari arteri spiralis besar dan hilus atau sel Leydig besar (Cumingham, 2004; William, dan Ericson, 2012)

2.4.2. Siklus Ovarium

Dalam ovarium banyak terdapat sel-sel telur muda yang dikelilingi oleh sel gepeng (folikel primordial), sebelum pubertas, ovarium masih dalam keadaan istirahat, sedangkan pada waktu pubertas ovarium berada di bawah pengaruh hormon dari lobus hipofisis anterior yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH). Folikel primordial mulai tumbuh walaupun hanya satu saja yang matang, kemudian pecah, dan yang lainnya mati (Syaifuddin, 2009).

Ovarium secara normal memproduksi satu folikel dominan yang akan mengalami ovulasi pada setiap siklus menstruasi. Folikel dominan ini akan memproduksi estradiol saat fase folikuler dari siklus ovarium. Setelah ovulasi, folikel akan berubah menjadi korpus luteum yang akan mensekresi progesteron dalam jumlah besar saat fase luteal dari siklus menstruasi. Estradiol dan

progesteron bekerja pada uterus untuk mempersiapkan kondisi uterus sebagai tempat implantasi embrio (William, and Erickson, 2012).

Setelah pubertas dimulai, ovarium secara terus menerus mengalami dua fase yaitu (Sheerwood, 2011):

1. Fase Folikular ditandai oleh pembentukan folikel matang

Selama siklus, sebagian dari folikel-folikel primer mulai berkembang, namun hanya folikel yang melakukannya selama fase folikular saat lingkungan hormonal tepat mendorong pematangannya yang berlanjut melewati tahap-tahap awal perkembangan, folikel yang lain akan mengalami atresia karena tidak mendapat bantuan hormon.

Tahapan dalam fase folikular, yaitu :

- a. Proliferasi sel granulosa dan pembentukan zona pelusida

Satu lapisan sel granulosa pada folikel primer berproliferasi untuk membentuk beberapa lapisan yang mengelilingi oosit. Sel-sel granulosa mengeluarkan gel (Zona pellusida) yang membungkus oosit dan memisahkannya dari sel granulosa sekitar. Glukosa, asam amino dan molekul penting di sampaikan ke oosit dari sel granulosa melalui saluran-saluran penghubung. Molekul-molekul pembawa sinyal juga dapat melewati saluran ini sehingga perubahan-perubahan yang terjadi di oosit dan sel-sel sekitar dapat dikoordinasikan pada saat keduanya mengalami pematangan dan bersiap untuk ovulasi.

- b. Proliferasi sel teka: sekresi estrogen

Pada saat yang sama saat oosit sedang membesar dan sel-sel granulosa berproliferasi, sel-sel jaringan ikat ovarium yang berhubungan dengan sel granulosa berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk suatu lapisan luar sel teka. Sel teka dan sel granulosa berfungsi untuk mengeluarkan estrogen yaitu estradiol, estron, dan estriol.

c. Pembentukan antrum

Lingkungan hormon pada fase folikular mendorong terjadinya pembesaran dan pengembangan kemampuan sekresi sel-sel folikel, mengubah folikel primer menjadi folikel sekunder, atau folikel antrum yang mampu mengeluarkan estrogen. Pada tahap ini terbentuklah suatu rongga yang berisi cairan, antrum di bagian tengah sel-sel granulosa. Cairan folikel sebagian berasal dari transudasi plasma dan sebagian dari sekresi sel folikel. Pada saat folikel mulai mengeluarkan estrogen sebagian hormon disekresikan ke dalam darah untuk disebarkan ke seuruh tubuh.

Oosit telah mencapai ukuran penuh saat antrum mulai terbentuk. Perubahan ke folikel antrum ini memicu suatu periode pertumbuhan folikel yang cepat. Selama periode ini garis tengah folikel meningkat, kurang dari 1 mm menjadi 12 sampai 16 mm sesaat sebelum ovulasi.

d. Pembentukan folikel matang

Salah satu folikel tumbuh lebih cepat daripada yang lain dan berkembang menjadi folikel matang (proovulasi, tersier dan Graaf) dalam waktu 14 hari setelah dimulainya pembentukan folikel. Pada saat folikel matang, antrum menempati sebagian besar ruang. Oosit yang dikelilingi oleh zona pellusida dan satu lapisan sel granulosa, tergeser asimetris ke salah satu sisi folikel.

e. Ovulasi

Folikel yang telah matang membesar dan menonjol dari permukaan ovarium, menciptakan suatu daerah tipis yang kemudian pecah untuk membebaskan oosit saat ovulasi. Pecahnya folikel ditandai dengan pelepasan enzim-enzim dari sel folikel untuk mencerna jaringan ikat ke dinding folikel. Oosit menyelesaikan pembelahan meiotic pertamanya sebelum ovulasi. Ovum (oosit sekunder) dikelilingi oleh zona pellusida dan sel-sel granulosa (korona radiata). Ovum yang keluar ke dalam rongga abdomen akibat bocornya cairan antrum

ditarik kembali kedalam tuba uterin, tempat fertilasi terjadi. Folikel-folikel yang gagal mencapai kematangan akan berovulasi kembali lalu mengalami degenerasi dan tidak pernah menjadi aktif kembali. Pecahnya folikel saat ovulasi menandakan berakhirnya fase folikular dan dimulainya fase luteal.

2. Fase Luteal ditandai oleh keberadaan korpus luteum

Folikel yang pecah yang tertinggal di ovarium setelah mengeluarkan ovum akan mengalami perubahan. Sel-sel granulosa dan sel teka yang tertinggal di sisa folikel mula-mula kolaps ke dalam ruang antrum yang kosong dan terisi sebagian oleh bekuan darah.

a. Pembentukan Korpus Luteum, Sekresi Estrogen dan Progesteron

Sel-sel folikel akan membentuk korpus luteum (luteinisasi). Sel-sel folikel yang berubah menjadi sel luteal akan membesar dan berubah menjadi jaringan yang sangat aktif dan menghasilkan hormon steroid. Korpus luteum mengalami vaskularisasi seiring dengan masuknya pembuluh-pembuluh darah dari daerah teka ke daerah granulosa yang mengalami luteinisasi. Fungsi korpus luteum adalah mengeluarkan banyak progesterone dan sedikit estrogen ke dalam darah. Sekresi estrogen pada fase folikular diikuti oleh sekresi progesteron pada fase luteal untuk mempersiapkan uterus untuk implantasi ovum yang dibuahi. Korpus luteum akan berfungsi penuh dalam empat hari setelah ovulasi, dan terus membesar selama empat sampai lima hari berikutnya.

b. Degenerasi korpus luteum

Jika ovum yang dibebaskan tidak dibuahi dan tidak terjadi implantasi maka korpus luteum akan berdegenerasi dalam waktu sekitar 14 hari setelah pembentukannya. Sel-sel luteal berdegenerasi dan difagositosis, vaskularisasi berkuang, dan jaringan ikat segera masuk untuk membentuk massa jaringan fibrosa (Korpus albicans).

c. Korpus luteum kehamilan

Jika pembuahan dan implantasi terjadi maka korpus luteum akan terus tumbuh serta meningkatkan produksi progesteron dan estrogennya. Korpus luteum kehamilan ini akan menetap sampai kehamilan berakhir. Struktur ini menghasilkan hormon-hormon yang esensial untuk mempertahankan kehamilan sampai plasenta yang terbentuk mengambil alih.

2.4.3. Sel Granulosa Folikel Ovarium

Sel granulosa adalah sel yang terdapat pada membran basalis yang memisahkan sel inti dari sel stroma dan sekitarnya. Sel granulosa adalah sel yang melapisi folikel ovarium vesikuler yang menjadi sel luteal setelah ovulasi. Korpus luteum terdiri dari sel-sel granulosa dan sel-sel teka folikuli. Sel granulosa mulai terbentuk saat oosit primer mulai tumbuh ketika sel-sel sekitar berubah dari bentuk kuboid menjadi gepeng dan berproliferasi. Terjadinya perubahan pada bentuk sel granulosa merupakan pertanda awal pertumbuhan folikel (Hefner and Schust, 2008). Pada Folikel primer oosit di kelilingi oleh beberapa lapisan sel granulosa yang mengeluarkan cairan berupa gel yang disebut sebagai zona pelusida. Zona pelusida berguna sebagai penyekat yang memisahkan oosit dan sel granulosa sekitarnya (Sherwood, 2011).

