

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tikus *Rattus norvegicus*

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau *Norway Rat* berasal dari China dan menyebar hingga ke Eropa bagian barat (Sirois, 2005). Tikus putih berasal dari strain Wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus putih berasal dari galur *Wistar* dan termasuk golongan hewan mamalia yang memiliki ekor panjang. Morfologi dari tikus galur ini adalah memiliki tubuh yang panjang dengan kepala yang lebih sempit, bagian telinga tikus lebar dan pendek dengan rambut halus, mata berwarna merah dan ekornya lebih panjang dari ukuran tubuhnya. Bobot badan tikus putih jantan ini bisa mencapai 200 gram, memiliki masa hidup selama 4-5 tahun (Sirois, 2005).

Lebih dari 90% *rattus norvegicus* digunakan di dalam berbagai penelitian karena tikus *Rattus norvegicus* memiliki kemiripan genetik yang besar, yaitu 98% dengan manusia. Tikus *Rattus norvegicus* digunakan sebagai hewan model seperti obesitas, diabetes mellitus dan hipertensi.

Menurut Adiyati (2011), tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Sciurognathi

Famili : Muridae  
Sub-Famili : Murinae  
Genus : *Rattus*  
Spesies : *Rattus norvegicus*  
Galur/Strain : *Wistar*

Tikus hewan percobaan tidak memiliki kelenjar empedu dan lambung tikus dibagi menjadi 2 yaitu lambung glandular dan non-glandular serta usus yang terbagi menjadi 3 yaitu duodenum, jejunum, ileum. Tikus mengalami pubertas saat umur 50-60 hari dan masa bunting 21-23 hari (Kusumawati, 2004).

## **2.2 Toksisitas**

Toksisitas adalah suatu bahan kimia yang memiliki potensi racun (toksik) bagi tubuh orang ketika mengalami paparan (Wisaksono, 2002). Uji toksisitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efek toksik dari senyawa pada sistem biologi dan untuk mengetahui dosis-respon dari suatu senyawa uji. Data yang diperoleh dari uji toksisitas dapat digunakan sebagai informasi tentang derajat bahaya dari senyawa uji tersebut ketika terpapar ke tubuh manusia, sehingga dapat ditentukan pemberian dosis yang tidak menimbulkan toksik bagi tubuh (OECD, 2001).

### **2.2.1 Uji Toksisitas Akut**

Uji toksisitas akut merupakan uji praklinik yang dilakukan untuk menentukan efek toksik yang ditimbulkan dari suatu senyawa yang akan terjadi

dalam waktu singkat dengan dosis tertentu (Lu, 1995). Tujuan uji toksisitas akut adalah untuk mendeteksi efek toksik yang ditimbulkan dari suatu senyawa dalam waktu singkat setelah diberikan dosis tunggal dari suatu senyawa atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu tidak lebih dari 24 jam dan interval pemberian lebih dari 3 jam (OECD, 2001).

### **2.2.2 Uji Toksisitas Subkronik**

Uji toksisitas subkronik adalah uji yang dilakukan dengan memberikan senyawa ke dalam tubuh hewan setiap hari, seminggu sekali dan selama jangka waktu 10% dari masa hidup hewan coba (Retnomurti, 2008). Tujuan dilakukan uji subkronik adalah untuk mengetahui dampak senyawa terhadap organ tertentu dari hewan dan untuk mencapai NOAEL (*No-Observed-Adverse effect level*) (Casarett, 2008). Uji toksisitas akut dilakukan untuk mengamati perubahan organ yang meliputi penampakan fisik dari tubuh hewan, perubahan tingkah laku hewan, pernafasan, hematologi, pemeriksaan darah, berat badan, nekropsis dan pengamatan histologi (Hogson dan Levi, 2000).

### **1.3 Bahan Tambahan Pangan**

Bahan tambahan makanan adalah bahan yang biasanya bukan merupakan komponen dari makanan, memiliki atau tidak memiliki nilai gizi, yang sengaja ditambahkan ke dalam makanan untuk pengemasan, pengepakan, perlakuan dan pengolahan makanan (Cahyadi, 2008). Bahan tambahan makanan dibagi menjadi dua yaitu bahan tambahan makanan yang boleh untuk dikonsumsi dan bahan

tambahan makanan yang tidak boleh dikonsumsi, berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia (SNI 01-0222, 1995).

