

**PENGARUH PEMBERIAN LIKOPEN  
TERHADAP STATUS ANTIOKSIDAN (VITAMIN C,  
VITAMIN E DAN GLUTHATHION PEROKSIDASE)  
TIKUS (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*)  
HIPERKOLESTEROLEMIK**

*(The effect of lycopene supplementation on antioxidant status (Vitamin C,  
Vitamin E and Gluthathione Peroxidase) in Hypercholesterolemic Rats  
(Rattus norvegicus strain Sprague Dawley))*



**Tesis  
Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat sarjana S2**

**Oleh:**

**YENY SULISTYOWATI  
G4A003031**

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
Maret  
2006**

Tesis

**PENGARUH PEMBERIAN LIKOPEN  
TERHADAP STATUS ANTIOKSIDAN (VITAMIN C, VITAMIN E  
DAN GLUTATHION PEROKSIDASE) TIKUS (*Rattus norvegicus*  
*galur Sprague Dawley*) HIPERKOLESTEROLEMIK**

*(The effect of lycopene supplementation on antioxidant status (vitamin C, vitamin E  
and Gluthathione Peroxidase) in Hypercholesterolemic Rats  
(Rattus norvegicus strain Sprague Dawley))*

Disusun Oleh:

Yeny Sulistyowati  
G4A003031

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 18 Maret 2006  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

Prof.dr.S. Fatimah Muis, M.Sc, Sp.GK  
NIP. 130 368 067

dr. Banundari Rahmawati, SpPK  
NIP. 131 803 124

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

Prof.dr.H. Soebowo, Sp.PA(K)  
NIP. 130 352 549

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul **“Pengaruh Pemberian Likopen Terhadap Status Antioksidan (Vitamin C, Vitamin E dan Gluthathion Peroksidase) Tikus (*Rattus norvegicus* galur *Sprague Dawley*) Hiperkolesterolemik“** adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang di peroleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 18 Maret 2006

Yeny Sulistyowati

G4A003031

## RIWAYAT HIDUP

### A. Identitas

1. Nama Lengkap : Yeny Sulistyowati
2. Jenis Kelamin : Perempuan
3. Agama : Islam
4. Tempat/Tgl Lahir : Bantul, 04 Januari 1977
5. Alamat : Jl. Gajah Raya No 14-S Semarang (024) 70159884
6. Email : yniez\_smg@yahoo.com

### B. Riwayat Pendidikan

1. TK PGRI Tuban Jawa Timur, lulus tahun 1982.
2. SDN Palbapang III Bantul, lulus tahun 1988.
3. SMPN I Bantul, lulus tahun 1991.
4. SMAN I Bantul, lulus tahun 1994.
5. Akademi Gizi Muhammadiyah Semarang, lulus tahun 1997.
6. Fakultas Kesehatan Masyarakat UNDIP Semarang, lulus tahun 2002.

### C. Riwayat Pekerjaan

1. Enumerator dan surveyor program SPGK-HKI Jawa Tengah, tahun 1998 s/d 1999.
2. Sekretaris program INCNJ Yayasan Dharma Insan Nusantara Semarang, tahun 1999 s/d 2000.
3. Nutrition Educator and Nutrition Programme Officer kerjasama LP2K-WFP Semarang, tahun 2000 s/d 2003.
4. Staf pengajar tidak tetap Fakultas Kesehatan Masyarakat UNIMUS, tahun 2003/2004.
5. Fasilitator Community Development Programme kerjasama LP2K-WFP Semarang, tahun 2004.
6. Fasilitator Urban Poverty Project kerjasama LPPSLH-Kimpraswil Semarang, tahun 2005.

### D. Riwayat Keluarga

1. Nama Ayah : M. Dalhar Turmudzi
2. Nama Ibu : Nursiah Masloman
3. Nama Suami : Usfie Sodikin, M.Ag
4. Tempat/Tgl lahir : Pernalang, 01 Februari 1972
5. Nama Anak (1) : Mohammad Faizul Akmal
6. Tempat/Tgl lahir : Bantul, 07 Februari 2002
7. Nama Anak (2) : Naufal Allam Bahauddin
8. Tempat/Tgl lahir : Bantul, 03 Desember 2004

## KATA PENGANTAR

Pertama-tama, penulis panjatkan rasa syukur yang sedalam-dalamnya kehadirat Allah SWT, atas segala petunjuk dan rahmat-Nya, telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menjalani kuliah S2 dan menyelesaikan tesis ini.

Ungkapan terimakasih terutama untuk kedua pembimbing penulis, Prof. dr. Siti Fatimah Moeis, M.Sc, Sp.GK dan dr. Banundari Rachmawati, Sp.PK, yang telah memberi bimbingan, bantuan dan saran yang sangat berguna dalam penyusunan tesis ini. Tesis berjudul “ **Pengaruh Pemberian Likopen Terhadap Status Antioksidan (Vitamin C, Vitamin E dan Gluthathion Peroksidase) Tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) Hiperkolesterolemik** “, diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Program Studi Ilmu Biomedik dan untuk membuka wawasan yang lebih luas mengenai topik ini.

Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada ketua program, penguji dan narasumber: Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA(K), Dr. dr. Hertanto WS, MS, Sp.GK, Dr. dr. Endang Purwaningsih, MPH, Sp.GK, Prof. Dr. dr. H. Tjahjono, Sp. PA(K), FIAC, dr. Pudjadi, SU, dr. Parno Widjojo, Sp.FK.

Berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, semoga kebaikan dan bantuan yang diberikan mendapatkan imbalan berlipat dari Allah SWT, Amin.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam penulisan tesis ini masih banyak kekurangan, karena itu penulis menerima segala masukan untuk penyempurnaannya.

Semarang, 18 Maret 2006

Penulis

## DAFTAR SINGKATAN

ASAP	: Antioxidant Supplementation In Atherosclerosis Prevention
CAT	: Catalase
CRP	: C-Reactive Protein
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
DRR	: Dose Response Relationship
EURAMIC	: European Community Multi Center Study on Antioxidant
GPx	: Gluthathion Peroksidase
GR	: Gluthathion Reduktase
GSH	: Gluthathion Sulfur Hidroksil
GSSG	: Gluthathion disulfida
HDL	: High Density Lipoprotein
HMG-GA	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzim A
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
KIHD	: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor
LDL	: Low Density Lipoprotein
LDL oks	: LDL teroksidasi
LPPT	: Laboratorium Pengembangan dan Percobaan Terpadu
LP3HP	: Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan
MDA	: Malondialdehida
MI	: Myocardial Infarction
MUFA	: Mono Unsaturated Fatty Acid

NO	: Nitrogen Oxide
PJK	: Penyakit Jantung Koroner
PUFA	: Poly Unsaturated Fatty Acid
ROS	: Reactive Oxygen Species
SB	: Simpang Baku
SD	: Sprague Dawley
SOD	: Superoxide Dismutase
SPSS	: Statistical Product and Service Solutions
TLTK	: Tinggi Lemak Tinggi Kolesterol
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein

## DAFTAR ISI

<b>Bab</b>		<b>Hal</b>
	HALAMAN JUDUL	i
	HALAMAN PERSETUJUAN	ii
	PERNYATAAN	iii
	RIWAYAT HIDUP	iv
	KATA PENGANTAR	v
	DAFTAR SINGKATAN	vi
	DAFTAR ISI	viii
	DAFTAR TABEL	x
	DAFTAR GAMBAR	xi
	DAFTAR LAMPIRAN	xii
	ABSTRAK	xiii
1	PENDAHULUAN	1
1.1.	Latar Belakang	1
1.2.	Rumusan Masalah	4
1.3.	Keaslian Penelitian	5
1.4.	Tujuan Penelitian	8
1.4.1.	Tujuan Umum	8
1.4.2.	Tujuan Khusus	8
1.5.	Manfaat Penelitian	8
1	TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1.	Kolesterol	9
2.2.	LDL Oksidasi dan Radikal Bebas	10
2.3.	Antioksidan	12
2.3.1.	Vitamin C	14
2.3.2.	Vitamin E	16
2.3.3.	Gluthathion Peroksidase (GPx)	16
2.4.	Likopen	18
2.4.1.	Pencernaan, Absorpsi dan Metabolisme	19
2.4.2.	Likopen, Status Antioksidan dan Aterosklerosis	22
3	KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	25
3.1.	Kerangka Teori	25
3.2.	Kerangka Konsep	26
3.3.	Hipotesis	26
4	METODE PENELITIAN	27
4.1.	Rancangan Penelitian	27
4.2.	Populasi dan Sampel	27
4.2.1.	Populasi	27
4.2.2.	Sampel	28
4.3.	Kriteria Inklusi	28
4.4.	Kriteria Eksklusi	28



4.5.	Variabel Penelitian	28
4.5.1	Klasifikasi Variabel	28
4.5.2.	Definisi Operasional Variabel	29
4.6.	Alat dan Bahan	30
4.6.1.	Alat	30
4.6.2.	Bahan	30
4.7.	Prosedur Penelitian	31
4.7.1.	Persiapan Hewan Percobaan	31
4.7.2.	Perhitungan Dosis	32
4.7.3.	Persiapan Pakan	32
4.8.	Alur Kerja Penelitian	33
4.9.	Waktu dan Tempat Penelitian	33
4.10.	Analisis Data	34
5	HASIL PENELITIAN	35
5.1.	Gambaran Umum Tikus Percobaan	35
5.2.	Kadar Vitamin C, E dan GPx	36
5.3.	Vitamin C dan Variasi Dosis Likopen	37
5.4.	Vitamin E dan Variasi Dosis Likopen	38
5.5.	Gluthathion Peroksidase dan Variasi Dosis Likopen	39
6	PEMBAHASAN	40
6.1.	Gambaran Umum Tikus Percobaan	40
6.2.	Vitamin C dan Variasi Dosis Likopen	42
6.3.	Vitamin E dan Variasi Dosis Likopen	43
6.4.	Gluthathion Peroksidase dan Variasi Dosis Likopen	44
6.5.	Likopen dan Status Antioksidan (vitamin C, E dan GPx)	45
6.6.	Keterbatasan Penelitian	47
7	SIMPULAN DAN SARAN	48
7.1.	Simpulan	48
7.2.	Saran	48
	DAFTAR PUSTAKA	49
	LAMPIRAN	57

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>		<b>Hal</b>
1	Beberapa Penelitian Likopen Sebagai Antioksidan	5
2	Kandungan Likopen Beberapa Buah dan Sayur	18
3	Rerata dan Simpang Baku Likopen Pada Manusia dan Tikus	21
4	Nilai Rerata dan Simpang Baku Kadar Vitamin E, C dan GPx	36
5	Uji Beda Kadar Vitamin E, C dan GPx Antar Dua Kelompok Perlakuan	36

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Hal</b>
1. Struktur Elektron Molekul Stabil dan Radikal Bebas	11
2. Mekanisme Pembentukan Sel Busa	12
3. Hubungan Sinergisme Sistem Antioksidan	13
4. Mekanisme Pertahanan Sel	14
5. Struktur Kimia Vitamin C	15
6. Peranan Mikronutrien dalam Pencegahan Kerusakan Oksidatif	15
7. Struktur Kimia Vitamin E	16
8. Grafik korelasi kadar GPx dan Selenium (Se)	17
9. Struktur Kimia Likopen	19
10. Absorpsi Likopen	20
11. Mekanisme Peranan Likopen Dalam Mencegah Penyakit Kronis	23
12. Diagram Alur Penelitian	33
13. <i>Boxplot</i> Hasil Pengukuran Kadar Vitamin C	38
14. <i>Boxplot</i> Hasil Pengukuran Kadar Vitamin E	38
15. <i>Boxplot</i> Hasil Pengukuran Kadar GPx	39

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hal
1 Diagram Proses Identifikasi Likopen, Ekstraksi Likopen dan Pelarutan dengan <i>Olive Oil</i> serta Pembuatan Pakan TLTK	57
2 Foto-Foto Kegiatan Penelitian	60
3 Pemeriksaan Status Antioksidan	68
4 Hasil Uji Statistik	70
5 Surat Keterangan Penelitian	77
6 <i>Ethical Clearance</i>	78

**PENGARUH PEMBERIAN LIKOPEN  
TERHADAP STATUS ANTIOKSIDAN (VITAMIN C, VITAMIN E  
DAN GLUTATHION PEROKSIDASE) TIKUS (*Rattus norvegicus*  
*galur Sprague Dawley*) HIPERKOLESTEROLEMIK**

**ABSTRAK**

**Latar Belakang:** Stres oksidatif terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Likopen merupakan salah satu antioksidan potensial yang berasal dari makanan (eksogen) yang salah satu sumber utamanya adalah buah tomat (*Lycopersicon esculentum*). Likopen bekerja di dalam tubuh melalui mekanisme oksidatif dan non oksidatif. Pemberian likopen diharapkan mampu meningkatkan status antioksidan lain yang akan berpengaruh terhadap perbaikan profil lipid dan pencegahan oksidasi LDL. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian likopen dosis 0,36; 0,72 dan 1,08 mg terhadap status antioksidan pada tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik.