Pertumbuhan sel granulosa menurut perkembangan folikel, yaitu (Sherwood, 2011):

2.4.3.1. Fase Folikel Primordial

Sel granulosa pada fase ini sering disebut sebagai sel pregranulosa yang tersusun atas satu lapisan sel berbentuk datar dan gelombang.

2.4.3.2. Fase Folikel Primer atau Preantral

Fase ini adalah fase pertama pertumbuhan folikel primordial berkembang menjadi folikel primer. Pada fase ini oosit dikelilingi oleh selapis sel granulosa berbentuk kuboid.

2.4.3.3. Fase Folikel Sekunder

Pada fase ini struktur folikel mulai mengalami perubahan yaitu terjadi peningkatan jumlah sel granulosa dan bertambahnya sel teka. Pada tahap ini oosit primer yang awalnya dikelilingi oleh selapis sel granulosa yang bentuknya kuboid kemudian berkembang menjadi beberapa lapisan sel granulosa.

2.4.3.4. Fase Tersier Dini

Pada tahap ini merupakan fase pertama dari dua tahap antral. Sel-sel granulosa semakin bertambah dan mengeluarkan cairan ke pusat folikel; sehingga terbentuk seperti ruangan yang berisi cairan yang disebut antrum.

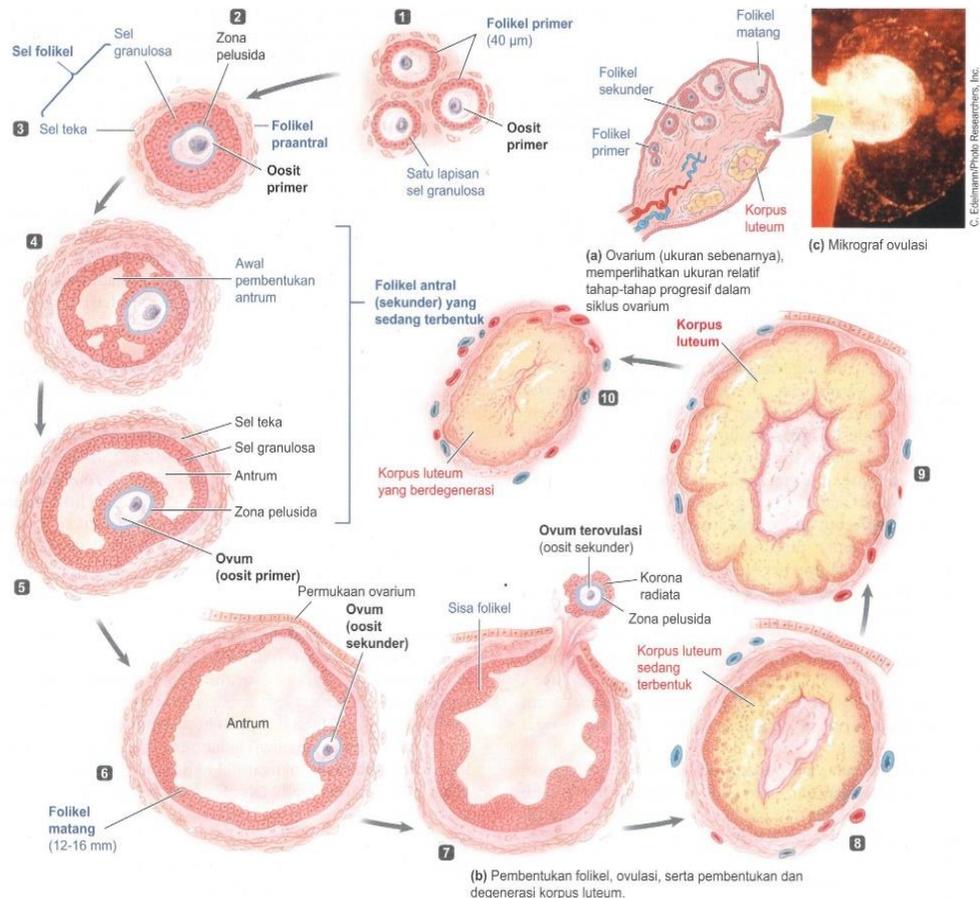
Pada folikel yang matang, antrum akan terlihat menempati hampir sebagian ruang. Oosit dikelilingi oleh zona pellusida dan satu lapisan sel granulosa. Tahap ini merupakan fase kedua dari tahap antral, yaitu antrum semakin membesar hampir mengelilingi oosit kecuali cumulus.

Pada tahap tersier dan folikel de graaf, sel granulosa terbagi menjadi 3 tipe yaitu:

- a. Sel granulosa mural : paling aktif secara metabolik serta mengandung sebagian besar reseptor LH dan enzim yang digunakan untuk sintesis steroid dan yang terjauh dari pusat folikel.
- b. Sel granulosa cumulus : wilayah dekat dengan oosit pada saat ovulasi,

c. Sel granulosa yang berhadapan dengan antrum yang tertinggal di dalam folikel menjadi sel-sel luteum besar korpus luteum.

810 BAB 20



- 1 Di dalam folikel primer, oosit primer dikelilingi oleh selaput sel granulosa.
- 2 Di bawah pengaruh parakrin lokal, sel granulosa berproliferasi dan membentuk zona pelusida di sekitar oosit.
- 3 Jaringan ikat ovarium sekitar berdiferensiasi menjadi sel teka, mengubah folikel primer menjadi folikel praantral.
- 4 Folikel yang mencapai tahap praantral direkrut untuk perkembangan lebih lanjut di bawah pengaruh FSH pada saat dimulainya fase folikular siklus ovarium. Folikel yang direkrut berkembang menjadi folikel sekunder,

- atau antral, ketika antrum yang kaya-estrogen mulai terbentuk.
- 5 Antrum terus meluas akibat pertumbuhan cepat folikel sekunder.
- 6 Setelah sekitar 2 minggu pertumbuhan cepat di bawah pengaruh FSH, folikel telah berkembang menjadi folikel matang, yang sangat banyak mengandung antrum; oosit, yang kini telah berkembang menjadi oosit sekunder, tergeser ke salah satu sisi.
- 7 Pada pertengahan siklus, sebagai respons terhadap lonjakan sekresi LH, folikel matang, dengan menonjol ke permukaan ovarium, pecah

- dan melepaskan oosit sehingga menyebabkan ovulasi dan terhentinya fase folikular.
- 8 Mengantar ke fase luteal, folikel yang ruptur berkembang menjadi korpus luteum di bawah pengaruh LH.
- 9 Korpus luteum terus bertumbuh dan menyekresikan progesteron dan estrogen yang mempersiapkan uterus untuk implantasi ovum yang telah dibuahi.
- 10 Setelah 14 hari, jika ovum yang telah dibuahi tidak berimplantasi di uterus, korpus luteum berdegenerasi, fase luteal berakhir, dan fase folikular baru dimulai di bawah pengaruh lingkungan hormonal yang berubah.

Gambar 2.6. Siklus Ovarium

Keterangan : Siklus ovarium : a. Ovarium yang menunjukkan tahap-tahap progresif dalam satu siklus ovarium. Semua tahap ini terjadi secara berurutan pada satu tempat, tetapi tahap-tahap tersebut ditampilkan dalam sebuah lengkung di peifer ovarium sehingga semua tahap dapat terlihat secara bersamaan., b. Pandangan yang diperbesar tentang tahap-tahap dalam satu siklus ovarium., c, Mikrograf oosit sekunder yang sedang dilepaska (Ovulasi), dikelilingi oleh halo berawan korona radiata (Sheerwood, 2011).

2.4.4. Pengaruh Pemberian MSG terhadap Organ Reproduksi Ovarium

Pada mencit betina dan mencit jantan yang diberi MSG, terjadi pengurangan berat kelenjar endoktrin, yaitu pada kelenjar hipofisis, tiroid, ovarium, atau testis. Setelah dewasa, pada mencit betina yang diberi MSG terjadi kelambatan kanalisasi vagina dan mempunyai siklus estrus yang lebih panjang daripada kontrol. Setelah dewasa, pada mencin jantan yang diberi MSG didapatkan tanda-tanda fertilitas menurun, misalnya berkurangnya berat testis, hipofisis, dan testis tidak turun (Nameroff, 1978).