**Tabel 2.1** Penggolongan Bahan Tambahan Pangan (SNI 01-0222, 1995)

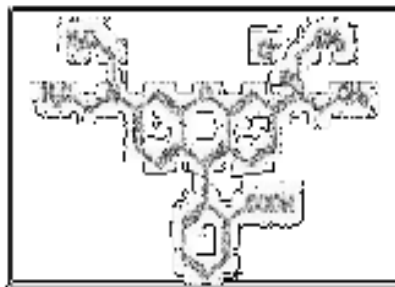
Bahan Tambahan yang Diizinkan	Bahan Tambahan yang tidak diizinkan
Antioksidan	Boraks
Pengatur keasaman	Formalin
Pengeras	Kloramfenikol
Pengawet	Nitrofurazon
Pewarna	Asam salisilat dan garamnya
Pemanis buatan	Kalium klorat
Pemutih dan pematang tepung	Dietil pirokarbonat

### 1.3.1 Cara Deteksi Bahan Tambahan Makanan

Untuk mengetahui kandungan rhodamin B dan sakarin sebagai bahan tambahan makanan di dalam tubuh yaitu dengan menggunakan kromatografi kertas dan alat spektrofotometer Uv-Vis (BPOM, 2012). Cara yang lain yaitu dengan menggunakan larutan yang telah dibuat selanjutnya diuji dengan menggunakan kit CMR (*Colour Main Reagent*) yang merupakan alat untuk mengkonfirmasi adanya kandungan rhodamin B dalam larutan tersebut. Uji tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa larutan yang akan diberikan pada masing-masing kelompok tikus benar mengandung senyawa rhodamin B. Uji konfirmasi ini dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml larutan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 3-5 tetes amonia dan ditambahkan petroleum (bensin) sebanyak 3-5 ml, kemudian dikocok selama 3-5 menit dan dibiarkan hingga terjadi reaksi pemisahan larutan. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan larutan kit uji zat

warna CMR sebanyak 2-3 ml. Selanjutnya ditunggu selama 1 menit dan diamati hingga timbul warna pada bagian bawah tabung reaksi (fraksi air), kemudian warna yang timbul dibandingkan dengan warna standar rhodamin B sehingga dapat diketahui bahwa larutan tersebut mengandung rhodamin B (Mahdi, 2013).

#### 2.4 Definisi Rhodamin B



**Gambar 2.1** Struktur Kimia Rhodamin B (Praja, 2015).

Rhodamin B adalah padatan berupa kristal hijau atau serbuk berwarna ungu kemerahan yang memiliki berat molekul 479,02 g/mol dan memiliki rumus molekul  $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ . Rhodamin B memiliki nama lain yaitu *rhodamine 123 Basic Violet 10* dan *(9-(ocarboxyphenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)*. Senyawa rhodamin B memiliki titik leleh yaitu  $165^{\circ}C$ , mudah larut di dalam alcohol, HCL dan NaOH. Rhodamin B mampu menghasilkan flourensi yang kuat dan warna merah kebiruan. Rhodamin B bukanlah pewarna makanan dan biasa digunakan sebagai pewarna nilon, serat kulit kayu, kertas, tinta, sabun, dan vernis. Bahan yang digunakan dalam proses pembuatan rhodamin B adalah *meta-dietilaminofenol* dan *ftalik anhidrid*. Kedua bahan tersebut bersifat toksik bagi tubuh bila dikonsumsi (Cahaya, 2003). Kadar rhodamin B yang boleh dikonsumsi maksimal 0,75 mg/hari menurut *Food and Drugs Administration (FDA)* (IARC, 1978).