**Metode:** Rancangan penelitian adalah *post test only control group design*, pada tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 12 minggu, yang dibagi dalam 4 kelompok. Kelompok P<sub>0</sub> (kontrol) mendapat diet tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK). Sedangkan P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, dan P<sub>3</sub> masing-masing mendapat diet TLTK di tambah likopen 0,36; 0,72 dan 1,08 mg/ekor/hari. Likopen di ekstrak dari buah tomat lokal (*Lycopersicon esculentum*) varietas *Braight Pearl F1*, dengan teknik ekstrak TLC (*Thin Layer Chromatograph*). Dilakukan pemeriksaan kadar vitamin C (plasma), vitamin E (serum) dan glutathion peroksidase/GPx (darah) secara spektrofotometri dan enzimatis. Uji hipotesis yang di pakai adalah *Anova* dan *LSD* dengan tingkat kepercayaan 5%.

**Hasil:** Semakin tinggi pemberian likopen maka kadar vitamin C dan vitamin E semakin tinggi dibanding dengan kontrol. Uji kadar vitamin C dan E dalam keempat kelompok berbeda bermakna (*Anova p=0,00* dan *p=0,00*). Perbedaan tersebut ternyata sangat bermakna antar kelompok perlakuan baik pada vitamin C maupun E (*LSD, p<sub>0-1</sub>=0,00; p<sub>0-2</sub>=0,00; p<sub>0-3</sub>=0,00; p<sub>1-2</sub>=0,00; p<sub>1-3</sub>=0,00; p<sub>2-3</sub>=0,00*). Kadar GPx menurun pada kelompok perlakuan dan berbeda bermakna baik dalam maupun antar kelompok perlakuan.

**Simpulan:** Pemberian likopen 0,36; 0,72 dan 1,08 mg/ekor/hari meningkatkan kadar vitamin C dan E pada hewan coba hiperkolesterolemik dan menurunkan kadar GPx.

**Kata Kunci:** likopen, status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan GPx), hiperkolesterolemia.

**THE EFFECT OF LYCOPENE SUPPLEMENTATION  
ON ANTIOXIDANT STATUS (VITAMIN C, VITAMIN E AND  
GLUTHATHIONE PEROXIDASE) IN HYPERCHOLESTEROLEMIC  
RATS (*Rattus norvegicus* strain Sprague Dawley)**

**ABSTRACT**

**Background:** Oxidative stress is caused by imbalance of oxidant and antioxidant. Lycopene represents one of the potential antioxidants from food (exogen), present in tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Lycopene effects the body trough oxidative and non oxidative mechanism. Lycopene is expected to improve other antioxidant status and furthermore will have an effect in lipid profil and prevention oxidation of LDL cholesterol. This study was aimed the effect of lycopene 0,36; 0,72 and 1,08 mg to vitamin C, E and GPx status in hypercholesterolemic rats.

**Method:** Design of study was a post test only with control group randomization of male Sprague Dawley rats, 12 weeks of age, that were divided into 4 groups. Group P<sub>0</sub> was a control group with high fat and high cholesterol diet. Group P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, and P<sub>3</sub> were given high fat and high cholesterol diet with lycopene 0,36; 0,72 and 1,08 mg/day respectively. Lycopene being used was extracted from local variety Braight Pearl F1 tomatoes with TLC (Thin Layer Chromatograph) technique. Vitamin C and E were assessed by enzymatic technique using serum, while GPx was assessed the same way but using whole blood. This reading used spectrophotometer. Data were analyzed using Anova and LSD with degree of confidence set up at 5%.

**Result:** There were a dose effect relationship between lycopene supplementation and blood level of vitamin C and E. There were significant differences between the level of vitamin C and E within groups (Anova  $p=0,00$  dan  $p=0,00$ ) and between group (LSD,  $p_{0-1}=0,00$ ;  $p_{0-2}=0,00$ ;  $p_{0-3}=0,00$ ;  $p_{1-2}=0,00$ ;  $p_{1-3}=0,00$ ;  $p_{2-3}=0,00$ ). The level of blood GPx went down in all treated groups and the differences were significant within groups and between group.

**Conclusion:** Supplementation 0,36; 0,72 and 1,08 mg lycopene/day increased the level of vitamin C and E in hypercholesterolemic rats but decreased the level of GPx.

**Keywords:** lycopene, antioxidant status (Vitamin C, Vitamin E dan GPx), hypercholesterolemia.

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Kolesterol beberapa tahun ini masih menjadi suatu yang menarik untuk diteliti, karena sering dikaitkan dengan beberapa penyakit mematikan diantaranya adalah penyakit jantung koroner (PJK). Penyebab PJK multifaktor, namun telah terbukti salah satu faktor penyebab utama adalah dislipidemi dan peningkatan oksidasi kolesterol LDL.<sup>1</sup> Kadar kolesterol LDL tinggi bersifat aterogenik, tetapi kadar kolesterol HDL tinggi memiliki efek protektif karena berperan mengeluarkan kolesterol dari jaringan dan mengembalikannya ke hati.<sup>2-3</sup>

Kemajuan ilmu biologi molekuler memunculkan peran oksidan dan antioksidan. Pada keadaan normal terjadi keseimbangan antara keduanya di dalam tubuh. Beberapa penelitian terakhir mengindikasikan faktor pemicu penyakit di sebut stres oksidatif, yang terjadi karena peningkatan jumlah radikal bebas sehingga kemampuan pertahanan tubuh melalui sistem antioksidan berkurang. Keadaan ini dipengaruhi oleh spesies oksigen reaktif (ROS). ROS merupakan molekul oksidan relatif tinggi, bersifat sangat tidak stabil sehingga cepat bereaksi dengan molekul lain. ROS terjadi baik secara endogen maupun eksogen, melalui aktifitas metabolik reguler, aktifitas gaya hidup dan diet.<sup>iv-6</sup> Antioksidan merupakan agen protektif yang menonaktifkan spesies oksigen reaktif (ROS) sehingga secara signifikan dapat mencegah kerusakan oksidatif. Antioksidan secara alami berada dalam sel manusia (endogen), diantaranya adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPx). Glutathion peroksidase merupakan salah satu

antioksidan endogen yang berperan dalam perlindungan terhadap peroksidasi lipid. Pada keadaan stres oksidatif kerja glutathion peroksidase akan meningkat.<sup>6-7</sup>

Selain antioksidan tersebut, sumber-sumber antioksidan eksogen yang berasal dari makanan sehari-hari juga diperlukan untuk meminimalkan stres oksidatif, seperti vitamin-vitamin (vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten), dan senyawa fitokimia (karotenoid, isoflavon, saponin, polifenol).<sup>8-10</sup> Vitamin C merupakan vitamin larut dalam air, secara tunggal dapat menghambat proses oksidasi LDL.<sup>4,11</sup> Vitamin C bekerja bersama-sama dengan vitamin E dalam menghambat reaksi oksidasi. Vitamin C mengikat vitamin E radikal yang terbentuk pada proses pemutusan reaksi radikal bebas oleh vitamin E, menjadi vitamin E bebas yang berfungsi kembali sebagai antioksidan. Vitamin E merupakan vitamin larut dalam lemak, dapat memutuskan reaksi radikal bebas pada jaringan dan merupakan antioksidan yang dominan dalam partikel LDL.<sup>7</sup>

Selain vitamin, ada beberapa antioksidan alami yang termasuk senyawa fitokimia. Senyawa tersebut berada disekitar kita, mudah didapat, harga relatif terjangkau, diantaranya terdapat pada melon, semangka, jambu biji, anggur, dan tomat. Tomat banyak mengandung likopen, termasuk karotenoid yaitu isomer  $\beta$ -karoten tak siklik, merupakan pigmen natural yang disintesis oleh tumbuhan dan mikroorganisme tetapi tidak oleh binatang. Likopen salah satu antioksidan paling potensial, merupakan suatu hidrokarbon tak jenuh tinggi dengan 11 ikatan rangkap konjugasi dan 2 ikatan rangkap tak konjugasi. Likopen mengalami isomerisasi *cis-trans* yang dipengaruhi oleh energi, cahaya, suhu dan reaksi kimia. Likopen dari tumbuhan alami berada secara dominan dalam bentuk *all-trans*, bentuk paling stabil



secara termodinamika.<sup>12-15</sup> Konsentrasi likopen, bioavailibilitas dan interaksi dengan antioksidan lain mempengaruhi kerja likopen sebagai antioksidan.<sup>16-17</sup>

Argawal dan Rao (2000) menyatakan bahwa aktifitas antiaterosklerosis likopen didasarkan pada efek stimulan yang terjadi, baik secara oksidatif maupun non oksidatif. Pada mekanisme oksidatif, likopen diduga mencegah aterosklerosis dengan memproteksi biomolekul seluler penting, antara lain lipid dan lipoprotein. Dalam mekanisme non oksidatif, efek antiaterosklerosis likopen bekerja sebagai agen hipokolesterolemik dengan menghambat laju HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzim A*) reduktase yang berperan penting pada sintesis kolesterol, serta mengaktifkan reseptor LDL.<sup>18-20</sup> Stampfer dan Rimm melakukan penelitian hubungan antara antioksidan dengan penyakit jantung koroner (PJK) melaporkan bahwa pemberian suplemen vitamin E dosis tinggi (>100 IU/hari) dapat menurunkan resiko PJK hingga 40% di banding dengan pemberian dosis kecil (<3 IU/hari).<sup>21</sup>

Bukti epidemiologis menunjukkan bahwa individu dengan diet yang banyak mengandung senyawa antioksidan, vitamin C dan vitamin E memiliki resiko lebih rendah terkena penyakit akibat spesies oksigen reaktif (ROS), dibandingkan individu dengan diet kekurangan senyawa tersebut.<sup>22</sup> Pemberian likopen telah diketahui memberikan efek menguntungkan, akan tetapi mekanisme dan pengaruh di dalam tubuh terhadap antioksidan lain belum begitu jelas.<sup>23-24</sup> Begitupula dengan penelitian tentang variasi dosis likopen untuk mengetahui *dose response relationship* dan pengaruhnya terhadap status antioksidan lain belum pernah dilakukan. Penelitian sebelumnya pada manusia menggunakan dosis likopen 40 mg/hari.<sup>19-20</sup> Dosis tersebut di pakai pada penelitian sebagai nilai tengah perlakuan, sehingga didapatkan dosis lain 20 mg/hari dan 60 mg/hari. Pemberian dosis likopen pada tikus menggunakan tabel

konversi perhitungan dosis antar jenis hewan, berdasarkan nisbah (*ratio*) luas permukaan tubuh hewan percobaan, dosis tikus adalah 0,018 dosis manusia.<sup>25</sup>

Hasil penelitian likopen, vitamin C, vitamin E sebagai antioksidan eksogen dalam hubungan dengan hiperkolesterolemi tidak konsisten,<sup>26-29</sup> sebagaimana hasil penelitian glutathion peroksidase (sebagai antioksidan endogen).<sup>30-31</sup> Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian likopen terhadap status antioksidan lain pada tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) yang telah di buat hiperkolesterolemi. Dipilihnya tikus ini karena dari beberapa penelitian dapat diketahui bahwa tikus jenis ini mudah di buat hiperkolesterol, lebih tahan terhadap perlakuan, omnivora, serta memiliki karakteristik fisiologi mirip manusia di banding kelinci.<sup>32-34</sup> Status antioksidan ini akan berpengaruh terhadap perbaikan profil lipid dan pencegahan oksidasi LDL kolesterol, sehingga dapat mencegah pembentukan sel busa dan terjadinya lesi aterosklerosis. Antioksidan yang di teliti adalah vitamin C, vitamin E, glutathion peroksidase (GPx), dengan sampel darah hewan percobaan. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung dengan penelitian lain mengenai pengaruh variasi dosis likopen terhadap profil lipid, lipid terperoksidasi, jumlah sel busa dan ketebalan aorta abdominalis tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik. Dosis likopen pada penelitian ini yaitu 0,36; 0,72; dan 1,08 mg/ekor/hari sesuai konversi dari dosis manusia.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Dari latar belakang tersebut di atas, maka rumusan masalah ini adalah: apakah pemberian likopen dosis 0,36 mg/ekor/hari; 0,72 mg/ekor/hari dan 1,08 mg/ekor/hari berpengaruh terhadap status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan glutathion peroksidase)?

### 1.3. Keaslian Penelitian

Beberapa penelitian mengenai likopen sebagai antioksidan dilakukan oleh Upritchard, Chopra, Hininger, Reessanen, Hadley, dan lain-lain seperti pada Tabel 1. Penelitian yang telah dilakukan sebagian besar menggunakan jus buah atau hasil olahan lain yang diasumsikan mengandung likopen. Dosis dan lama pemberian likopen sangat bervariasi, disesuaikan dengan hasil yang ingin dicapai. Penelitian menggunakan variasi dosis likopen 0,36; 0,72; dan 1,08 mg/ekor/hari dan pengaruhnya terhadap status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan GPx) belum pernah dilakukan di dalam maupun di luar negeri.