Penelitian yang dilakukan oleh Sutarno mengatakan bahwa pemberian MSG per oral dengan dosis 0.77, 98, 119 dan 140 mg/200g BB selama 30 hari menunjukkan bahwa pada fase estrus terjadinya pemendekkan pada fase diestrus dan pada pase proestrus dan estrus memanjang. Pemberian MSG juga menyebabkan terjadinya degenerasi sel pada sel granulosa, lapisan tehca dan degenerasi dari ovum. Pemberian MSG juga dapat mempengaruhi ovarium secara keseluruhan dan saling berhubungan sehingga menyebabkan penurunan jumlah folikel sekunder lalu menurunkan jumlah folikel tersier kemudian akan mempengaruhi penurunan jumlah korpus luteum dan peningkatan jumlah folikel atresia (Septadina, 2014)

2.4.5. Pengaruh ROS pada Ovarium

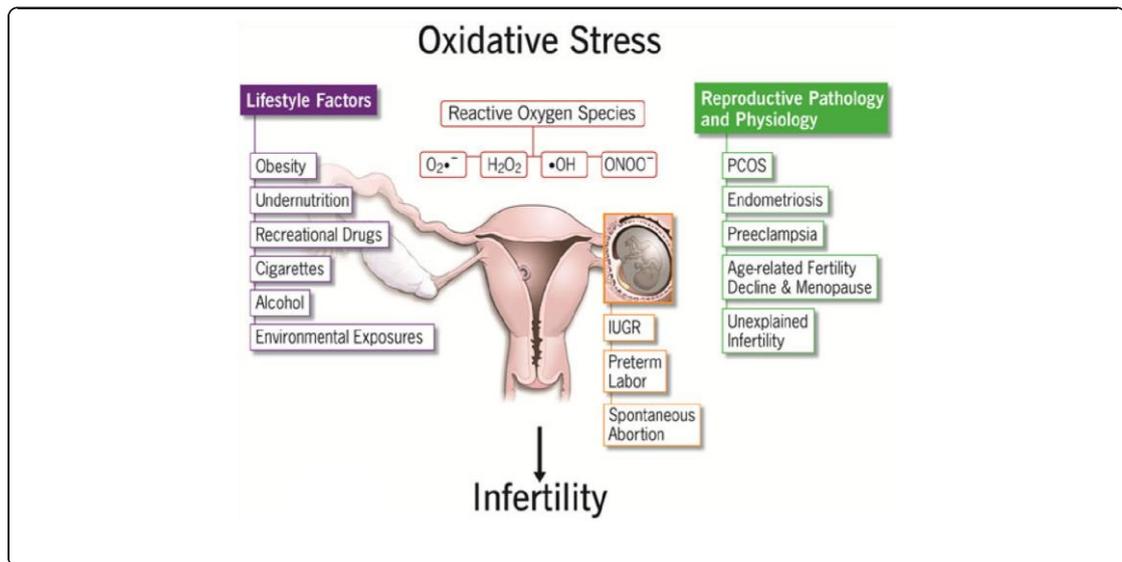
Setiap bulan oosit tumbuh dan berkembang di dalam ovarium, tetapi yang berhasil mencapai tahap meiosis I hanya satu oosit saja yaitu oosit yang dominan. Proses ini dapat terjadi karena adanya peningkatan ROS dan dihambat oleh antioksidan. Sebaliknya pada perkembangan meiosis II didukung oleh antioksidan. Proses ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kompleks antara ROS dan antioksidan didalam ovarium. Peningkatan produksi steroid dalam folikel yang berkembang dapat menyebabkan peningkatan P_{450} , yang

menghasilkan pembentukan ROS. ROS yang dihasilkan oleh folikel pada saat pra ovulasi dianggap sebagai faktor pemicu penting terjadinya ovulasi (Agarwal, *et al.* 2012).

Kekurangan oksigen dapat merangsang terjadinya angiogenesis folikuler, yang mempunyai peranan penting untuk pertumbuhan dan perkembangan yang memadai dari folikel ovarium. ROS folikuler dapat menyebabkan terjadinya apoptosis, sedangkan GSH dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) berperan dalam pertumbuhan folikel. Peningkatan estrogen dapat menyebabkan respon FSH mendukung generasi katalase dalam folikel dominan, sehingga dapat menghindari terjadinya apoptosis (Agarwal, *et al.*2012).

Ovulasi adalah suatu proses yang sangat penting untuk dimulainya reproduksi. Ovulasi dimulai dengan terjadinya lonjakan LH. LH mempunyai peranan penting dalam perubahan fisiologis yang mengakibatkan terjadinya pelepasan ovum yang matang. Setelah lonjakan LH yang meningkat, LH juga berperan sebagai prekursor dalam menghasilkan ROS, sebaliknya penurunan kadar prekursor dapat mengganggu ovulasi (Agarwal, *et al.*2012).

Dalam ovarium, ROS juga diproduksi oleh korpus luteum setelah ovulasi; menghasilkan progesteron, yang sangat diperlukan untuk keberhasilan proses kehamilan serta merupakan faktor kunci untuk reproduksi. Ketika kehamilan tidak terjadi, korpus luteum mengalami regresi. Sebaliknya, bila terjadi kehamilan korpus luteum akan tetap ada (Agarwal, *et al.*2012).



Gambar 2.7. Pengaruh Stres Oksidatif terhadap Organ Reproduksi

Keterangan : Stres oksidatif pada reproduksi wanita dapat menyebabkan penyakit PCOS (Poly Cystic Ovarian Syndrome), endometriosis, menopause dini dan infertilitas yang tidak jelas penyebabnya, komplikasi pada kehamilan seperti abortus spontan, abortus habitualis, preeklamsia, IUGR (Argawal, 2012).

2.4.6. Apoptosis pada Ovarium

Sel folikel yang mengalami atresia biasanya yang diamati adalah kerusakan yang terjadi pada granulosa dan oosit. Jika banyak folikel yang mengalami kerusakan maka tidak dapat diproduksi lagi, karena jumlah folikel primordial pada ovarium memiliki jumlah yang terbatas. Apoptosis pada sel granulosa mempunyai peran penting dalam proses terjadinya atresia folikel. Terjadinya atresia folikel merupakan cara alami tubuh untuk mengeliminasi folikel yang tidak normal. Mekanisme terjadinya apoptosis pada sel granulosa dipengaruhi oleh molekul untuk mempertahankan kehidupan sel granulosa dan dapat menyebabkan terjadinya apoptosis. *Caspase* merupakan molekul efektor utama yang menginduksi apoptosis dalam ovarium. *Caspase* diinduksi melalui mekanisme apoptosis intrinsik dan ekstrinsik (Dumitrescu *et al.*, 2015; Matsudaminehata, *et.al.*, 2006; Elmore, 2009).

2.4.7. Siklus Reproduksi *Rattus norvegicus*

Fase reproduksi *Rattus norvegicus* :

1. Fase proestrus

Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh FSH sehingga folikel tumbuh dengan cepat. Proestrus berlangsung selama 2-3 hari. Pada fase kandungan air pada uterus meningkat dan mengandung banyak pembuluh darah dan kelenjar-kelenjar endometrial mengalami hipertrofi.

Fase proestrus dimulai dengan regresi korpus luteum dan berhentinya progesteron dan dimulainya fase estrus. Pada fase ini terjadi pertumbuhan folikel yang sangat cepat. Akhir periode ditandai dengan adanya efek estrogen pada sistem saluran dan gejala perilaku perkembangan estrus dapat diamati. ditandai dengan pertumbuhan folikel dan produksi estrogen. Peningkatan jumlah estrogen menyebabkan pemasokan darah ke sistem reproduksi dan sekresi kelenjar dirangsang dengan hadirnya viscid mucus yang dapat diamati pada vulva (Westwood, 2008).

2. Fase estrus

Estrus adalah masa keinginan kawin yang ditandai dengan keadaan tikus tidak tenang, keluar lendir dari dalam vulva, pada fase ini pertumbuhan folikel meningkat dengan cepat, uterus mengalami vaskularisasi dengan maksimal, ovulasi terjadi dengan cepat, dan sel-sel epitelnya mengalami akhir perkembangan/terjadi dengan cepat.

Pada fase estrus, estrogen meningkatkan sensitivitas sel-sel penghasil gonadotropin pada hipofisa sehingga menghasilkan LH yang dapat menyebabkan ovulasi ketika kadar LH mencapai puncak. Pada saat estrus konsentrasi estrogen meningkat sesuai dengan pertumbuhan folikel de Graaf, dan selanjutnya di bawah pengaruh serta peran LH yang disekresikan dari hipofisis anterior terjadilah ovulasi

dan pembentukan korpus luteum. Ovulasi terjadi pada akhir estrus dalam waktu yang sangat singkat. Setelah ovulasi terjadi, pada ovarium akan mengalami fase luteal, fase luteal adalah fase pembentukan korpus luteum yang dapat menghasilkan progesteron, sedangkan pada vagina terjadi fase metestrus dan diestrus. Pada waktu korpus luteum telah mencapai ukuran maksimal dan fungsional akan terjadi peningkatan konsentrasi progesteron (Turner dan Bagnara 1988).