#### **2.4.1 Efek Negatif Rhodamin B**

Di Indonesia, peraturan mengenai penggunaan zat pewarna yang diizinkan dan dilarang digunakan untuk makanan telah diatur dalam Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 722 / Menkes / Per/ IX / 88. Tetapi masih banyak ditemukan pelanggaran mengenai penggunaan pewarna tambahan yang seharusnya digunakan sebagai bahan pewarna tekstil dipakai untuk pewarna makanan. Hal ini jelas sangat berbahaya bagi kesehatan karena adanya residu logam berat pada zat pewarna tersebut (Cahyadi, 2008). Rhodamin B sangat sering ditemukan di dalam berbagai jenis makanan, seperti kue-kue basah, saus, sirup, tahu, terasi, dan tahu. Rhodamin B masuk ke dalam tubuh melalui cara inhalasi, tertelan, dan lewat mata serta kulit. Efek negatif yang bisa ditimbulkan dari mengkonsumsi rhodamin B adalah dapat menyebabkan iritasi pada saluran pencernaan (Alsuhendra, 2013).

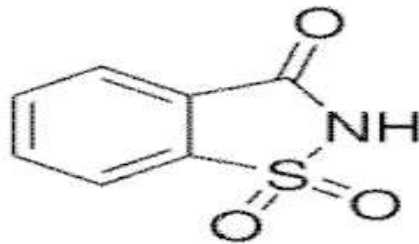
Rhodamin B dapat juga menghambat proliferasi sel, menurunkan jumlah sel endothelial vascular aorta, sel otot polos tikus. Rhodamin B mampu merusak pembentukan matrik ekstraseluler. Rhodamin B merupakan pewarna basa, yang bersifat toksik. Rhodamin B memiliki gugus klorin ( $Cl^-$ ) dan senyawa alkalin ( $CH_3$ ) serta memiliki struktur kimia poliaromatik hidrokarbon (PAH). PAH sangat radikal jika mengalami aktivasi dengan enzim sitokrom P-450 dan akan menimbulkan efek radikal bebas yang sangat reaktif (Hansen, *et al.*, 1959).

#### **2.4.2 Metabolisme Rhodamin B**

Rhodamin B masuk melalui tubuh lewat inhalasi, kontak pada mata dan kulit serta tertelan melalui oral. Jika masuk kedalam saluran pencernaan, urine maka akan menjadi berwarna merah atau merah muda (Alsuhendra, 2013).

Dalam traktus gastrointestinal rhodamin B akan diabsorpsi dan dimetabolisme di dalam tubuh tikus hanya 3-5 % dari dosis rhodamin b yang diberikan, dapat dieksresikan lewat urin dan feses dalam bentuk aslinya. Rhodamin B dapat berinteraksi dengan asam amino di dalam globin darah sehingga akan membentuk *globin adduct*. *Globin adduct* adalah bentuk kompleks akibat adanya ikatan antara senyawa kimia dengan molekul biologi. *Level adduct* tujuannya sebagai parameter dari risiko paparan senyawa yang bersifat mutagenik dan karsinogenik (Ymalean, 2013).

## 2.5 Sakarin



**Gambar 2.2** Struktur Kimia Sakarin (Praja, 2015).

Sakarin adalah pemanis sintetis yang terdapat dalam bentuk garam berupa kalsium, kalium, dan natrium sakarin. Sakarin memiliki rumus-rumus kimia ( $C_{14}H_8CaN_2O_6S_2 \cdot 3H_2O$ ), ( $C_7H_4KNO_3S \cdot 2H_2O$ ), ( $C_7H_4NaNO_3S \cdot 2H_2O$ ). Sakarin memiliki bentuk fisik berupa kristal berwarna putih, tidak memiliki bau, mudah larut dalam air, dan berasa manis. Sakarin memiliki tingkat kemanisan relatif tinggi yaitu 300-500 kali lipat dari sukrosa. Sakarin banyak digunakan di dalam pembuatan produk makanan dan minuman diantaranya adalah minuman ringan, selai, permen, dan gelatin rendah kalori (Alsuhendra, 2013).