**Tabel 1. Beberapa Penelitian Likopen Sebagai Antioksidan**

No	Judul	Peneliti (Tahun)	Desain dan Metode	Parameter	Hasil
1.	<i>Effect of Supplementation with tomato juice, vitamin E and vitamin C on LDL oxidation and product of inflammatory type 2 diabetes</i>	Upritchard, dkk (2000)	57 pasien (<75 tahun), DM tipe 2 dengan plasebo kapsul gelatin selama 4 minggu, dilanjutkan 4 minggu pemberian jus tomat (500 ml/hari), vitamin E (800 IU/hari), vitamin C (500 mg/hari), plasebo secara random	1. Tekanan darah 2. Profil lipid 3. Kadar glukosa 4. Konsentrasi plasma antioksidan 5. LDL oksidasi (lag time) 6. Plasma CRP	1. Konsumsi jus tomat menaikkan kadar plasma likopen dan efektif menghambat oksidasi LDL 2. Suplementasi vitamin E dan C dosis tinggi menaikkan kadar plasma CRP, salah satu faktor resiko MI pada pasien DM
2.	<i>Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers</i>	Chopra, dkk (2000)	34 subyek sehat, 24-52 th, dengan perlakuan 25 mg karotenoid/hari dari 'red food' diikuti dengan 25 mg karotenoid/hari dari 'green food'	Pengukuran profil lipid, tes fungsi liver, aktifitas kreatin kinase di serum	Tidak ada perubahan yang signifikan pada semua variable yang diteliti
No	Judul	Peneliti	Desain dan	Parameter	Hasil

		(Tahun)	Metode		
3.	<i>Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men</i>	Bub, dkk (2000)	Studi intervensi diet pada sejumlah 23 pria sehat yang dilakukan selama 8 minggu. Periode eksperimen dibagi 4: pemberian jus tomat (330 ml/hari; 40 mg), jus wortel (330 ml/hari; 15,7 mg alfa karoten dan 22,3 beta karoten), bubuk bayam (10g/hari; 11,3 mg lutein dan 3,1 mg beta karoten)	1. Konsentrasi lipoprotein karotenoid 2. Peroksidasi lipid	1. Konsumsi buah tinggi karotenoid, menaikkan konsentrasi lipoprotein karotenoid 2. Hanya jus tomat yang dapat mereduksi LDL oksidasi
4.	<i>No significant effects of lutein, lycopene or beta carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL Oxidizability in healthy adult subjects</i>	Hininger AI, (2001)	Sejumlah 175 pria di bagi 4 kelompok. Masing-masing kelompok menerima $\beta$ -karoten, lutein dan likopen sebanyak 15 mg/hari, dan plasebo selama 3 bulan	1. Status antioksidan (plasma karotenoid, vitamin C, A dan gluthathione, protein kelompok SH, aktifitas enzim antioksidan eritrosit) 2. LDL oksidasi	1. Pemberian $\beta$ -karoten, lutein dan likopen meningkatkan kadar plasma karotenoid dan LDL secara signifikan 2. Suplementasi tidak meningkatkan resistensi oksidasi LDL, rasio PUFA/MUFA, vitamin C, GSH, protein SH dan aktifitas metaloenzim antioksidan
5.	<i>Association of lycopene and dietary intake of fruits, berries, and vegetables with atherosclerosis and CVD</i>	Reessanen T, (2003)	Penelitian ASAP ( <i>Antioxidant supplemetation in atherosclerosis prevention</i> ) dan penelitian KIHHD ( <i>Kuopio ischaemic heart disease risk factor</i> )	1. Plasma likopen 2. CCA-IMT 3. Asupan Buah dan sayur	4. Ada hubungan signifikan kadar plasma likopen yang rendah dengan aterosklerosis dan peningkatan resiko PJK pada laki-laki 5. Tingginya asupan buah dan sayur berhubungan dengan penurunan PJK
<b>No</b>	<b>Judul</b>	<b>Peneliti</b>	<b>Desain dan</b>	<b>Parameter</b>	<b>Hasil</b>

		(Tahun)	Metode		
6.	<i>The consumption proccessed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensivity to oxydative damage</i>	Hadley dkk (2003)	Sejumlah 60 orang sehat (30 laki-laki dan 30 wanita) melakukan diet tanpa likopen selama seminggu, selanjutnya selama 15 hari secara random diberi likopen 35, 23 dan 25 mg/hari dari produk CS, RTS dan V8	1. Perubahan konsentrasi plasma likopen 2. Pola isomer likopen 3. Lag time	1. Konsentrasi dan pola isomer likopen berubah dengan adanya variasi diet 2. Konsumsi produk tomat secara signifikan meningkatkan proteksi lipoprotein pada stres oksidatif ( <i>ex vivo</i> )
7.	<i>Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women.</i>	Sesso HD, dkk (2003)	Penelitian kasus kontrol pada 39.876 orang wanita sehat, asupan likopen di recall dengan metode FFQ.	1. Konsumsi likopen 2. Perubahan konsentrasi plasma likopen	1. Konsumsi likopen tidak berhubungan dengan penurunan resiko PJK. 2. Kadar likopen yang tinggi berhubungan dengan penurunan resiko PJK pada wanita.
8.	<i>Plasma lycopene, other carotenoids and retinol and the risk of CVD in women</i>	Sesso HD, dkk (2004)	Penelitian kasus kontrol pada 39.876 orang wanita sehat, diikuti selama 4,8 tahun.	Plasma likopen	Peningkatan kadar likopen berhubungan dengan penurunan resiko PJK pada wanita.
9.	<i>The effect of lycopene supplementation on antioxidant status (vitamin C, E and GPx) in Hypercholesterolemic Rats (Rattus norvegicus galur Sprague Dawley)</i>	Sulistyowati Y (2005)	Rancangan <i>post test only control group</i> , pada tikus <i>Sprague Dawley</i> jantan, 12 minggu, dibagi dalam 4 kelompok. Kelompok P <sub>0</sub> (kontrol) tanpa likopen. P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> dan P <sub>3</sub> masing-masing dengan pemberian likopen 0,36; 0,72; 1,08 mg/ekor/hari.	Kadar vitamin C, vitamin E dan Gluthathion peroksidase (GPx)	1. Kenaikan kadar vitamin C dan vitamin E secara signifikan 2. Adanya penurunan kadar GPx secara signifikan

#### 1.4. Tujuan Penelitian

#### **1.4.1. Tujuan Umum :**

Mengetahui pengaruh pemberian likopen dosis 0,36 mg/ekor/hari; 0,72 mg/ekor/hari dan 1,08 mg/ekor/hari terhadap status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan glutathion peroksidase) tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik.

#### **1.4.2. Tujuan Khusus :**

- a. Mendiskripsikan kadar vitamin C, vitamin E, dan glutathion peroksidase pada kelompok tikus percobaan hiperkolesterolemik setelah perlakuan.
- b. Menganalisis perbedaan dalam kelompok perlakuan terhadap kadar vitamin C, vitamin E, dan glutathion peroksidase tikus percobaan.
- c. Menganalisis perbedaan antar kelompok perlakuan terhadap kadar vitamin C, vitamin E, dan glutathion peroksidase tikus percobaan.

#### **1.5. Manfaat Penelitian**

Pemberian variasi dosis likopen untuk mengetahui status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan glutathion peroksidase) tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik. Apabila terbukti manfaat pemberian likopen dalam dosis tertentu, dapat digunakan sebagai dasar bagi penelitian lebih lanjut dan pengembangan fitofarmaka bagi peningkatan kesehatan masyarakat.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

## 2.1. Kolesterol

Struktur kimia dasar kolesterol berupa steroid. Terdapat dalam jaringan dan lipoprotein plasma dalam bentuk kolesterol bebas atau gabungan dari asam lemak rantai panjang sebagai ester kolesteril. Senyawa kolesterol ini disintesis dalam banyak jaringan dari asetil-Ko A dan akhirnya dikeluarkan dari tubuh melalui empedu, sebagai garam kolesterol atau empedu. Kolesterol adalah produk khas hasil metabolisme hewan sehingga terdapat dalam semua bahan makanan yang berasal dari hewan, misalnya kuning telur, otak, daging dan hati. Hiperkolesterol secara langsung dapat merangsang terjadinya disfungsi endotel. Apabila terjadi terus menerus (kronis) akan menyebabkan akumulasi lipoprotein pada tempat jejas, yaitu lokasi terjadinya disfungsi endotel. Penumpukan lipid pada dinding arteri akan mencederai berbagai komponen arteri, meningkatkan lintas pinositosis transendotelial dan memudahkan masuknya plasma pada dinding arteri. Deposit lemak yang masuk tunika medika akan mencederai miosit serta merangsang hipertropi dan hiperplasi miosit. Keadaan ini akan meningkatkan permeabilitas endotel yang akan mempermudah masuknya lipid dalam endotel, sehingga terjadi oksidasi LDL yang merangsang terjadinya aterosklerosis.<sup>1-3</sup>

Kemajuan dalam bidang farmakoterapi berupaya mengungkap faktor-faktor dan mekanisme yang berperan pada patogenesis aterosklerosis. Selain faktor resiko klasik (seperti merokok, bahan kimia eksogen, infeksi virus, imunitas, gaya hidup, dan kebiasaan makan makanan tinggi kolesterol), faktor resiko baru makin bertambah banyak antara lain pengaruh homosistein dan defisiensi estrogen. Hipotesis baru tentang aterosklerosis juga bermunculan, antara lain disfungsi endotel, radikal bebas, inflamasi atau infeksi, autoimun dan genetik.<sup>27,35</sup>

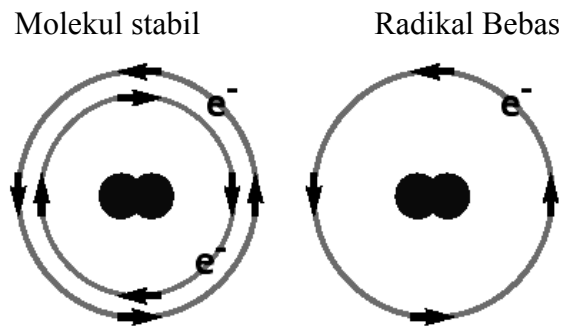
Virchow pada tahun 1956 mengajukan konsep kerusakan endotel yang mendahului aterosklerosis. Kerusakan ini terjadi karena beberapa sebab mekanis, kimia dan imunologi, misalnya: hipertensi, rokok, LDL, homosistein, toksin, virus, bakteri. Kerusakan endotel akan menyebabkan endotel lepas, masuk sirkulasi dan bersinggungan dengan makrofag dan platelet, memacu pelepasan zat aktif, serta akan memacu terjadinya fibrin dan trombus.<sup>27,28</sup>

Halliwell dan Cross pada tahun 1987 menyampaikan konsep radikal bebas dalam proses aterosklerosis, dimana lipid peroksida berupa malondialdehid (MDA) merupakan produk reaksi dari radikal bebas, apabila berlebihan akan mengakibatkan stres oksidatif. Reaksi oksidasi ini akan terus terjadi secara berantai dan bereaksi terus menerus terhadap fosfolipid dari LDL. Akibat dari reaksi, terjadi oksidasi LDL yang akan di fagosit oleh makrofag sehingga terbentuk sel busa dalam jumlah berlebihan. Proses fagositosis dilakukan oleh netrofil, monosit dan sel T limfosit menghasilkan radikal bebas superoksida yang akan mempercepat kerusakan sel.<sup>27,28</sup>

## **2.2. LDL Oksidasi dan Radikal Bebas**

Beberapa penelitian sudah membuktikan efek berbahaya yang akan ditimbulkan oleh reaksi kimia dari radikal bebas. Dalam terapi penurunan kadar kolesterol, diperlukan peran antioksidan sebagai suatu senyawa pemberi elektron yang dapat meredam dampak negatif oksidan dalam proses oksidatif. Gambar 1 memperlihatkan struktur dari radikal bebas yang merupakan suatu atom atau molekul mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan menyebabkan instabilitas dan bersifat reaktif. Dengan hilang atau bertambahnya satu elektron pada molekul lain akan menyebabkan radikal bebas baru dan terjadi perubahan dramatis fisik dan kimiawi.<sup>v-6</sup>

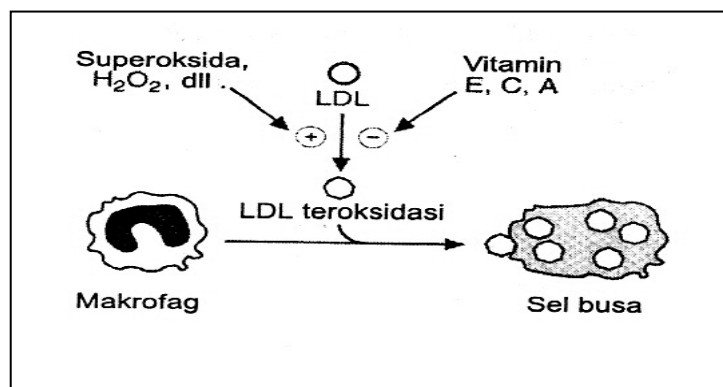




**Gambar 1. Struktur Elektron Molekul Stabil dan Radikal Bebas**<sup>36</sup>

Radikal bebas dapat terbentuk dari beberapa reaksi pada sel makrofag, sel endotel, maupun sel monosit, berupa superoksida, hidroksil serta peroksida. Pada sel kariatik, produksi radikal bebas endogen utama berasal dari mitokondria. Peran penting radikal bebas dalam proses aterosklerosis adalah keterlibatannya dalam proses oksidasi LDL, serta menginduksi terjadinya inflamasi. LDL teroksidasi akan memicu timbulnya disfungsi endotel dan proses inflamasi akan mengakibatkan aktivasi migrasi monosit ke dalam intima, yang berlangsung secara terus menerus dan kompleks sehingga menyebabkan terjadinya aterosklerosis.<sup>31,37-38</sup>