Fase estrus merupakan periode waktu ketika betina reseptif terhadap jantan dan akan melakukan perkawinan. Ovulasi berhubungan dengan fase estrus yaitu setelah selesai fase *estrus*. Untuk mengetahui hasil perkawinan tersebut dengan cara melakukan usapan vagina, yaitu memasukkan sedikit larutan garam fisiologis ke dalam vagina tikus betina, dihapus, kemudian apusan diletakkan pada *slide* dan diperiksa di bawah mikroskop yang ditandai adanya spermatozoa dalam usapan vagina tersebut. Proses estrus sangat erat kaitannya dengan mekanisme sistem hormonal. Pada fase ini estrogen bertindak terhadap sistem saraf pusat. Setelah 14-18 jam, fase estrus mulai berhenti, dimana betina tidak akan mengalami ovulasi hingga setelah fase estrus (Marcondes, 2002).

3. Fase metaestrus

Metaestrus ditandai dengan terhentinya birahi, ovulasi terjadi dengan pecahnya folikel, rongga folikel secara berangsur-angsur mengecil, dan pengeluaran lendir terhenti. Selain itu terjadi penurunan pada ukuran dan vaskularitas.

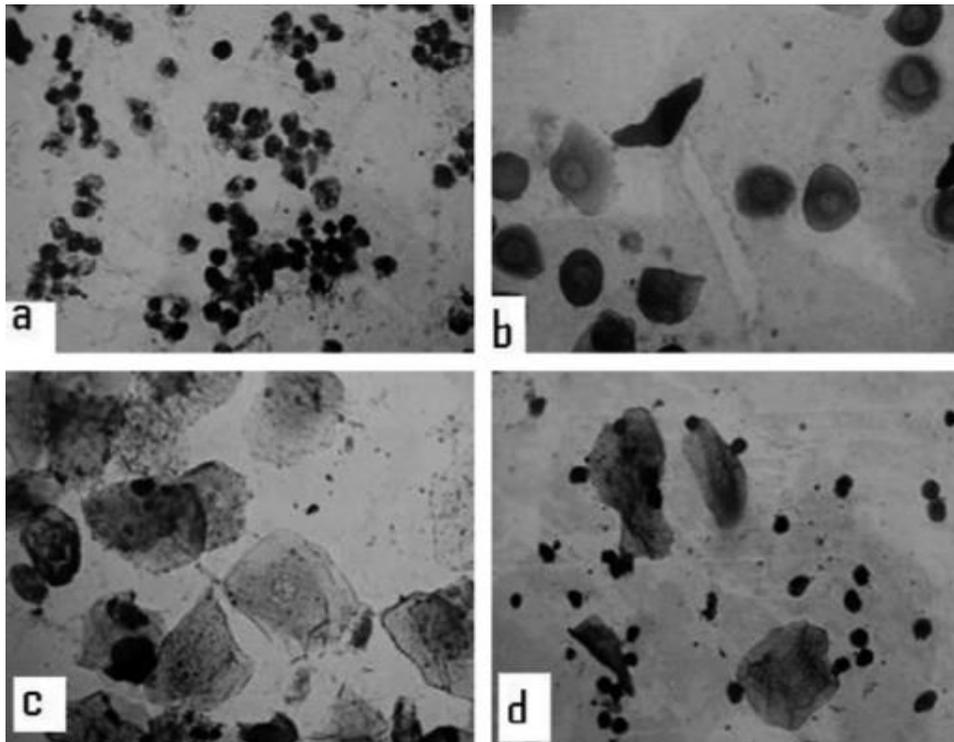
Fase metaestrus merupakan fase terbentuknya korpus luteum sehingga ovulasi terjadi selama fase ini. Selain itu, pada fase ini juga terjadi peristiwa yang dikenal dengan *metestrus bleeding* (Marcondes *et al.*, 2002).

4. Fase diestrus

Diestrus adalah periode terakhir dari estrus, pada fase ini korpus luteum berkembang dengan sempurna dan efek yang dihasilkan dari progesteron (hormon yang dihasilkan dari korpus luteum) tampak dengan jelas pada dinding uterus serta folikel-folikel kecil dengan korpora lutea pada vagina lebih besar dari ovulasi sebelumnya.

Fase diestrus dimulai ketika konsentrasi progesteron darah meningkat dapat dideteksi dan diakhiri dengan regresi korpus luteum. Fase ini disebut juga fase persiapan uterus untuk kehamilan. Fase ini merupakan fase terpanjang dalam siklus estrus. Terjadinya kehamilan atau tidak, korpus luteum akan berkembang dengan sendirinya menjadi organ fungsional yang menghasilkan sejumlah progesteron. Jika telur yang dibuahi mencapai uterus, maka korpus luteum akan dijaga dari kehamilan. Jika telur yang tidak dibuahi sampai ke uterus, maka korpus luteum akan berfungsi hanya beberapa hari, setelah itu korpus luteum akan meluruh dan akan masuk ke siklus estrus yang baru (Marcondes, 2002).

Pada fase estrus, terlihat pengaruh estrogen dan dikarakteristikan oleh sel kornifikasi yang nyata (jelas) dan hilangnya leukosit. Pada akhir fase estrus, lapisan kornifikasi tampak terkelupas dan invasi leukosit terjadi. Selama diestrus, leukosit tampak berlimpah. Fase proestrus, tanpa leukosit dan dikarakteristikan oleh sel epitel yang dinukleasi. Fase estrus terjadi dengan pengaruh hormon gonadotropin dan sekresi estrogen mempunyai pengaruh yang besar. Fase metestrus, selama fase ini dimana sinyal stimulasi estrogen turun. Uterus dipengaruhi oleh progesteron dan menjadi sikretori. Tipe fase ini adalah jelas dan mungkin berakhir 1-5 hari (Hill, 2006).



Gambar 2.8. Siklus Estrus Tikus

Keterangan : Smear vagina tikus menunjukkan fase yang berbeda dari siklus estrus: (a) diestrus, (b) proestrus, (c) estrus, dan (d) metestrus (Shrestha, et al. 2011).

2.5. Superoksida Dismutase (SOD)

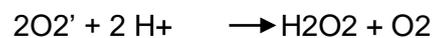
2.5.1. Pengertian SOD

Superoksida dismutase adalah enzim yang mengkatalisasi dismutase ion superoksida radikal ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen O_2 . SOD memiliki peran penting pada sistem pertahanan antioksidan. (Mates et al, 1999). Superoksida Dismutase ditemukan pada organisme yang menggunakan oksigen untuk proses metabolismenya, tetapi tidak ditemukan pada organisme anaerob obligat. SOD termasuk golongan enzim yang sangat stabil karena tiap sub unit tergabung oleh ikatan non kovalen dan terangkai oleh rantasi disulfida (Fridovich, 1986).

SOD adalah enzim intraseluler. SOD terdapat dalam tiga bentuk: (1) Cu-Zn SOD yang terdiri dari dua sub unit dan terdapat di dalam sitoplasma (2) Mn-

SOD di dalam mitokondria dan (3) Cu-SOD yang terdapat di ekstraseluler. SOD bereaksi dengan radikal bebas sebagai pereduksi superoksid untuk membentuk H_2O_2 . Enzim katalase dan glutathione peroksidase mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O . Masing-masing enzim tersebut bekerja dengan sistem umpan balik. Peningkatan superoksid akan menghambat *glutathione peroksidase* dan katalase. Peningkatan H_2O_2 akan menurunkan aktifitas CuZn-SOD. Sementara katalase dan glutathione peroksidase dengan mereduksi H_2O_2 akan menghemat SOD. SOD dengan mereduksi superoksid akan menghemat katalase dan glutathione peroksidase. Melalui sistem umpan balik ini tercapailah keadaan SOD, katalase, *glutathione peroksidase*, superoksid dan H_2O_2 dalam keadaan seimbang (Winarsi, 2007).