Batas maksimum mengkonsumsi sakarin adalah 11 mg/Kg menurut WHO. Berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.208 / MenKes / Per / IV / 85 batas maksimum penggunaan bahan pemanis sintesis sakarin di Indonesia adalah 1 g/Kg bahan (BPOM RI, 2004)

**Tabel 2.2** Bahan Pemanis Sintesis yang Diizinkan (Peraturan Menteri Kesehatan RI Nomor 208 / Menkes / VI / 1985).

Nama Pemanis Sintesis	ADI ( <i>Acceptable Daily Intake</i> )	Jenis Bahan Makanan	Batas maksimal Penggunaan
Sakarin	0-11 mg/Kg BB	Permen	100 mg/Kg
Siklamat	0-11 mg/Kg BB	Permen	1 g/Kg

### 2.5.1 Efek Negatif Sakarin Sebagai Pemanis Buatan

Efek yang ditimbulkan akibat mengkonsumsi sakarin secara berlebihan adalah migraine, insomnia, kehilangan daya ingat, diare, asma, iritasi saluran cerna, iritasi kulit, alergi, kanker kantung kemih, dan otak. Pemanis buatan juga dapat menyebabkan radang pada saluran nafas, migrain dan gigi keropos jika dikonsumsi dalam jumlah yang berlebih (BPOM RI, 2004).

### 2.5.2 Metabolisme Sakarin

Sakarin tidak mengalami metabolisme di dalam tubuh. Sakarin sulit dicerna di dalam tubuh, tetapi cepat di ekskresikan lewat urine tanpa adanya perubahan. Sejumlah penelitian melaporkan bahwa, sakarin tidak bereaksi dengan DNA sehingga tidak adanya kerusakan pada DNA. Nilai ADI untuk sakarin adalah 50 mg/Kg BB (Alsuhehndra, 2013). Sakarin tidak memiliki nilai energi makanan, bisa memicu pelepasan insulin di manusia dan tikus (Just T, 2008).



## 2.6 Transforming Growth Factor – beta (TGF-βeta)

TGF-βeta 1 termasuk ke dalam famili besar yang memiliki banyak struktur ada 40 struktur yang melepaskan eksresi protein regulator di mamalia, yang mana mengorganisir di beberapa subfamili: TGF-βeta, *Bone Morphogenic Protein* (BMPs), *Growth And Differentiation Factor* (GDFs), *Mullerian Inhibitory Factor* (MIF), aktivin, dan inhibitor. TGF-βeta adalah protein yang disekresikan dengan tujuan untuk proses proliferasi, diferensiasi, dan proses apoptosis. TGF-βeta adalah immunosupresor yang berhubungan dengan inflamasi, autoimun, dan tumor. TGF-βeta memiliki 3 isoform yaitu TGF-βeta 1, 2, 3 (rifaii, 2009). TGF-βeta memiliki berat molekul 25 kDa. TGF-βeta disekresi oleh beberapa sel diantaranya adalah sel b, sel t, sel dendritik, sel trombosit, sel endotel, monosit atau makrofag, sel otot vascular, dan sel mesangial (Goumenos dkk, 2002).

TGF – beta I merupakan sitokin polipeptida multifungsional yang disekresikan oleh sel NK, sel B, sel T, sel CD-4, sel CD-8, dan *lymphokine activated killer cells*. TGF-βeta akan diekspresikan jika terjadi infeksi, iskemia sel, dan keadaan hipoksia. TGF- beta memiliki efek sebagai *immunomodulator multiple* di beberapa sel target, dapat menghambat proliferasi dari sel B dan sel T dan menjadi antagonis sitokin proinflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF- α) dan *Interferon-γ* (IFN- γ) serta dapat menghambat induksi dari reseptor IL-1 dan IL-2. TGF- beta 1 berfungsi sebagai sitokin proinflamasi dan sitokin antiinflamasi. In-vivo TGF-βeta 1 dapat menghambat terjadinya adhesi neutrofil dan sel T di sel -sel endothelial dan menghambat aktivasi dari makrofag (Chaturvedi *et al.*, 2000).