Kemajuan ilmu biologi molekuler menyebabkan perlu ditambahkan faktor resiko lain terjadinya aterosklerosis, yaitu kadar antioksidan dalam tubuh rendah akan meningkatkan gangguan akibat radikal bebas mengenai lipid, karbohidrat, maupun protein sehingga terjadi kerusakan sampai kematian sel. Gangguan fungsi protein maupun mutasi gen mengakibatkan berhentinya proliferasi DNA. Kerusakan DNA akan mempengaruhi proses transkripsi dan sintesa protein, kesalahan transkripsi bertumpuk-tumpuk menyebabkan kesalahan metabolisme makin banyak.<sup>28,29,39</sup>

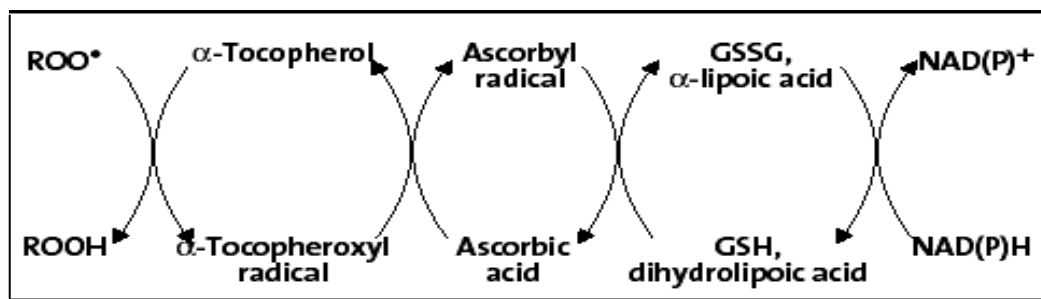


## **Gambar 2. Mekanisme Pembentukan Sel Busa<sup>2</sup>**

Gambar 2 memperlihatkan pembentukan sel busa dengan fagositosis LDL teroksidasi. Proses ini terjadi di ruang sub endotel pembuluh darah. Vitamin E, C dan A menghambat oksidasi LDL. Beberapa penelitian mengenai konsumsi makanan yang mengandung banyak buah dan sayur dapat mencegah penyakit jantung, salah satu faktornya karena mengandung vitamin antioksidan tersebut.<sup>2</sup>

### **2.3. Antioksidan**

Antioksidan adalah senyawa dalam kadar rendah mampu menghambat oksidasi molekul target sehingga dapat melawan atau menetralkan radikal bebas. Dikenal ada tiga kelompok antioksidan, yaitu antioksidan enzimatis, antioksidan pemutus rantai dan antioksidan logam transisi terikat protein. Yang termasuk antioksidan enzimatis adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), glutathion reduktase (GR) dan seruloplasmin. Mekanisme kerja antioksidan enzimatis adalah mengkatalisis pemusnahan radikal bebas dalam sel. Antioksidan pemutus rantai adalah molekul kecil yang dapat menerima atau memberi elektron dari atau ke radikal bebas, sehingga membentuk senyawa baru stabil, misal vitamin E dan vitamin C. Sedangkan antioksidan logam transisi terikat protein bekerja mengikat ion logam mencegah radikal bebas.<sup>40-41</sup>

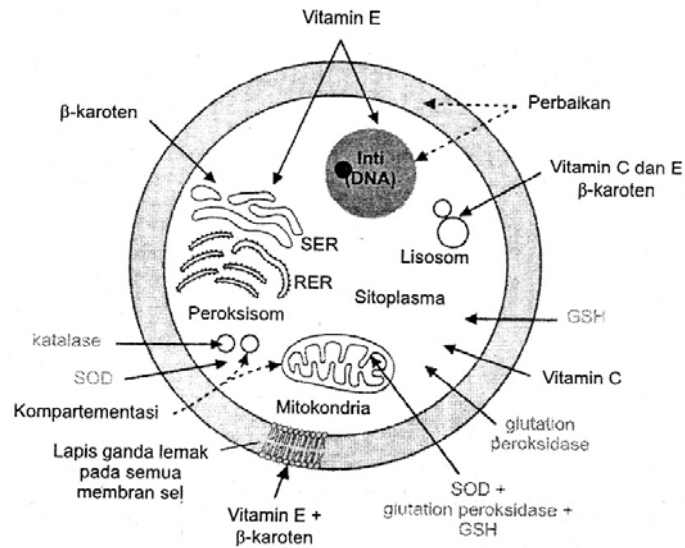


**Gambar 3. Hubungan Sinergisme Sistem Antioksidan<sup>36</sup>**

Gambar 3 menjelaskan hubungan yang sinergisme di dalam sistem antioksidan. Adanya suatu radikal yang masuk, pertama kali akan dinetralisir oleh vitamin E, kemudian vitamin C dan dilanjutkan oleh mekanisme oksidatif dari dalam tubuh, dilakukan oleh enzim, misal glutathion. Di dalam sistem tersebut ada saling keterkaitan antara satu dengan lain (*antioxidant network*). Beberapa antioksidan penting dalam mekanisme untuk menghambat kerusakan oksidatif akibat radikal bebas, diantaranya glutathion peroksidase, vitamin C dan vitamin E.<sup>36</sup> Antioksidan bisa dikelompokkan berdasar sumbernya menjadi antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen merupakan antioksidan secara alami berada dalam sel manusia diantaranya adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GPx). Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang berasal dari luar tubuh, berasal dari makanan sehari-hari seperti vitamin-vitamin (vitamin C, vitamin E, β-karoten), dan senyawa fitokimia (karotenoid, isoflavon, saponin, polifenol).<sup>8-10</sup>

Pertahanan sel terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) melalui mekanisme: reduksi enzimatik, pengeluaran oleh vitamin antioksidan, perbaikan membran dan DNA yang rusak oleh enzim dan kompartementasi (Gambar 4). Enzim *scavenger* bersifat antioksidan mengeluarkan atau menyingkirkan superoksida dan hidrogen peroksida. Vitamin E, vitamin C dan karotenoid, sebagai vitamin antioksidan dapat

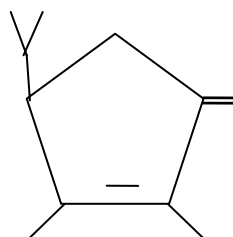
menghentikan reaksi berantai radikal bebas. Mekanisme perbaikan DNA dan pengeluaran asam lemak teroksidasi dari membran, juga dijumpai di sel. Pertahanan kompartementasi mengacu kepada pemisahan spesies dan tempat terlibat dalam pembentukan ROS dari bagian sel lainnya.<sup>2</sup>

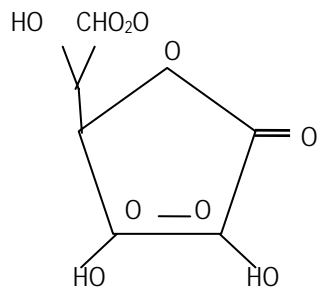


**Gambar 4. Mekanisme Pertahanan Sel<sup>2</sup>**

### 2.3.1. Vitamin C

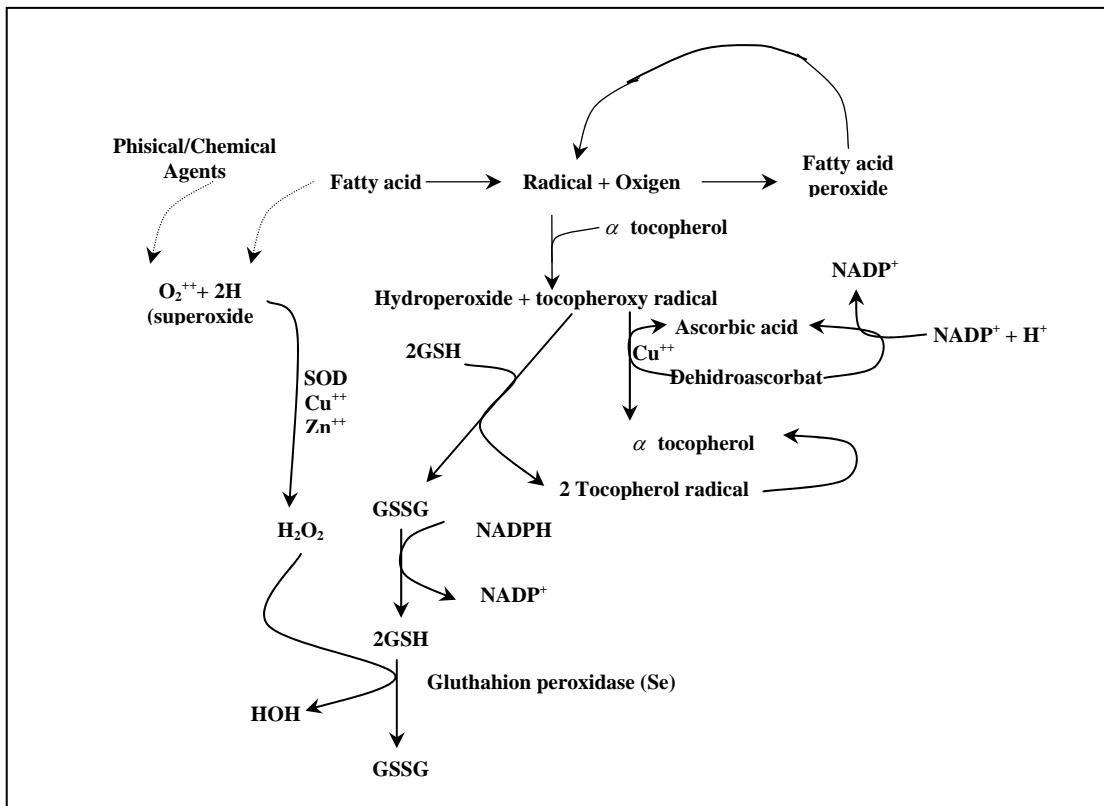
Vitamin C memiliki struktur sangat mirip dengan glukosa, pada sebagian besar mamalia vitamin C berasal dari glukosa (Gambar 5). Vitamin C terdapat dalam bentuk asam askorbat maupun dehidroaskorbat.<sup>42</sup> Asam askorbat diabsorpsi usus halus, dan hampir seluruh asam askorbat dari makanan terabsorpsi sempurna. Asam askorbat masuk sirkulasi untuk didistribusikan ke sel-sel tubuh. Asam askorbat dioksidasi in vivo menjadi radikal bebas askorbil. Sebagian proses reversibel menjadi asam askorbat kembali, sebagian menjadi dehidroaskorbat yang akan mengalami hidrolisis, oksidasi dan akhirnya diekskresi melalui urine.<sup>43</sup>





**Gambar 5. Struktur Kimia Vitamin C<sup>42</sup>**

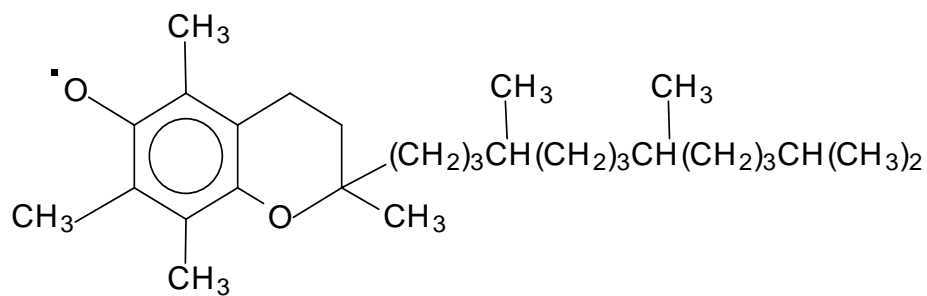
Vitamin C bersifat hidrofilik dan berfungsi paling baik pada lingkungan air sehingga merupakan antioksidan utama dalam plasma terhadap serangan radikal bebas (ROS) dan juga berperan dalam sel.<sup>44</sup> Sebagai zat penyapu radikal bebas, vitamin C dapat langsung bereaksi dengan superoksida dan anion hidroksil, serta berbagai hidroperoksida lemak (Gambar 6). Sedangkan sebagai antioksidan pemutus-reaksi berantai, memungkinkan untuk melakukan regenerasi bentuk vitamin E tereduksi.<sup>24</sup>



**Gambar 6. Peranan Mikronutrien Dalam Pencegahan Kerusakan Oksidatif Yang Disebabkan Oleh Radikal Bebas<sup>45</sup>**

### 2.3.2. Vitamin E

Vitamin E (tokoferol) merupakan suatu zat penyapu radikal bebas lipofilik dan antioksidan paling banyak di alam. Vitamin E berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran. Vitamin E terdiri dari struktur tokoferol, dengan berbagai gugus metil melekat padanya dan sebuah rantai sisi fitil (Gambar 7). Diantara struktur tersebut  $\alpha$ -tokoferol adalah antioksidan yang paling kuat. Vitamin E adalah penghenti reaksi penyebar radikal bebas yang efisien di membran lemak, karena bentuk radikal bebas distabilkan oleh resonansi. Oleh karena itu radikal vitamin E memiliki kecenderungan kecil untuk mengekstraksi sebuah atom hidrogen dari senyawa lain dan menyebarkan reaksi. Bahkan radikal vitamin E berinteraksi secara langsung dengan radikal peroksi lemak sehingga atom hidrogen lainnya berkurang dan menjadi tokoferil quinon teroksidasi sempurna. Vitamin E radikal juga bisa mengalami regenerasi dengan adanya vitamin C atau glutathion (Gambar 6).<sup>2,45</sup>