Penimbunan superoksid (O_2^-) dicegah oleh enzim superoksida Dismutase dengan mengkatalis reaksi superoksid :



2.5.2. Jenis SOD

Pada tubuh manusia ditemukan tiga bentuk jenis SOD yaitu (Mates, et. Al., 1999):

1. SOD yang terdapat didalam sitoplasma (*Cytocolic*) terdiri dari dua sub unit yaitu Cu-SOD, Zn-SOD.

Cu-SOD, Zn-SOD berperan sebagai faktor pertahanan utama yang memiliki tugas melindungi sel dari radikal superoksida. Cu-SOD, Zn-SOD merupakan homodimer dan terdapat di sitoplasma eukariot, peroksisom, kloroplas, dan periplasma prokariot. Enzim Cu-SOD, Zn-SOD termasuk enzim yang sangat stabil karena setiap sub unit bergabung oleh ikatan non kovalen dan terangkai oleh rantai disulfide.

2. SOD yang terdapat didalam mitokondrial yaitu Mn-SOD,
Enzim Mn-SOD mempunyai peran di dalam pertahanan sel dalam menghadapi stress etanol.
3. SOD yang terdapat didalam *ekstraseluler* yaitu Cu-SOD

2.5.3. Peran SOD terhadap Radikal Bebas

Enzim SOD juga berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutasi dari anion superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Enzim SOD melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadinya proses peradangan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Aktivitas enzim SOD memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa oksigen reaktif yang bisa menyebabkan stres oksidatif (Sayuti, 2015).

SOD bereaksi dengan radikal bebas sebagai pereduksi superoksid untuk membentuk H_2O_2 . Enzim Cu-SOD, Zn-SOD mempunyai peranan penting dalam pertahanan antioksidan (Mates et. Al., 1999).

Dalam melawan radikal bebas enzim SOD di bantu oleh dua enzim yaitu enzim katalase dan glutathione peroksidase. Enzim SOD secara spontan merubah radikal O_2^- menjadi H_2O_2 dan oksigen. Enzim katalase dan glutathione peroksidase mereduksi H_2O_2 menjadi H_2O , Kemudian masing-masing enzim bekerja dengan sistem umpan balik. Peningkatan superoksid akan menghambat glutathione peroksidase dan katalase. Peningkatan H_2O_2 akan menurunkan aktifitas CU-Zn-SOD. Sementara itu katalase dan glutathione peroksidase akan mereduksi H_2O_2 sehingga akan menghemat SOD. SOD dengan mereduksi superoksid sehingga akan menghemat katalase dan *glutathione peroksidase*. Melalui sistem umpan balik ini akan tercapai keadaan SOD, katalase, *glutathione peroksidase* superoksida dan H_2O_2 dalam keadaan seimbang. Penimbunan supeokside (O_2^-)

akan dicegah oleh enzim superoksida dismutase dengan mengkatalis reaksi superoksid (Ramadhan, 2015) :



Aktivitas SOD tergantung adanya Cu, Zn, dan Mn, sedangkan katalase bergantung pada Fe (besi), dan glutathion peroksidase bergantung pada selenium. Katalase dan GPx menunjukkan potensinya dengan mengubah H₂O₂ menjadi H₂O, sedangkan SOD mengkatalis reaksi dismutasi radikal anion superoksida. Katalase adalah enzim yang mengkatalisasi reaksi dekomposisi hidrogen peroksida menjadi oksigen dan H₂O.

Peranan katalase sebagai “peroksidase khusus”, adalah mengoksidasi satu molekul hidrogen peroksida menjadi oksigen dan secara simultan mereduksi molekul hidrogen peroksida kedua menjadi air (Sayuti, 2015)

2.5.4. Hubungan Paparan Monosodium Glutamat dengan SOD

Pemberian monosodium glutamat (MSG) pada mencit jantan selama enam hari berturut-turut pada dosis 4 dan 8 mg/gberat badan, secara signifikan dapat meningkatkan tingkat enzim pemicu radikal bebas yaitu xantin oksidase, tetapi aktivitas enzim penangkal radikal bebas seperti katalase dan *superoxide dismutase* mengalami penurunan secara signifikan pada jaringan hati (Singh, 2002).

2.5.5. Peran SOD terhadap Organ Reproduksi

Enzim SOD terdapat pada semua mikroorganisme aerob dan sebagian besar terletak pada tingkat intraseluler. Organisme yang selalu membutuhkan oksigen dalam hidupnya yaitu mikroorganisme aerob, tetapi dalam setiap aktifitasnya dapat menimbulkan senyawa reaktif atau radikal bebas oksigen (Winarsi, 2007).

Enzim SOD berperan dalam pengaturan perkembangan folikel, ovulasi dan fungsi luteal. Aktifitas SOD pada cairan di fase folikuler ovarium sebelum terjadinya ovulasi nilainya lebih tinggi dibandingkan dengan cairan serum. Meningkatnya aktivitas SOD memberikan perlindungan pada oosit terhadap kerusakan oksidatif. Pembentukan MnSOD menekan apoptosis pada korpus luteum kelinci secara *in vitro*. MnSOD juga bertanggung jawab dalam menghambat apoptosis (Fujii J, Luchi Y., Okada D., 2005).

Penurunan progesteron yang cepat sangat dibutuhkan untuk perkembangan folikel pada siklus berikutnya. Cu, Zn m-SOD akan meningkat dalam korpus luteum selama fase luteal awal sampai menengah dan menurun selama fase regresi. Aktivitas ini sejalan dengan perubahan konsentrasi progesteron, berbeda dengan kadar peroksidalipid, yang meningkat selama fase regresi. Penurunan konsentrasi Cu, Zn-SOD dapat menjelaskan peningkatan konsentrasi ROS selama regresi (Agarwal, *et al.*2012).

Penjelasan lain untuk penurunan Cu, Zn-SOD adalah peningkatan prostaglandin (PG) F2-alpha atau makrofag, atau penurunan aliran darah ovarium. Prostaglandin F2-alpha merangsang produksi anion superoksida oleh sel luteal dan leukosit fagositik dalam korpus luteum. Penurunan aliran darah dalam ovarium dapat menyebabkan kerusakan jaringan oleh produksi ROS. Konsentrasi Mn-SOD dalam korpus luteum meningkat selama proses regresi untuk mengikat ROS yang dihasilkan didalam mitokondria oleh reaksi inflamasi dan sitokin. Gangguan yang terjadi dalam korpus luteum dapat menyebabkan penurunan Mn-SOD. Pada saat ini sel akan mati. Enzim Cu, Zn-SOD sangat berhubungan dengan produksi progesteron, sedangkan Mn-SOD melindungi sel luteal dari stres oksidatif (Agarwal, *et al.*2012)

2.6. Tanaman Teh Hijau (*Camellia Sinensis*)

2.6.1. Pengertian Teh Hijau

Teh adalah salah satu bahan minuman alami yang sangat populer di masyarakat. kandungan flavonoid dalam teh merupakan antioksidan yang bersifat anti-karsinogenik, kariostatik serta hipokolesterolemik (Lestari, 2007). Teh hijau (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu jenis tanaman herbal yang berasal dari Cina. Tanaman ini banyak dibudidayakan di Asia Tenggara sebagai bahan baku pembuatan obat tradisional (*herbal medicine*). Mengonsumsi teh hijau secara teratur dapat meningkatkan sistem pertahanan dan memperbaiki fungsi organ tubuh. Teh hijau mengandung polifenol dalam jumlah yang tinggi. penelitian melaporkan bahwa kandungan polifenol pada daun teh hijau lebih tinggi dibanding teh hitam. Persentase kandungan polifenol pada daun teh hijau sebanyak 30-40 %, sedangkan persentase kandungan polifenol pada daun teh hitam sebanyak 3-10 % (Zowail *et al.* 2009).

2.6.2. Morfologi Teh Hijau

Camellia sinensis, suatu tanaman yang berasal dari *famili tehaceae*, merupakan pohon berdaun hijau yang memiliki tinggi 10 - 15 meter di alam bebas dan tinggi 0,6 - 1,5 meter jika dibudidayakan sendiri. Daun dari tanaman ini berwarna hijau muda dengan panjang 5 - 30 cm dan lebar sekitar 4 cm. Tanaman ini memiliki bunga yang berwarna putih dengan diameter 2,5 - 4 cm dan biasanya berdiri sendiri atau saling berpasangan dua-dua (Mahmood *et.al.*, 2010). Buahnya berbentuk pipih, bulat, dan terdapat satu biji dalam masing-masing buah dengan ukuran sebesar kacang (Khan, 2014).