TGF- $\beta$  adalah regulator untuk proses produksi dan deposisi matrik ekstraseluler. TGF- $\beta$  dapat mempengaruhi sifat adhesive matrik ekstraseluler melalui 3 mekanisme yaitu 1). TGF- $\beta$  menstimulasi fibroblast untuk memproduksi protein matrik ekstraseluler dan protein adhesi, seperti kolagen dan fibronectin. 2). TGF- $\beta$  dapat menurunkan produksi enzim yang dapat mendegradasi matrik ekstraseluler yang meliputi kolagenase, heparinase, dan stromelisin. 3). Meningkatkan produksi protein yang dapat mencegah degradasi matrik ekstraseluler (Gerard, 2000). Menurut Baratawidjaja (2013), fungsi utama dari TGF- $\beta$  adalah mencegah terjadinya proliferasi sel, aktivasi limfosit dan leukosit.

## **2.7 Duodenum**

Duodenum adalah bagian pertama dari usus halus yang memiliki panjang 25 cm, bentuknya seperti sepatu kuda, dan kepalanya melingkari kepala pankreas. Duodenum memiliki papilla vateri yang letaknya sekitar 10 cm dari pilorus. Papilla vateri adalah tempat bermuaranya ductus koleduktus dan ductus pankreatikus berbentuk menonjol ke dalam lumen duodenum. Dinding bagian dalam duodenum memiliki lapisan mukosa yang banyak mengandung kelenjar brunner yang fungsinya untuk menghasilkan getah di usus halus (Priyanto, 2009).

Duodenum dapat dibagi menjadi 4 bagian yaitu pars superior, pars descenden, pars inferior dan pars ascenden. 1. Pars Superior duodeni memiliki panjang lebih dari 5 cm dan pergerakannya paling bebas. 2. Pars descenden duodeni memiliki panjang 8 cm, muara yang ada di pars descenden terdapat papilla duodeni

major dan mempunyai musculus *sphincter ampullae hepatopancreaticae* yang fungsinya untuk mengeluarkan cairan empedu dan cairan pankreas. 3. Pars inferior (horizontalis) duodeni memiliki panjang 8 cm. 4. Pars ascenden duodeni memiliki panjang 5 cm (Widjaja, 2009).



**Gambar 2.3** Gambaran Duodenum (Samuelson, 2007).

Duodenum terdiri dari vili, plika sirkularis, dan dinding duodenum. Vili merupakan modifikasi dari mukosa dan berbentuk seperti daun. Plika sirkularis adalah lipatan lipatan mukosa yang khas dari duodenum. Dinding duodenum yang terdiri dari beberapa lapisan konsentris yaitu lapisan peritoneum yang memiliki selapis pipih sel sel mesotelial dan disebut juga dengan lapisan serosa. Lapisan muskuler tersusun atas 2 serabut otot yaitu sirkuler dan tubuler. Lapisan submukosa yang berisi kelenjar duodenal tubuler atau kelenjar brunner. Kelenjar brunner bermuara ke *krypta lieberkuhn* melalui duktus sekretorius. Kelenjar brunner bersifat visceus, jernih, dan memiliki pH alkalis (8,2-9,3) yang berfungsi untuk melindungi lambung yang terlalu asam serta menjaga keseimbangan pH di dalam usus bagi kerja enzim pankreas. Duodenum memiliki 3 lapisan utama yaitu mukosa muskularis, lamina propria, dan selapis sel epitel kolumnar (Slomianka, 2009). Menurut Mikrajuddin (2007), vili yang ada di duodenum berfungsi untuk

memperluas permukaan penyerapan sehingga absorpsi nutrisi dapat terserap dengan baik.

## 2.8 Radikal Bebas dan ROS (*Reactive Oxygen Species*)

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan sangat reaktif terhadap sel-sel di dalam tubuh (Clarkson and Thompson, 2000). ROS (*Reactive Oxygen Ros*) adalah senyawa yang sangat reaktif, bisa mengoksidasi senyawa turunan oksigen dan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu radikal bebas dan non-radikal. Contoh kelompok radikal bebas adalah *superoxide anion, hydroxyl radicals, and peroxy radicals*. Senyawa non-radikal adalah *hydrogen peroxide* dan *organic peroxide* (Halliwell and Whiteman, 2004).