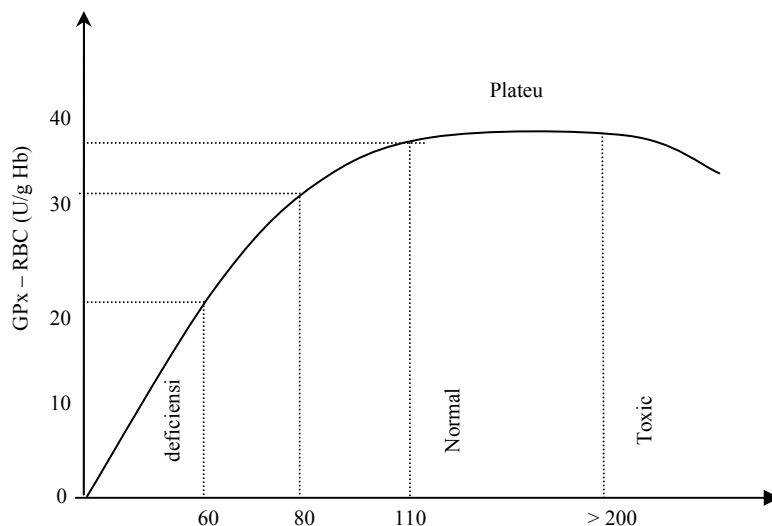


**Gambar 7. Struktur Kimia Vitamin E<sup>4</sup>**

### 2.3.3. Gluthathion Peroksidase (GPx)

Mekanisme reaksi enzim glutathion peroksidase merupakan salah satu cara utama yang digunakan oleh tubuh untuk melindungi diri dari kerusakan oksidatif. Enzim ini mengkatalisis reduksi hidrogen peroksida dan peroksida lemak (LOOH) oleh glutathion ( *$\gamma$ -glutamil sisteinilglisin*). Gugus sulfhidril pada glutathion (GSH) berfungsi sebagai donor elektron, dan oksidasi menjadi bentuk disulfida (GSSG)

selama reaksi tersebut.<sup>2</sup> Sel memiliki dua glutathion peroksidase, salah satunya memerlukan selenium untuk aktifasinya (sehingga selenium termasuk kebutuhan dalam makanan harian). Kadar selenium sebanding dengan kadar glutathion peroksidase di dalam darah (Gambar 8). Kadar glutathion peroksidase dapat digunakan untuk mengukur kadar selenium. Hasil pengukuran tersebut dapat memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan jika mengukur selenium secara terpisah, karena kadar enzim lebih bisa menggambarkan perubahan diet secara cepat. Glutathion peroksidase bekerja terutama dengan hidroperoksida organik, misalnya zat yang dihasilkan selama peroksidasi lemak di membran. Apabila disulfida telah terbentuk, disulfida di reduksi kembali menjadi bentuk sulfidril oleh glutathion reduktase. Glutathion reduktase memerlukan elektron dari NADPH, yang biasanya dihasilkan dari jalur pentosa fosfat.<sup>46-47</sup>



**Gambar 8. Grafik korelasi kadar GPx dan Selenium (Se)<sup>47</sup>**

#### 2.4. Likopen

Dihipotesiskan bahwa karotenoid dapat mencegah atau memperlambat perkembangan kanker dan penyakit degeneratif dengan bekerja sebagai antioksidan pemutus rantai.<sup>48</sup> Karotenoid adalah sekelompok senyawa yang strukturnya berkaitan dengan  $\beta$ -karoten, suatu prekursor vitamin A. Walaupun sebagian besar  $\beta$ -karoten diubah menjadi vitamin A di sel mukosa usus, karotenoid juga di serap dan beredar di dalam darah (terikat ke lipoprotein). Karotenoid melindungi dari peroksidasi dengan bereaksi terhadap radikal hidroperoksil lemak.<sup>49-50</sup>

**Tabel 2. Kandungan Likopen Dalam Beberapa Buah Dan Sayur**

Bahan Makanan	Jumlah ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )
Tomat segar	3000 – 3100
Tomat rebus	9700
Jus Tomat	8600 – 9300
Saos Tomat	9900 – 17000
Semangka	4100 – 4900
Anggur merah	1500 – 3400
Jambu biji	5400

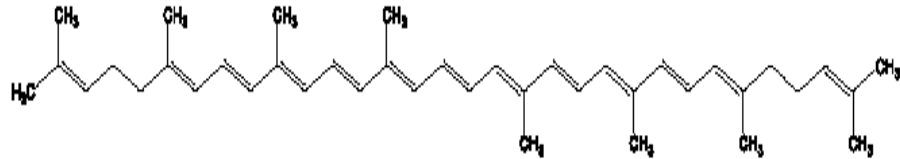
Modifikasi dari : Reesannen. T<sup>51</sup>

Likopen merupakan karotenoid utama yang terdapat didalam tomat, selain terdapat juga pada buah yang lain, seperti semangka dan jambu biji. Kandungan likopen dalam beberapa buah dan sayur bisa di lihat pada Tabel 2. Likopen juga merupakan karotenoid utama di dalam serum dan jaringan tubuh manusia. Tidak seperti karotenoid lain, likopen tidak mempunyai aktifitas provitamin A. Selain itu likopen mempunyai aktifitas sebagai antioksidan dan sebagai imunomodulator bagi tubuh. Likopen sebagai antioksidan mempunyai kemampuan untuk melawan kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas di dalam aliran darah dengan mengurangi efek toksik dari spesies oksigen reaktif (ROS), sehingga diasosiasikan dengan penurunan resiko terjadinya berbagai macam penyakit, seperti kanker, penyakit



kardiovaskuler, penyakit neurodegeneratif dan *aging*. Penurunan resiko terhadap berbagai macam penyakit tersebut juga menimbulkan dugaan adanya peranan likopen di dalam sistem imun, yaitu sebagai suatu immunomodulator.<sup>52-55</sup>

Likopen



**Gambar 9. Struktur Kimia Likopen**<sup>53</sup>

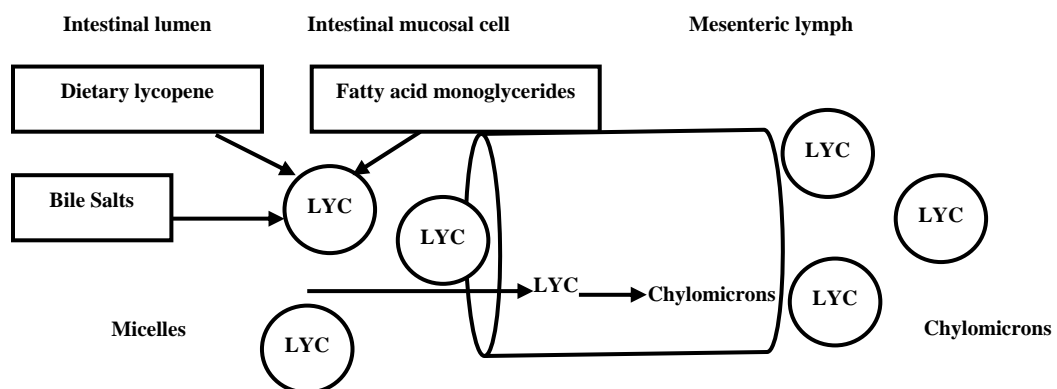
Likopen terdiri dari 40 karbon tak siklik/rantai terbuka dan mempunyai beberapa bentuk isomer *in vivo* (Gambar 9). Produk-produk olahan tomat mengandung 79-91% dari likopen total dalam bentuk *all-trans* likopen, di jaringan >50% likopen total dalam bentuk isomer *cis* likopen. Diduga, perubahan ini terjadi selama proses pemasakan dan ketika likopen berada pada pH lambung yang rendah. Bentuk *cis* likopen justru lebih mudah diabsorpsi dan memiliki bioavailabilitas yang lebih tinggi.<sup>56-57</sup>

#### **2.4.1 Pencernaan, Absorpsi dan Metabolisme**

Likopen sama sekali tidak diproduksi oleh tubuh, melainkan hanya didapatkan dari diet. Bioavailabilitas likopen, yang berasal dari berbagai sumber seperti tomat, semangka, dan jambu biji, dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti proses pengolahan makanan, pemasakan dan komponen-komponen lainnya yang ada di dalam makanan seperti lemak dan serat, juga faktor-faktor fisiologik dan genetik yang mengontrol proses pencernaan dan absorpsi.<sup>58</sup> Proses pemasakan biasanya membuat bioavailabilitas likopen bertambah, karena terjadi perubahan kimiawi akibat perubahan temperatur ketika mengalami pemrosesan, kemudian likopen terlepas dari matriksnya

dan menjadi fase lipid dari makanan. Hal ini menyebabkan tubuh dapat mengabsorpsi likopen dengan lebih mudah.<sup>59</sup>

Penyerapan likopen ke sel mukosa intestinal dibantu dengan pembentukan miselle-miselle asam empedu. Karena produksi empedu di rangsang oleh diet lemak, absorpsi likopen juga dipengaruhi oleh diet yang mengandung lemak. Data dari beberapa penelitian pada manusia di India menyatakan bahwa dibutuhkan minimum 5-10 gram lemak untuk di absorpsi dari makanan. Secara umum, kandungan lemak sebanyak 40% dari kalori seperti diet di Amerika, sudah cukup untuk absorpsi likopen secara optimal.<sup>60</sup> Beberapa faktor seperti serat-serat tertentu, zat pengganti lemak, sterol nabati, dan obat-obatan penurun kolesterol, dapat menurunkan efisiensi penggabungan likopen menjadi miselle, karena likopen diabsorpsi dalam bentuk tersebut. Penyerapan likopen oleh membran *brush border* dari sel mukosa intestinal berlangsung secara difusi pasif. Belum jelas apakah likopen ditransportasikan intraselluler oleh suatu protein spesifik atau bermigrasi di dalam butir-butir lipid.<sup>61-62</sup>



**Gambar 10. Absorpsi Likopen**<sup>55</sup>

Likopen keluar dari sel mukosa dalam bentuk kilomikron, disekresikan lewat sistem lymphe mesentrik masuk ke dalam darah. Dengan bantuan enzim lipase

lipoprotein pada kilomikron, likopen dan karotenoid masuk ke jaringan secara pasif, seperti kelenjar adrenal, ginjal, jaringan adipose, limpa, paru-paru, dan organ-organ reproduksi, sebelum kelebihan kilomikron dibersihkan di dalam hati lewat reseptor kilomikron (Gambar 10).<sup>53,55</sup> Karotenoid dapat terakumulasi di hati atau mengalami *repackage* menjadi *very low density lipoprotein* (VLDL) dan masuk kembali ke dalam darah. Pengambilan karotenoid masuk ke jaringan dari VLDL dan LDL, diduga terjadi lewat reseptor LDL, sehingga jaringan yang mempunyai konsentrasi karotenoid tertinggi (hati, adrenal, testis) cenderung mempunyai aktifitas reseptor LDL yang tinggi. Likopen adalah karotenoid utama di hati, adrenal, testis, prostat manusia.<sup>63-64</sup> Di dalam tubuh, likopen di simpan di hati, paru, kelenjar prostat, kolon dan kulit (Tabel 3). Konsentrasi di dalam jaringan cenderung lebih tinggi di banding semua karotenoid yang lain.<sup>53,65</sup>

**Tabel 3. Rerata dan Simpang Baku (SB) Likopen Pada Manusia dan Tikus**

Jaringan	Kadar dan Simpang Baku (SB) dalam nmol/g/BB	
	Manusia	Tikus
Testis	4,34 – 21,36	NA
Kelenjar Adrenal	1,90 – 21,60	NA
Hati	1,28 – 5,72	20,30 (1,90)
Kelenjar Prostat	0,80	0,32 (0,06)
Payudara	0,78	NA
Pankreas	0,70	NA
Paru-paru	0,22 – 0,57	0,115 (0,015)
Jantung	NA	0,08 (0,03)
Ginjal	0,15 – 0,62	NA
Usus	0,31	0,046 (0,006)
Kulit	0,42	NA
Ovariun	0,30	NA
Otak	ND	0,017 (0,006)

Ket : NA : *Not available*, ND : *Not detectable*. Modifikasi dari : Reesannen. T<sup>51</sup>