2.6.3. Macam-Macam Teh

Menurut Dewi, 2005 membagi teh berdasarkan penanganan pasca panen menjadi empat yaitu :

1. Teh hijau (*Green Tea*)

Teh hijau diperoleh tanpa proses fermentasi. Daun teh dipanaskan sehingga terjadi inaktivasi enzim. Pemanasan dilakukan dengan dua cara yaitu dengan udara kering dan pemanasan basah dengan uap panas (*steam*), pada pemanasan dengan suhu 38⁰ c selama 3 menit, aktivitas enzim polifenoloksidase tinggal 5,49%. Pemanggangan daun teh akan memberikan aroma dan rasa yang lebih kuat dibandingkan dengan pemberian uap panas.

2. Teh Hitam (*Black Tea*)

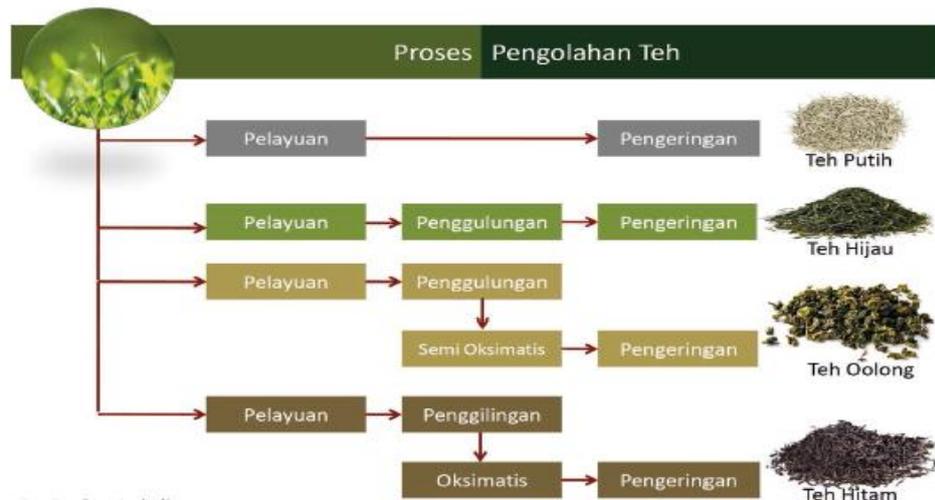
Teh hitam diperoleh melalui proses fermentasi. Proses fermentasi tidak menggunakan mikrobial sebagai sumber enzim, melainkan dilakukan oleh enzim polifenol oksidase yang terdapat di dalam daun teh sehingga menyebabkan katekin (flavanol) mengalami oksidasi dan akan menghasilkan teharubigin. Cara membuat teh hitam adalah daun segar dilayukan pada palung pelayu, kemudian digiling sehingga sel-sel daun rusak selanjutnya difermentasi pada suhu sekitar 22-28°C dengan kelembaban sekitar 90%. Lama fermentasi dapat mempengaruhi kualitas akhir, setelah proses fermentasi selesai dilakukan proses pengeringan hingga kadar air teh kering mencapai 4-6%.

3. Teh Oolong

Teh oolong di proses secara semi fermentasi dan di buat dengan bahan baku khusus, yaitu varietas tertentu yang memberikan aroma khusus. Cara membuat teh oolong adalah daun teh dilayukan terlebih dahulu, kemudian dipanaskan pada suhu 160-240⁰C selama 3-7 menit untuk inaktivasi enzim selanjutnya digulung dan dikeringkan.

4. Teh Putih (*White Tea*)

Merupakan teh jenis terbaik karena diambil hanya dari satu pucuk tiap satu pohon, yaitu pucuk tertinggi dan utama. Kandungan antioksidan paling tinggi. Proses menjadi teh putih dengan cara membiarkan daun teh hingga layu secara alami sehingga warnanya menjadi putih.



Gambar 2.9. Proses Pengolahan Berbagai Jenis Teh

Keterangan: Berbagai proses pengolahan : A. Teh Putih; B. Teh Hijau; C. Teh Oolong; D. Teh Hitam (Rohdiana, 2015)

2.6.4. Komposisi Teh Hijau

Di dalam daun teh terdapat berbagai macam bahan atau senyawa kimia yang dapat digolongkan ke dalam empat kelompok besar, yaitu substansi fenol, substansi bukan fenol, substansi penyebab aroma (senyawa aromatis), dan enzim (Alamsyah, 2006).

Komposisi senyawa-senyawa yang terdapat didalam teh hijau yaitu protein (15-20%); asam amino seperti teanine, asam aspartat, tirosin, triptofan, glisin, serin, valin, leusin, arginin (1-4%); karohidrat seperti selulosa, pectin, glukosa, fruktosa, sukrosa (5-7%); lemak dalam bentuk asam linoleat dan asam linolenat; sterol dalam bentuk stigmasterol; vitamin B,C,dan E; kafein dan teofilin; pigmen

seperti karotenoid dan klorofil; senyawa volatile seperti aldehida, alkohol, laktone, ester, dan hidrokarbon; mineral dan elemen-elemen lain seperti Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Se, Na, P, Co, Sr, Ni, K, F, dan Al (5%) (Cabrera et al., 2006).

Teh memiliki lebih dari 4000 campuran bioaktif dimana sepertiganya merupakan senyawa-senyawa polifenol. Polifenol merupakan cincin benzene yang terikat pada gugus-gugus hidroksil. Polifenol dapat berupa senyawa flavonoid ataupun non-flavonoid. Namun, polifenol yang ditemukan dalam teh hampir semuanya merupakan senyawa flavonoid (Sunpio, 2006). Senyawa flavonoid tersebut merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman yang berasal dari reaksi kondensasi *cinnamic acid* bersama tiga gugus malonyl-CoA. Banyak jenis-jenis flavonoid yang ada di dalam teh, tetapi yang memiliki nilai gizi biasanya dibagi menjadi enam kelompok besar (Mahmood et al., 2010).

Daun teh memiliki tiga komponen penting yang dapat mempengaruhi mutu teh sebagai minuman, yaitu kafein yang memberikan efek stimulan, tannin yang memberikan kekuatan rasa (ketir) dan senyawa aktif yang dipercaya bertanggung jawab dalam memberikan kontribusi positif bagi kesehatan manusia, yaitu polifenol (Idhayu, 2006).

Polifenol adalah antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibandingkan vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibandingkan vitamin E. Dalam teh hijau terkandung lebih dari 36 persen polifenol, jumlah dipengaruhi cuaca (iklim), varietas, jenis tanah dan tingkat kemasakan. Polifenol memiliki tujuh macam bentuk *catechin* yang berbeda, yaitu: *Epigallocatechin-gallate* (EGCg), *Epigallocatechin* (EGC), *Epicatechin-gallate* (ECg), *Epicatechin* (EC), *Gallocatechin* (GC), *Catechin* (C), dan *Catechin-gallate* (Cg) (Idhayu, 2006).

Tabel 2.4. Kandungan Komponen Bioaktif pada Berbagai Jenis Teh

| No | Komponen (% b/b) | Teh Putih | Teh Hijau | Teh Oolong | Teh Hitam |
|----|------------------|-----------|-----------|------------|-----------|
| 1 | Total polifenol | 21.54 | 19.18 | 17.6 | 16.5 |
| 2 | Total katekin | 13.22 | 12.95 | 10.3 | 4.2 |
| 3 | Kafein | 4.85 | 3.4 | 3.7 | 3.5 |
| 4 | Asam galat | Nd | 0.09 | Nd | 0.26 |
| 5 | theaflavin | Nd | Nd | Nd | 0.94 |

Keterangan : a. Teh putih; B. Teh Hijau; C. Teh Oolong; D. Teh Hitam (Rohdiana, 2015)

Tabel 2.5. Komposisi Teh Hijau

| No. | Komponen | % Berat kering |
|-----|-----------------------------------|----------------|
| 1. | Kafein | 7,43 |
| 2. | (-) Epicatechin | 1,98 |
| 3. | (-) Epicatechin gallat | 5,20 |
| 4. | (-) Epigallocatechin | 8,42 |
| 5. | (-) Epigallocatechin gallat | 20,29 |
| 6. | Flavonol | 2,23 |
| 7. | Tehanin | 4,70 |
| 8. | Asam glutamat | 0,50 |
| 9. | Asam aspartat | 0,50 |
| 10. | Arginin | 0,74 |
| 11. | Asam amino lain | 0,74 |
| 12. | Gula | 6,68 |
| 13. | Bahan yg dpt mengendapkan alkohol | 12,13 |
| 14. | Kalium (potassium) | 3,96 |