**Tabel 2.3** Contoh Senyawa Radikal Bebas dan ROS.

Radikal Bebas	Lambang	Non Radikal	Lambang
Hidrosil	OH*	Hidrogen Peroksida	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Superoksida	O <sub>2</sub> *	Singlet Oksigen	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Nitrit Oksida	NO*	Asam Hipoklorida	HOCL
Lipid Peroksida	LOO*	Ozon	O <sub>3</sub>

(Halliwell and Gutteridge, 1999).

### 2.8.1 Mekanisme ROS

Rhodamin B dapat diabsorpsi oleh tubuh sebesar 3-5% di dalam gastrointestinal. Rhodamin B memiliki senyawa Cl (Klorin) yang merupakan senyawa radikal yang berbahaya bagi tubuh karena senyawa tersebut tidak stabil serta memiliki sifat halogen. Sifat halogen adalah senyawa yang memiliki reaktivitas tinggi dan akan berusaha berikatan dengan senyawa yang ada di dalam

tubuh agar mencapai kestabilan sehingga dapat menyebabkan kanker (Yamlean, 2011).

Rhodamin B termasuk ke dalam senyawa oksigen reaktif atau *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS merupakan molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena molekul ini tidak berpasangan. Daya tahan ROS hanya dalam hitungan *millisecond* ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$ ) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk menstabilkan molekulnya (Makker, 2009). Dampak yang ditimbulkan akibat ROS disebut dengan *stress oxidative* atau kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan yang disebabkan oleh ROS antara lain adalah DNA, lipid, dan protein. Interaksi yang dihasilkan oleh ROS dengan basa DNA adalah merubah struktur kimia DNA dan dapat menyebabkan mutasi pada DNA sel germinal di ovarium dan testis, sedangkan kerusakan DNA pada sel somatik dapat mengarah ke kanker. Reaksi ROS dengan lipid tidak jenuh membran sel dan plasma lipoprotein dapat menyebabkan pembentukan MDA (malondialdehyde) yang bisa merubah protein dan basa asam nukleat. ROS dapat merubah secara langsung struktur kimia dalam protein dan lemak pada lipoprotein LDL, sehingga LDL tidak dikenali oleh liver dan LDL akan mengalami peningkatan di liver. LDL akan dikenali oleh makrofag dan menyebabkan pembesaran pada makrofag serta terjadinya akumulasi kolesterol (Bender, 2009).

## **2.9 Inflamasi**

Inflamasi merupakan reaksi yang ditimbulkan akibat adanya infeksi dan melibatkan banyak mediator seperti sitokin. Sel yang berperan di dalam inflamasi

adalah neutrofil. Neutrofil adalah sel yang pertama kali bermigrasi ke jaringan yang mengalami inflamasi dan puncaknya adalah 6 jam pertama (Theoret, 2009).

Menurut Theoret (2009), inflamasi dapat dibagi menjadi 2 yaitu inflamasi akut dan kronis.

#### 1. Tahapan inflamasi akut :

Ketika terjadi inflamasi akut maka sitokin yang akan dilepas adalah neutrofil, makrofag, dan sel darah merah. Makrofag akan meriliskan faktor angiogenik, *fibroblast activating factor*, sel epitel, sel endotel vaskuler, dan fibroblas. Dilanjutkan ke fase rekonstruksi melalui proses epitelisasi melalui sintesis kolagen dan perbaikan jaringan yang rusak. Terbentuklah jaringan parut dan akan masuk ke fase pematangan.

#### 2. Inflamasi kronis

Inflamasi kronis adalah inflamasi yang terjadi karena gagalnya proses inflamasi akut dan antigen masih menetap. Antigen yang menetap ini akan menimbulkan aktivasi dan akumulasi dari makrofag yang tidak terkendali sehingga dapat memicu penyakit kanker. Inflamasi kronis dibubungkan dengan karsinogenesis seperti transformasi seluler, promosi, survival, angiogenesis, dan metastasis.