#### 2.4.2. Likopen, Status Antioksidan Dan Radikal Bebas

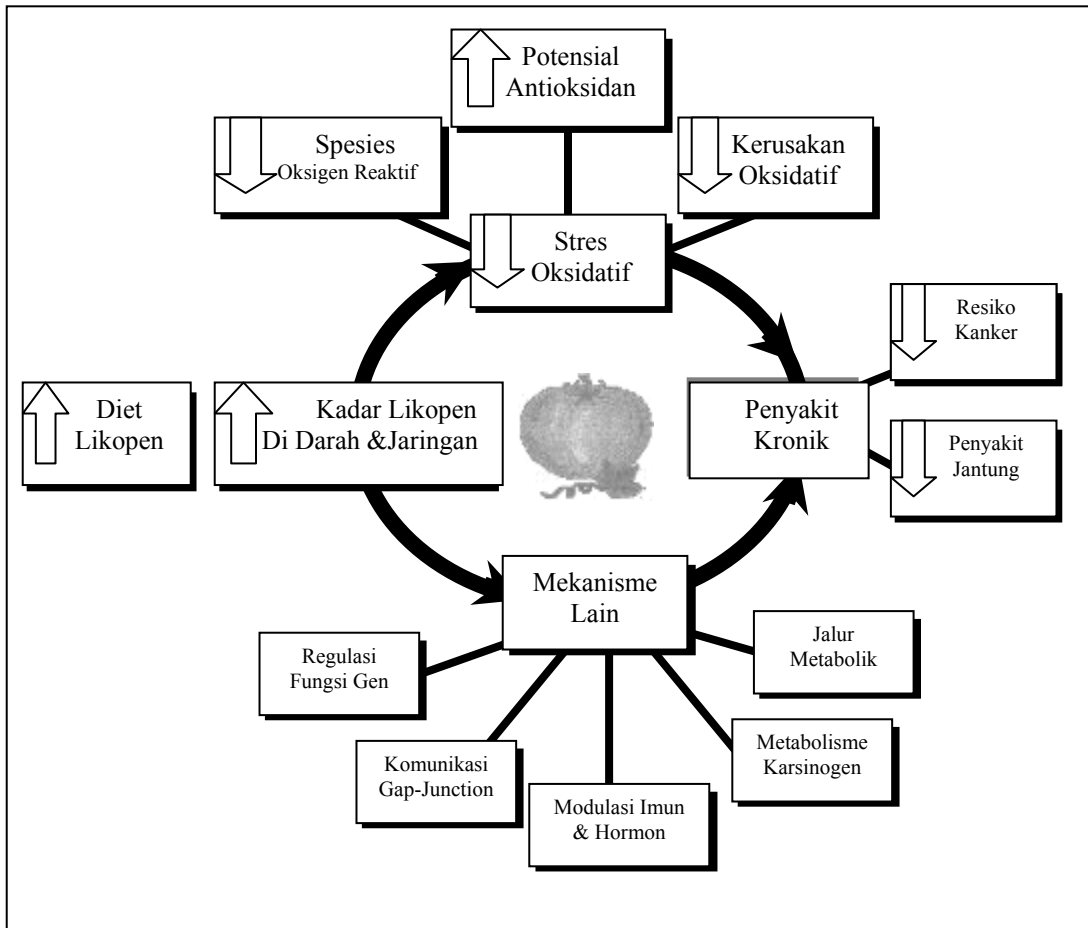
Likopen memiliki kemampuan untuk melindungi kerusakan sel oleh radikal bebas. Pada penelitian populasi secara *in vitro*, sebagai antioksidan melindungi DNA

dari kerusakan oksidatif, menonaktifkan hidrogen peroksidase dan nitrogen dioxide, serta melindungi limfosit dari nitrogen oxide (NO) yang merusak membran dan terjadinya kematian sel dua kali lebih efisien di banding  $\beta$ -karoten .<sup>66-69</sup>

Pada subyek manusia sehat, diet tanpa likopen atau tomat akan menyebabkan kehilangan likopen dan menambah lipid oksidasi. Akan tetapi kadar likopen di darah atau jaringan tidak berkorelasi langsung dengan keseluruhan buah dan sayur yang dimakan. Kadar likopen di plasma dipengaruhi oleh beberapa faktor biologis dan gaya hidup.<sup>55</sup> EURAMIC (*European Community Multicenter Studi on Antioxidant, MI and Breast Cancer*) melakukan penelitian untuk mengevaluasi hubungan antara status antioksidan ( $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten,  $\alpha$ -tokoferol, likopen) dan MI (*myocardial infarction*) akut. Ada hubungan signifikan antara status likopen dan MI, dihubungkan dengan tingginya cadangan lemak tak jenuh ganda (PUFA) sehingga dapat mendukung teori dari antioksidan. Kadar likopen rendah ternyata dapat meningkatkan resiko dan mortalitas akibat penyakit tersebut.<sup>69</sup> Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa ada keterkaitan antara status antioksidan satu dan lain. Status antioksidan di dalam tubuh yang baik akan mempengaruhi diet yang mengandung senyawa antioksidan. Manfaat dari antioksidan dan mekanisme kerja dari antioksidan juga sudah di teliti, akan tetapi perlu dikembangkan metode untuk mengetahui keamanan penggunaan antioksidan dari luar tubuh untuk pencegahan penyakit.<sup>51,55,70</sup>

Pemberian likopen kemungkinan dapat meningkatkan status likopen di dalam tubuh dengan meningkatkan kemampuan seluruh antioksidan dan mengurangi kerusakan oksidatif pada lipid, protein dan DNA, sehingga mengurangi resiko terjadinya penyakit kanker dan kardiovaskuler.<sup>71-72</sup> Peningkatan status likopen didalam tubuh juga meregulasi fungsi gen, meningkatkan komunikasi intersel,

merangsang hormon dan respon imun atau metabolisme regulasi yang dapat menurunkan resiko terjadinya penyakit kronik. Peranan likopen untuk mencegah terjadinya penyakit, juga dipengaruhi dengan kondisi tubuh, terutama status antioksidan dalam tubuh. Mekanisme yang ada tersebut oleh Agarwal S, et al di kelompokkan dalam mekanisme oksidatif dan non oksidatif (Gambar 11).<sup>55</sup>



**Gambar 11. Mekanisme Peranan Likopen Dalam Mencegah Penyakit Kronis<sup>66</sup>**

Mekanisme pertahanan tubuh di plasma oleh vitamin antioksidan, vitamin C dan GPx yang merupakan antioksidan enzimatik di plasma, kedua antioksidan tersebut saling berkaitan satu sama lain dalam proses redoks. Sedangkan vitamin E tereduksi akan dinetralsisir oleh antioksidan larut lemak lain, diantaranya likopen. Vitamin E

dapat kembali berfungsi sebagai antioksidan dengan bantuan vitamin C. GPx dan vitamin E bekerjasama melalui mekanisme gugus yang terikat dengan Se. Jaringan kerjasama antar antioksidan (*antioxidant network*), terjadi antara semua antoksidan melalui mekanisme masing-masing.<sup>2,45</sup>

Upritcard et al (2000), mengadakan penelitian pada 57 pasien berusia kurang dari 75 tahun, menderita DM tipe 2 dengan pemberian gelatin, jus tomat, vitamin C dan vitamin E. Hasil studi tersebut menyebutkan bahwa pemberian jus tomat menaikkan kadar plasma likopen dan efektif menghambat oksidasi LDL. Selain itu pemberian vitamin E dosis tinggi menaikkan kadar plasma CRP, sebagai salah satu faktor resiko MI pada pasien DM.<sup>73</sup>

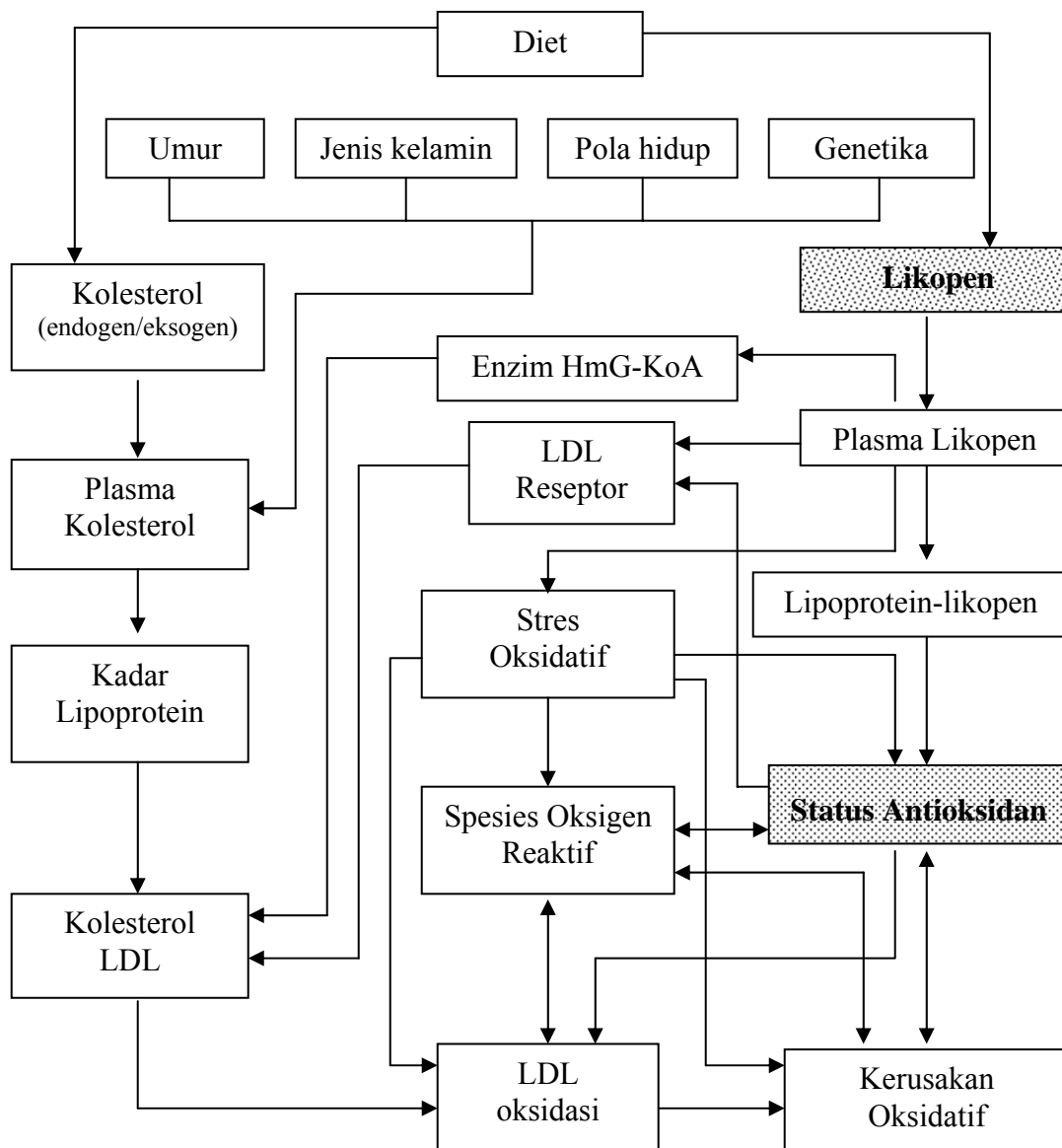
Pemberian antioksidan pada lesi aterosklerotik akan menghambat oksidasi kolesterol LDL dan mencegah stres oksidatif sehingga mengurangi timbulnya disfungsi endotel.<sup>11,74</sup>  $\beta$ -karoten merupakan bentuk paling aktif secara biologis dan sumber utamanya adalah dari sayur dan buah. Pada beberapa penelitian  $\beta$ -karoten merupakan salah satu karotenoid yang berperan dalam perlindungan terhadap stres oksidatif.<sup>75</sup> Oksidasi LDL yang terjadi karena stres oksidatif tergantung dari kandungan antioksidan sebelum terbentuk sejumlah hidroperoksida lipid. Bila senyawa antioksidan lipofilik yang terkandung dalam LDL cukup banyak, maka LDL akan terlindungi dari proses oksidasi.<sup>4,11,55</sup>

## **BAB III**

### **KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS**

#### **3.1. Kerangka Teori**

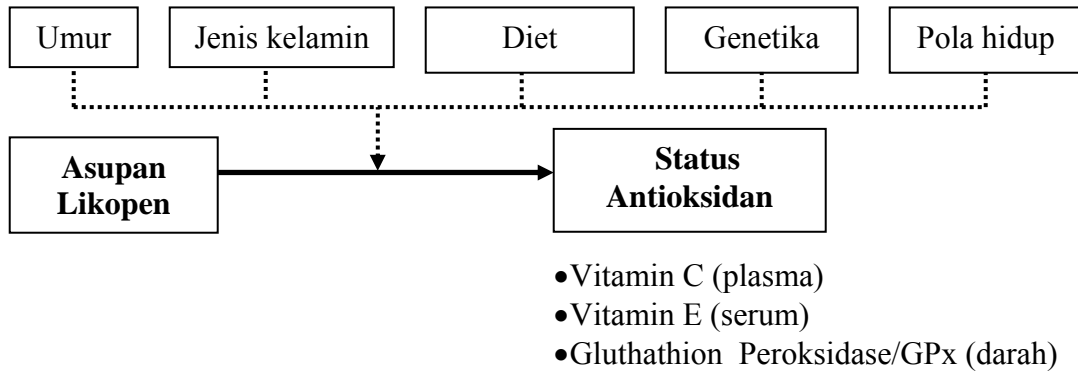
Berdasarkan teori dari pustaka, diketahui mekanisme pengaruh pemberian likopen terhadap status antioksidan tubuh pada keadaan hiperkolesterolemi. Sehingga dapat disusun suatu kerangka teori sebagai berikut:



### 3.2. Kerangka Konsep

Likopen sebagai salah satu antioksidan potensial dapat menurunkan stres oksidatif dengan memberikan pertahanan terhadap radikal bebas, spesies oksigen reaktif (ROS), meningkatkan kemampuan antioksidan dan mencegah terjadinya

kerusakan oksidatif. Mekanisme tersebut mempengaruhi status antioksidan tubuh, termasuk vitamin C, vitamin E dan GPx. Pada penelitian ini umur, jenis kelamin dan genetika disamakan, pola hidup dan dietetik tikus dikendalikan dengan perlakuan yang sama. Berdasarkan kerangka teori, disusun kerangka konsep sebagai berikut:



**Keterangan :**

- : Variabel yang diteliti
- .....→ : Variabel yang dikendalikan

**3.3. Hipotesis**

Berdasarkan uraian latar belakang dan tinjauan pustaka, hipotesis yang diajukan adalah:

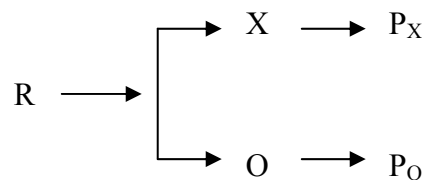
- a. Makin tinggi dosis likopen, makin tinggi kadar vitamin C dan vitamin E tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik.
- b. Makin tinggi dosis likopen, makin rendah kadar gluthathion peroksidase tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik.