Keterangan: Berbagai jenis komponen yang terdapat dalam teh hijau (Tuminah, 2004)

Tabel 2.6. Zat Aktif dalam Teh Hijau

| No | Zat aktif | Kandungan |
|-----|----------------|-------------------|
| 1. | Polyphenols | 10.4 % |
| 2. | Fiber | 32.8 % |
| 3. | Caffeine | 2.4% |
| 4. | Tannin | 12.7 % |
| 5. | Teanin | 889mg/100 grams |
| 6. | S.O.D. | 1.4 * 10,000/gram |
| 7. | Fe (Iron) | 14.1mg/100g |
| 8. | Ca (Calcium) | 317mg/100g |
| 9. | Zn (Zinc) | 35.8ppm |
| 10. | Me (Manganese) | 643ppm |
| 11. | Carotene | 19.2mg/100g |
| 12. | Vitamin A | 10,7100IU/100g |
| 13. | Vitamin C | 353mg/100g |
| 14. | Vitamin E | 36.4mg/100g |
| 15. | a tocopherol | 31.3mg/100g |
| 16. | b tocopherol | 0.3mg/100g |
| 17. | c tocopherol | 4.7mg/100g |
| 18. | d tocopherol | 0.2mg/100g |
| 19. | Chlorophyll | 355mg/100g |

Keterangan : Berbagai jenis zat aktif yang terkandung didalam teh hijau (Lestari 2007).

Dari senyawa-senyawa polifenol tersebut, flavanol atau yang dikenal dengan *catechin*, merupakan senyawa yang meyyumbangkan berat 20-30% dari daun teh yang kering. Senyawa *catechin* tidak berwarna, larut dalam air, dan berfungsi untuk memberikan rasa pahit pada teh. Modifikasi pada *catechin* dapat mengubah warna, aroma, dan rasa pada teh. Sebagai contoh, pengurangan kadar *catechin* dalam teh dapat menambah kualitas aroma dari suatu teh (Mahmood et al., 2010).

EGCg merupakan bentuk *catechin* yang memiliki komposisi paling banyak terdapat pada daun teh hijau. Dalam polifenol, 10 sampai 50 persen dari seluruh kandungan *catechin* berasal dari EGCg. Bahkan kebanyakan manfaat positif dari teh dan juga aktivitas antioksidan terkuat berasal EGCg (Idhayu, 2006)..

Selain flavanol, ada juga senyawa yang disebut dengan flavonol. *Quercetin*, *myricetin*, dan *kaemferol* merupakan contoh flavonol utama yang menjadi ekstrak cair dari suatu teh. Flavonol biasanya ditemukan dalam bentuk *glycosidic* karena bentuk yang *non-glycosidic* tidak dapat larut dalam air. Selain itu, di dalam teh juga terdapat zat kafein (Mahmood et al., 2010).

2.6.5. Farmakodinamik dan Farmakokinetik Teh Hijau

Teh hijau yang dikonsumsi akan langsung diproses dalam pencernaan kemudian didistribusi ke seluruh tubuh melalui pembuluh darah. Farmakokinetik dari *catehcin* (EGCG, EGC, dan EC) berkisar 1,1,6 jam dan waktu paruh ketiganya $3,4 \pm 0.3$, 1.7 ± 0.4 dan 2.0 ± 0.4 jam (dalam plasma). EGCG dalam plasma sebagian besar dalam bentuk bebas, sedangkan EGC dan EC dalam bentuk terkonjugasi. Lebih dari 90% dari total EGC kemih dan EC, yang dieksresikan antara 0 dan 8 jam (Lee, et al., 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Yang, 2000 yaitu dari 1.5, 3.0 dan 4,5 g *catehcin* yang terdapat dalam ekstrak teh hijau tanpa kafein (dalam 500 mL air)

yang diberikan kepada relawan mengakibatkan konsentrasi plasma maksimal (Cmax) dari 326 ng, 550 ng dan 190 ng / L untuk EGCG, EGC dan EC. Nilai-nilai Cmax yang diamati pada saat 1,4 -2,4 jam setelah mengkonsumsi teh hijau. Waktu paruh eliminasi ($t_{1/2}$) EGCG (5.0 -5,5 h) muncul ke lebih tinggi dibandingkan EGC dan EC (2,5-3,4 h). EGC dan EC, tetapi tidak EGCG, yang diekskresikan dalam urin. Lebih dari 90% dari total EGC kemih dan EC (sebagian besar di terkonjugasi yang bentuk) yang diekskresikan dalam waktu 8 jam. *Catechin* yang terdeteksi dalam jumlah besar di mukosa usus pada pasien yang mengkonsumsi teh 12 jam sebelum operasi. Setelah meminum teh hijau, ditemukan EGC, EGCG dan EC memiliki tingkat *saliva* dua lipat lebih tinggi dibandingkan EGC, EGCG dan EC yang terdapat dalam plasma. Waktu paruh *catehchin yang terdapat di saliva* adalah 10-20 menit, jauh lebih pendek dibandingkan dengan waktu paruh *catehchin* yang terdapat di dalam plasma. EGCG dikonversi ke EGC di dalam rongga mulut, dan kegiatan catechin esterase saliva dilihat. Ada indikasi bahwa kedua katekin diserap melalui mukosa mulut.

2.6.6. Efek Samping Teh Hijau

Satu cangkir teh hijau dapat mengandung 50-400 mg polifenol. Konsumsi teh hijau sebanyak 20 cangkir per hari tidak menimbulkan efek samping yang nyata, tetapi pada dosis yang terlalu tinggi, kandungan kafein yang terdapat pada teh hijau dapat menyebabkan insomnia, takikardi, kecemasan, tremor dan diuresis. Pada orang yang mengkonsumsi aspirin atau obat anti koagulan lain harus berhati-hati terhadap terjadinya penghambatan agregasi platelet. Pada beberapa kasus, teh hijau dapat memperpanjang waktu perdarahan. Wanita hamil dan menyusui sebaiknya menghindari konsumsi suplemen katekin. Bayi tidak dianjurkan diberi teh hijau, karena ada penelitian yang mengatakan teh dapat

mempengaruhi metabolisme zat besi sehingga menyebabkan anemia mikrositik (Idhayu, 2006).

Penelitian yang dilakukan oleh Susanto, 2014 menunjukkan hasil pemeriksaan Immunohistokimia pada tikus putih betina yang yang diberi zat aktif teh hijau yang mengandung *Epigallocatechin galate (EGCG)* dapat mempengaruhi penurunan ikatan reseptor hormon estrogen pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina. Semakin tinggi dosis *Epigallocatechin galate (EGCG)* yang diberikan maka semakin rendah ekspresi reseptor estrogen pada tikus putih betina.

2.6.7. Metode Ekstrak Zat Aktif Bahan Alami

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang terdapat didalam bahan alami yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Senyawa aktif yang dikandung di dalam simplisia dapat mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus. Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar susah diserap oleh pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus (Ditjen, POM., 2000).

Metode ekstraksi itu sendiri dipilih berdasarkan beberapa faktor, seperti sifat dari bahan mentah tanaman, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi serta jenis zat aktif yang ingin diambil dari tanaman. Terdapat beberapa teknik ekstraksi senyawa organik, diantaranya adalah maserasi, digesti, infusdasi, dekoksi, perkolasi, soxhletasi, refluks dan distilasi uap atau penyulingan (Harborne, 1987; Atun, 2014).

Metode yang digunakan pada penelitian ini untuk mengekstrak teh hijau adalah dengan cara maserasi. Maserasi merupakan cara penyairan simplisia yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia kedalam cairan pelarut dengan pengadukan pada temperatur kamar. Pemilihan pelarut yang sesuai dapat meningkatkan efektivitas kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Darwis, 2000). Cairan pelarut yang digunakan adalah etanol. Etanol memiliki titik didih yang relatif lebih tinggi namun bersifat lebih aman dibanding dengan metanol. Pemilihan etanol dikarenakan senyawa aktif dari teh hijau lebih banyak terikat dibandingkan dengan metode lainnya.

2.6.8. Peran Teh Hijau Sebagai Antioksidan

Tumbuhan dan tanaman obat dianggap menjadi pilihan terapi yang potensial untuk pengobatan berbagai penyakit, termasuk penyakit neurodegeneratif (Khan et al., 2012). Manfaat teh hijau sebagai antioksidan serta antimutagenik melalui pengurangan pembentukan kanker dan kerusakan kromosom (Ogaly *et al.*, 2015).