**BAB IV  
METODE PENELITIAN**

**4.1. Rancangan Penelitian**



Penelitian ini adalah penelitian eksperimental (*true experiment designs*) dengan rancangan *post test only control group design*, menggunakan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dengan randomisasi sederhana.<sup>76-81</sup> Hewan percobaan, tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) di bagi secara acak menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Tikus diberi pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK) sehingga menjadi tikus hiperkolesterolemik, dilanjutkan pemberian perlakuan likopen. Keluaran (outcome) adalah status antioksidan, yaitu kadar vitamin C, vitamin E dan GPx.



Keterangan :

- R : Randomisasi.
- P : Populasi.
- X : Eksperimen (perlakuan).
- O : Tanpa eksperimen (kontrol).

**4.2. Populasi dan Sampel**

**4.2.1. Populasi**

Populasi (hewan percobaan) adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) yang berasal dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) UGM.

**4.2.2. Sampel**

Penentuan besar sampel ditentukan dengan rumus Federer<sup>82</sup>, sebagai berikut:

$$(n-1) (t-1) \geq 15 \text{ (n = besar sampel, t = besar kelompok sampel)}$$

Dari perhitungan diperoleh besar sampel tiap kelompok perlakuan minimal 6 ekor. Sehingga jumlah sampel yang digunakan minimal 24 ekor. Penelitian ini dilakukan pada 4 kelompok perlakuan, tiap kelompok perlakuan terdiri dari 7 ekor, sehingga didapatkan total sampel sejumlah 28 ekor.

#### **4.3. Kriteria Inklusi**

1. Kondisi sehat.
2. Tidak ada kelainan anatomis.
3. Berat badan tikus normal 180-200 gram pada umur 12 minggu.
4. Kadar kolesterol < 120 mg/dl.

#### **4.4. Kriteria Eksklusi**

1. Tikus mengalami penurunan berat badan.
2. Tikus mengalami diare.
3. Tikus mati pada saat penelitian berlangsung.

#### **4.5. Variabel Penelitian**

##### **4.5.1. Klasifikasi Variabel**

Variabel bebas : pemberian likopen dosis 0,36 mg/hari; 0,72 mg/hari dan 1,08 mg/hari, skala rasio.

Variabel tergantung : status antioksidan meliputi kadar vitamin C, vitamin E, glutathion peroksidase (GPx), skala rasio.

##### **4.5.2. Definisi Operasional Variabel**

Pemberian likopen adalah pemberian hasil ekstrak buah tomat (*Lycopersicon esculentum*) lokal varietas *Braight Pearl F1*, yang didapat dengan teknik ekstrak TLC (*Thin Layer Chromatograph*), berbentuk serbuk murni.<sup>83-85</sup> Variasi pemberian likopen pada kelompok kontrol dan perlakuan adalah 0,36 mg/ekor/hari, 0,72

mg/ekor/hari, dan 1,08 mg/ekor/hari hasil konversi dari dosis pada manusia. Pelarutan dengan minyak zaitun (*olive oil*) diberikan melalui sonde lambung.

Tikus hiperkolesterolemik adalah tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) berumur 12 minggu dengan kadar kolesterol total > 120 mg/dl.<sup>86</sup> Abnormalitas diukur berdasarkan kadar kolesterol total dalam serum tikus setelah di beri pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol (TLTK). Pakan standar PAR-G BR II dan pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol (TLTK) didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) UGM.

Status antioksidan adalah hasil perhitungan kadar vitamin C dengan satuan mg/100 ml di ukur secara enzimatik dengan spektrofotometer.<sup>87</sup> Status vitamin C diukur berdasarkan kadar vitamin C di plasma, tinggi rendah kadar menentukan aktifitasnya sebagai antioksidan. Apabila terjadi peningkatan kadar vitamin C berarti terjadi peningkatan status antioksidan. Vitamin E dengan satuan µg/ml di ukur secara enzimatik dengan spektrofotometer.<sup>88</sup> Status vitamin E diukur berdasarkan kadar vitamin E di serum, tinggi rendah kadar menentukan aktifitasnya sebagai antioksidan. Semakin tinggi kadar vitamin E, semakin baik status antioksidannya. Gluthathion peroksidase (GPx), dengan satuan UI/L di ukur secara enzimatik dengan spektrofotometer.<sup>47,89</sup> Status gluthathion peroksidase diukur berdasarkan kadar gluthathion peroksidase di darah (*whole blood*), tinggi rendah kadar menentukan aktifitasnya sebagai antioksidan. Semakin tinggi kadar gluthathion peroksidase berarti aktifitasnya sebagai antioksidan endogen semakin meningkat. Sebaliknya apabila terjadi penurunan kadar berarti terjadi penurunan aktifitas. Penurunan kadar gluthathion peroksidase berarti statusnya sebagai antioksidan menjadi lebih baik,

karena fungsi sebagai antioksidan digantikan oleh antioksidan eksogen, diantaranya likopen, vitamin C dan vitamin E.<sup>2,7,8,47</sup>

#### **4.6. Alat dan Bahan**

##### **4.6.1. Alat**

1. Kandang tikus individual beserta perlengkapannya.
2. Timbangan hewan percobaan OHAUS dan timbangan analitik.
3. Sonde lambung.
4. Alat untuk ekstraksi likopen: *Juicer*, sentrifuse, tabung reaksi, tabung endrof, *ice bath*, alat-alat gelas biasa, botol steril.
5. Alat untuk pemeriksaan vitamin C, vitamin E, glutathion peroksidase: Spektrofotometer Coleman dengan perlengkapannya, sentrifuse, pipet, tabung reaksi, tabung endrof, *ice bath*, alat-alat gelas biasa.

##### **4.6.2. Bahan**

1. Tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) berumur 12 minggu, berat 180-200 gr atau memenuhi kriteria inklusi.
2. Pakan tikus standar PAR-G BR II, pakan TLTK (pakan standar ditambah dengan minyak babi 10% dan kristal kolesterol dari Merck 10 gr/kg pakan) serta air minum.
3. Bahan untuk ekstraksi likopen: buah tomat lokal varietas *Braight Pearl F*, hexane, ethanol, acetone, etyl acetate, petroleum eter, TLC kiesel gel.
4. Bahan untuk pemeriksaan vitamin C, vitamin E, glutathion peroksidase: Sampel plasma, serum dan darah (*whole blood*), akuades bebas mineral, HPO<sub>3</sub> 3%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,5M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12M, reagensia 2,4 dinitrofenil hidrazin, larutan tioruea 5%, CuSO<sub>4</sub> 0,6%, DTCS, heksan dan ethanol yang telah di destilasi,

vitamin C dan vitamin E standar, vitamin standar kerja, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sodium phosphat buffer, EDTA, GSH, Na-azide, larutan asam metaphosphorik.

#### **4.7. Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1. Persiapan Hewan Percobaan.**

Hewan percobaan di pelihara dengan kandang individual, dibersihkan setiap hari. Temperatur suhu 28-32<sup>0</sup>C dan ada sirkulasi udara serta cahaya yang cukup. Penelitian diawali dengan mempersiapkan tikus jantan (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) usia 12 minggu, sejumlah 28 ekor yang diadaptasi selama 7 hari dengan pemberian pakan standar PAR-G BR II. Berat badan dan kadar kolesterol di timbang sebagai data dasar. Kemudian dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 7 ekor. Selanjutnya selama 14 hari diberikan pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol (TLTK). Kemudian sejumlah 28 ekor tikus ditimbang dan diukur kadar kolesterolnya (> 120 mg/dl), dilanjutkan pemberian likopen dan pemberian pakan TLTK selama 14 hari. Berat badan, kadar kolesterol dan plasma likopen serta status antioksidan (vitamin C, vitamin E dan GPx) di ukur sebagai data sesudah perlakuan. Pemberian likopen dan kolesterol dengan cara sonde lambung, pemberian pakan standar PAR-G BR II, pakan tinggi lemak dan minum *ad libitum*.<sup>30,90</sup>

##### **4.7.2. Perhitungan Dosis.**

Perhitungan berdasarkan dosis yang biasa dilakukan penelitian sebelumnya pada manusia yaitu 40 mg/hari.<sup>17-18,38,41</sup> Selanjutnya dosis tersebut di pakai sebagai nilai tengah perlakuan, sehingga didapatkan dosis untuk perlakuan lainnya adalah 20 mg/hari dan 60 mg/hari. Pemberian dosis likopen pada tikus dengan menggunakan tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan percobaan untuk konversi dosis,

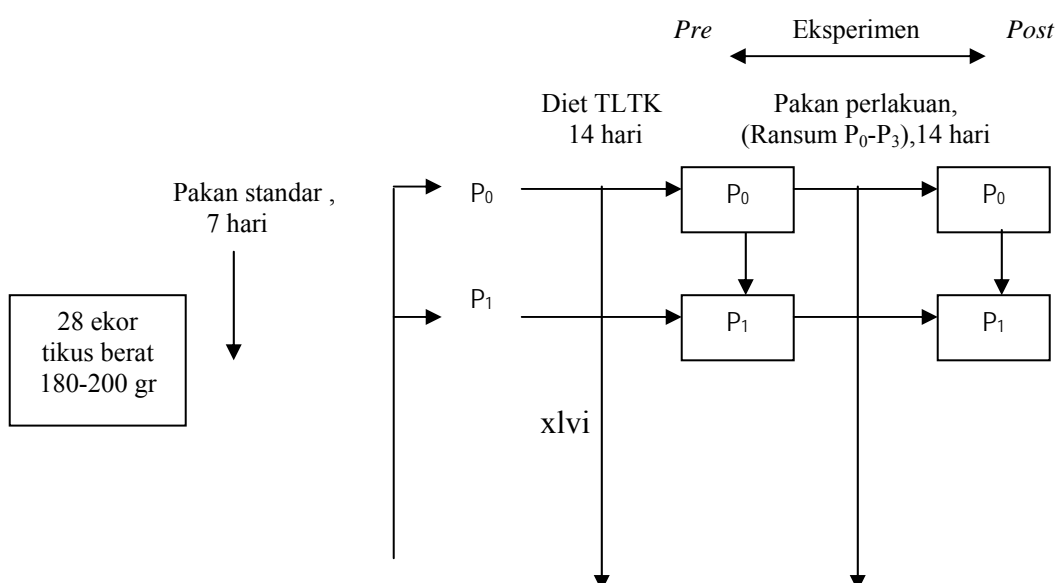
dosis tikus=0,018 dosis manusia.<sup>25</sup> Variasi dosis likopen: P<sub>0</sub> (kontrol)= tanpa likopen; P<sub>1</sub>=0,36 mg/ekor/hari; P<sub>2</sub>=0,72 mg/ekor/hari; P<sub>3</sub>=1,08 mg/ekor/hari, diberikan selama 14 hari.

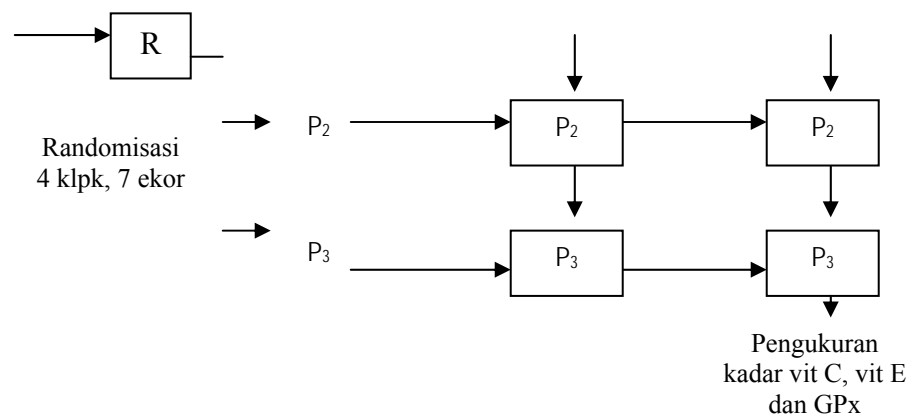
#### 4.7.3. Persiapan Pakan.