Ekstrak teh hijau mengandung campuran dari beberapa senyawa yang mempunyai sifat antioksidan. Penambahan ekstrak teh hijau pada makanan yang mengandung lemak dapat menimbulkan interaksi. Studi kombinasi dari polifenol teh hijau dan α -tokoferol telah menunjukkan efek antioksidan sinergis dalam larutan homogen dan penurunan densitas lipoprotein pada manusia. Studi lain melaporkan efek sinergisme antioksidan, yaitu antioksidan antagonisme, dimana peroksidasi lipid meningkat dengan katekin teh di liposom. Pengamatan saling bertentangan telah dijelaskan oleh fakta bahwa aktivitas antioksidan tidak hanya tergantung pada aktivitas kimia dari molekul antioksidan, tetapi juga pada lingkungan mikro media reaksi.

Teh juga mengandung *zinc*, *selenium* dan *mangan* yang bertindak sebagai co-faktor dalam enzim antioksidan, sedangkan polifenol dapat menghambat *ion logam chelate* seperti besi dan tembaga yang menyebabkan radikal hidroksil, menghambat reduksi transkripsi faktor sensitif dan enzim pro-oksidan, seperti *nitrat oksida sintase (iNOS)*, *siklooksigenase 2 (COX-2)*, *lipoxygenase 2 (LOX-2)* dan *xantin oksidase* dan lebih merangsang enzim antioksidan, seperti *glutathione S-transferase* dan *superoksida dismutase* (Higdon and Frei, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh El-Beshbishty *et al.*, 2011 menunjukkan bahwa polifenol yang terdapat dalam teh hijau juga mampu meningkatkan aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) sebagai antioksidan endogen yang mampu melindungi kerusakan organ melalui mekanisme antioksidan, antiinflamasi dan antiapoptosis.

Aktivitas antioksidan teh hijau berhubungan dengan kandungan polifenolnya. Daun teh mengandung polifenol sebagai komponen utama, yang terdiri dari sekitar 30% sampai 42% dari berat dari berat kering, dan sebagian besar adalah katekin. Katekin teh bersifat antimikroba (bakteri dan virus), antioksidan, anti radiasi, memperkuat pembuluh darah, melancarkan sekresi air seni, dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Daya antioksidan komponen katekin berbeda-beda. Epitaketin Galat (ECG) mempunyai daya antioksidan sebesar 4.93; epigalo katekin galat (EGCG) daya antioksidan sebesar 4.75; epitaketin (EC) daya antioksidan 2,50; dan katekin (C) daya antioksidan: 2.4. Daya katekin tersebut lebih besar dibandingkan dengan vitamin C dan β -karoten (Dewi, 2005).

Mekanisme proteksi vascular dari katekin (Ramadhan, 2015) adalah:

1. Katekin menangkap radikal bebas dan menghambat enzim prooksidan yang dapat menyebabkan penghambatan ROS karena stres oksidatif dan oksidasi LDL.

2. Katekin meningkatkan ekspresi lipid intestinal, menghambat sintesis dan absorpsi kolesterol, FFA dan Trigliserida.
3. Katekin menstimulasi produksi NO, proatasiklin dan cAMP endotel.
4. Katekin mencegah adhesi monosit pada endotel dan migrasi transendotelial dengan penghambata NF-KB, sytokin, dan molekul adhesi.
5. Katekin menghambat cyclins, PDGF, PTK, JNK 1, c-jun dan MMPs
6. Katekin mengurangi agresi platelet dan aktivitas pengurangan mobilitas Ca intraseluler, release PAF dan arachidonic acid serta thtomboxane A2 sintase (Babu., et all, 2008).

Mekanisme kerja teh hijau sebagai antioksidan menurut Higdon and Frei, 2003, yaitu:

1. Antioksidan dan Radikal.

Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa katekin dan polifenol dalam teh efektif sebagai anti oksigen reaktif fisiologis dan spesies nitrogen pada in vitro, termasuk *radicals superoksida* $[O_2^-]$, *peroxyl radicals*, oksigen tunggal, *peroxynitrite* $[ONOO^-]$, *asam hipoklorit*. Kemampuan senyawa yang bertindak sebagai anti radikal bebas terkait dengan pengurangan satu-elektron potensial (E°), suatu ukuran reaktivitas antioksidan sebagai hidrogen atau donatur elektron dalam kondisi standar. Salah satu faktor yang menentukan aktifitas antioksidan adalah penurunan E° dalam jumlah sedikit yang diperlukan untuk hidrogen atau donatur elektron. Katekin teh dan *teahflavins* memiliki nilai E° sebanding dengan α -*tokoferol* (Vitamin E), tapi lebih tinggi dari *askorbat* (vitamin C).

2. Logam *Chelation*.

Kemampuan *polifenol* teh pada *ion logam chelation*, seperti besi dan tembaga, dapat berkontribusi untuk aktivitas antioksidan dengan mencegah transisi aktif reduksi logam dari katalis pembentukan radikal bebas. Sifat chelating logam dapat menjelaskan kemampuan polifenol teh menghambat oksidasi

tembaga melalui mediasi LDL dan transisi oksidasi lainnya yang dikatalisis logam pada in vitro

3. Penghambatan faktor transkripsi reduksi-sensitif.

Teh hijau dan teh hitam, serta catechin dan polifenol teh, dapat menghambat aktivasi faktor transkripsi redoks-sensitif, nuclear faktor κ B (NF- κ B) dan aktivator protein-1 (AP-1), pada biakan sel. Meskipun antioksidan lain juga dapat menghambat faktor transkripsi redoks-sensitif ini. Penelitian menunjukkan bahwa katekin teh dan polifenol bertindak sebagai inhibitor kinase di jalur signaling kompleks. Kinase yang menghambat aktivitas polifenol teh mungkin tidak secara langsung berhubungan dengan kemampuan mereka untuk berfungsi sebagai donatur hidrogen atau antioksidan.

4. Penghambatan enzim "pro-oksidan"

Stimulasi pada sel inflamasi seperti makrofag oleh endotoksin bakteri atau sitokin inflamasi menyebabkan peningkatan ekspresi *inducible nitric oxide synthase (iNOS)* dan produksi *oksida nitrat (NO)* dalam jumlah besar. NO bereaksi sangat cepat dengan O untuk membentuk ONOO⁻ dan NO berasal dari oksidan lain yang mampu merusak DNA dan protein. Teh hijau dan teh hitam serta *catechin* dan *theaflavins* dapat menghambat lipopolisakarida yang diinduksi ekspresi gen iNOS dan aktivitas iNOS di kultur makrofag. Katekin teh hijau dan *theaflavins* teh hitam muncul untuk *downregulate iNOS* dengan menghambat aktivasi NF- κ B.

Peran polifenol terhadap oksidan yang menyerang menurut Mahmood *et al.*, 2010 dengan cara:

- a. Polifenol memberikan pengaruh yang menguntungkan untuk fosforilasi protein dengan cara berinteraksi dengan enzim oksidatif.
- b. Polifenol mampu mencegah pembentukan radikan bebas yang berasal dari besi dan logam tembaga melalui proses chelation.

- c. Polifenol mempengaruhi sistem perlindungan oleh antioksidan endogen tubuh yang dibentuk oleh β -karoten, vitamin E dan C.
- d. Polifenol dapat mencegah terjadinya interaksi nitrogen yang mengandung senyawa pada bahan nitrosasi untuk membentuk senyawa *N-nitroso ofensif*.
- e. Flavonoid berfungsi sebagai pro-oksidan seperti asam askorbat dan tokoferol dengan menghambat aktivitas katalisasi P₄₅₀.

Terdapat pengaruh teh hijau pada tikus betina yang dipajan cadmium klorida dengan dosis teh hijau yang diberikan pada hewan coba 7 mg/L dan 14 mg/L diberikan selama 21 hari. Rerata FSH dan LH menunjukkan kenaikan pada kelompok hewan coba yang diberi teh hijau dari pada kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa teh hijau memiliki efek menguntungkan terhadap toksisitas kadmium klorida yang berhubungan langsung dengan hormon gonadotropin (Mahmood *et.al*, 2015).

Pada penelitian Ali *et al.*, (2014), tikus yang dipajan MSG menunjukkan perubahan degeneratif dari ovarium dengan banyak folikel atresia, stroma mengalami vakuolisasi, medula menunjukkan beberapa vakuola dengan penyumbatan pembuluh darah dan dengan pemberian ekstrak teh hijau pada tikus yang dipajan MSG menunjukkan perbaikan histologis ovarium.