Pakan standar menggunakan pakan standar berdasarkan diet untuk rodentia dari PAR-G BR II. Ransum pakan standar adalah makanan bagi semua tikus selama penelitian. Pakan standar diberikan selama 7 hari adaptasi hewan percobaan. Pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol (TLTK) terdiri dari bahan penyusun yang sama dengan pakan standar di tambah minyak babi 10%, dalam bentuk pelet berlemak. Pemberian kristal kolesterol 10 gr/kg BB diencerkan sesuai perhitungan dengan cara sonde lambung 0,35 ml per hari. Pakan TLTK diberikan selama 14 hari, dilanjutkan pemberian bersama dengan pakan perlakuan 14 hari (lampiran 1, point 4).

Pakan perlakuan di buat dari buah tomat lokal di ekstrak dengan metode TLC (*Thin Layer Chromatograph*) dalam bentuk serbuk, kemudian diberikan secara sonde lambung dengan minyak zaitun (*olive oil*). Pemberian pakan perlakuan sebanyak 0,65 ml per hari selama 14 hari (lampiran 1, point 3).

#### 4.8. Alur Kerja Penelitian





**Gambar 12. Diagram Alur Penelitian**

**Keterangan pakan perlakuan:**

Ransum P<sub>0</sub> = Pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol, tanpa pemberian likopen.

Ransum P<sub>1</sub> = Pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol, pemberian likopen 0,36 mg/hari.

Ransum P<sub>2</sub> = Pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol, pemberian likopen 0,72 mg/hari.

Ransum P<sub>3</sub> = Pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol, pemberian likopen 1,08 mg/hari.

**4.9. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini berlangsung selama bulan April – Juli 2005. Penyediaan hewan, pakan dan pemeliharaan hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) UGM, sedangkan ekstraksi likopen dan pemeriksaan status antioksidan (kadar vitamin C, vitamin E dan GPx) dilakukan di PAU Pangan dan Gizi UGM.

**4.10. Analisis Data**

Pada akhir penelitian dilakukan analisis data secara kuantitatif meliputi analisis statistik deskriptif dan analisis statistik inferensial. Data yang ada di sunting, ditabulasikan, dibersihkan (*cleaning*), kemudian di analisis. Analisis deskriptif disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian dilanjutkan dengan uji

normalitas *Shapiro Wilk* ( $n < 50$ ). Distribusi data normal, sehingga menggunakan uji statistik parametrik. Uji beda dalam kelompok perlakuan dengan *Anova*, dilanjutkan dengan analisis antar kelompok perlakuan dengan *LSD*, dengan tingkat kepercayaan 5%. Analisis menggunakan fasilitas pengolah dan penyaji data *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 12 for Windows*<sup>91-93</sup>

## **BAB V HASIL PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian payung dengan penelitian lain mengenai pengaruh variasi dosis likopen terhadap profil lipid, lipid terperoksidasi, jumlah sel busa dan ketebalan aorta abdominalis tikus (*Rattus norvegicus galur*



*Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik. Penelitian dilakukan selama bulan April–Juli 2005 di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Terpadu-Layanan Penelitian Pra Klinik Pengembangan Hewan Percobaan (LPPT-LP3HP) UGM dan di PAU Pangan dan Gizi UGM. Sampel penelitian sejumlah 28 ekor tikus memenuhi kriteria yang telah ditentukan sampai akhir penelitian.

### **5.1. Gambaran Umum Tikus Percobaan**

Berat badan tikus secara keseluruhan memenuhi kriteria inklusi (berat badan rerata 180-200 gram), dengan nilai rerata 185,7 gram. Kadar kolesterol dasar (tikus normal) dengan nilai rerata 111,44 mg/dl. Pemberian ransum pakan tinggi lemak, tinggi kolesterol (TLTK) berhasil meningkatkan kadar kolesterol serum darah sampai kriteria inklusi (>120 mg/dl), dengan nilai rerata 221,7 mg/dl (sebelum pemberian likopen). Setelah pemberian likopen terjadi penurunan rerata kadar kolesterol menjadi 151,8 mg/dl. Dua puluh delapan ekor tikus percobaan sebelum dan sesudah pemberian likopen mengkonsumsi makanan dengan jumlah yang sama (isokalori), dapat di lihat pada lampiran 4.

Peningkatan kadar likopen plasma terjadi pada sebagian besar kelompok perlakuan (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>) dari 53 UI/L menjadi 66 UI/L, 75 UI/L dan 96 UI/L, kecuali pada kelompok P<sub>0</sub> (kelompok kontrol) terlihat sedikit penurunan (53 UI/L menjadi 52 UI/L). Pada P<sub>3</sub> terdapat kenaikan kadar plasma likopen hampir dua kali lipat di banding kontrol. Semakin banyak dosis likopen yang diberikan semakin tinggi kadar likopen di plasma.

### **5.2. Kadar Vitamin C, Vitamin E dan Gluthathion Peroksidase**

Hasil penelitian mengenai status antioksidan berupa hasil pengukuran kadar vitamin C, vitamin E dan glutathion peroksidase yang di ukur secara enzimatik dideskripsikan dan dimasukkan dalam Tabel 4 serta dibuat gambar grafik *box plot*.

**Tabel 4. Nilai rerata dan simpang baku kadar vitamin C, E dan GPx**

Kelompok/ n			Kadar Vitamin C (mg/100 ml)	Kadar Vitamin E (µg/ml)	Kadar GPx (UI/L)
P <sub>0</sub>	7	Rerata	0,52	7,45	93,97
		SB	0,08	0,48	1,52
P <sub>1</sub>	7	Rerata	0,80	12,44	80,76
		SB	0,07	0,32	1,82
P <sub>2</sub>	7	Rerata	1,15	16,15	54,92
		SB	0,69	0,32	1,51
P <sub>3</sub>	7	Rerata	1,45	19,40	31,73
		SB	0,72	0,32	1,52
Σ	28	Rerata	0,98	13,86	65,35
		SB	0,37	4,542	24,44
<i>p</i>			0,00**	0,00**	0,00**

\*\* *Anova*, sangat bermakna.

Hasil uji *post hoc LSD* mengenai beda antar dua kelompok perlakuan pada kadar vitamin C, vitamin E dan glutathion peroksidase dapat di lihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Uji beda kadar vitamin C, E dan GPx antar dua kelompok perlakuan**

Kelompok	Kadar Vitamin C ( <i>p</i> )	Kadar Vitamin E ( <i>p</i> )	Kadar GPx ( <i>p</i> )
P <sub>0</sub> -P <sub>1</sub>	0,00**	0,00**	0,00**
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	0,00**	0,00**	0,00**
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	0,00**	0,00**	0,00**
P <sub>0</sub> -P <sub>2</sub>	0,00**	0,00**	0,00**
P <sub>0</sub> -P <sub>3</sub>	0,00**	0,00**	0,00**
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	0,00**	0,00**	0,00**

\*\* *LSD*, sangat bermakna.

Data Tabel 4 menunjukkan bahwa rerata kadar vitamin C pada kelompok perlakuan (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> dan P<sub>3</sub>) lebih tinggi dibanding rerata kadar vitamin C pada kelompok kontrol (P<sub>0</sub>). Hasil uji *Anova* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara empat kelompok perlakuan dengan  $p=0,00$ . Uji statistik *post hoc LSD*

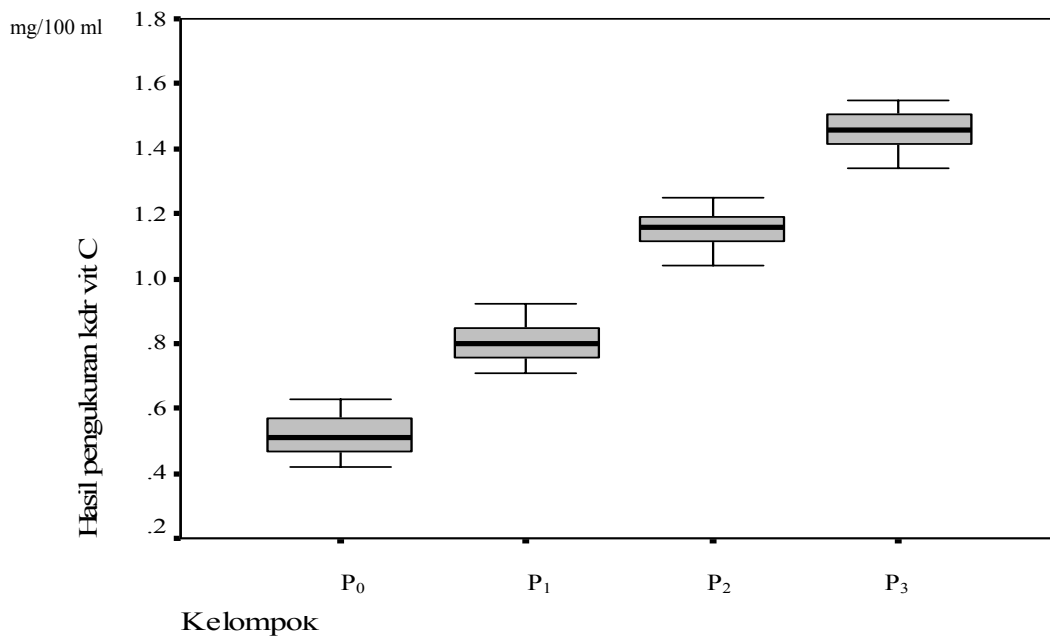
menunjukkan bahwa uji beda antar dua kelompok pada semua perlakuan juga ada perbedaan yang signifikan dengan  $p=0,00$  (Tabel 5).

Rerata kadar vitamin E pada kelompok perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$  dan  $P_3$ ) lebih tinggi dibanding rerata kadar vitamin C pada kelompok kontrol ( $P_0$ ) seperti terlihat pada Tabel 4. Hasil uji *Anova* pada Tabel 5 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara empat kelompok perlakuan dengan  $p=0,00$ . Uji statistik *post hoc* *LSD* menunjukkan bahwa uji beda antar dua kelompok pada semua perlakuan juga ada perbedaan yang signifikan dengan  $p=0,00$ .

Data Tabel 4 menunjukkan bahwa rerata kadar glutathion peroksidase terjadi sebaliknya, pada kelompok kontrol ( $P_0$ ) rerata kadar glutathion peroksidase lebih tinggi dibanding rerata kadar glutathion peroksidase kelompok perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$  dan  $P_3$ ). Hasil uji *Anova* pada Tabel 5 didapatkan hasil bahwa ada perbedaan yang signifikan antara empat kelompok perlakuan dengan  $p=0,00$ . Uji statistik *post hoc* *LSD* menunjukkan bahwa uji beda antar dua kelompok pada semua perlakuan juga ada perbedaan yang signifikan dengan  $p=0,00$ .

#### **Kadar Vitamin C dan Variasi Dosis Likopen**

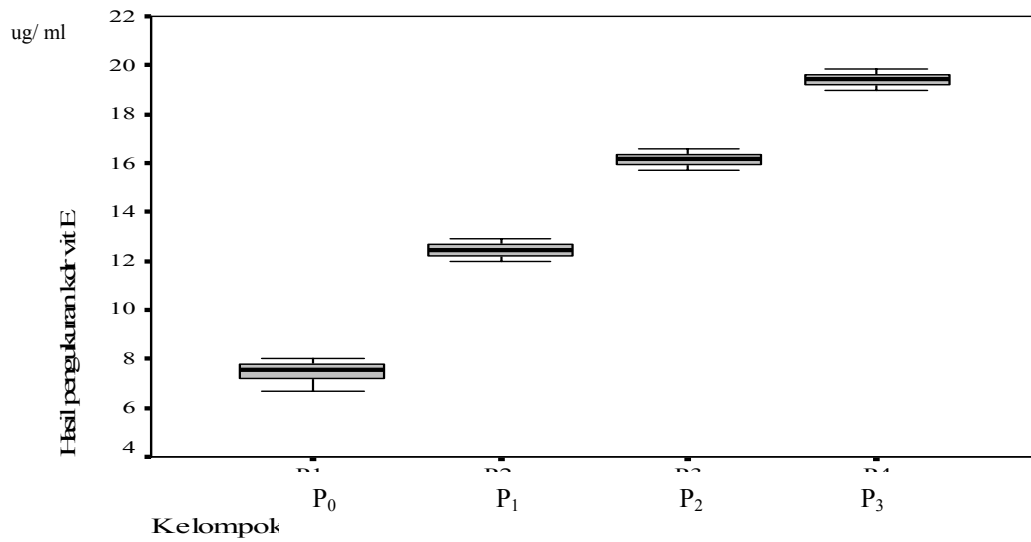
*Boxplot* pada Gambar 13 menunjukkan bahwa median vitamin C pada kelompok perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$  dan  $P_3$ ) lebih tinggi dibanding median vitamin C pada kelompok kontrol ( $P_0$ ).



**Gambar 13. Boxplot Hasil Pengukuran Kadar Vitamin C.**

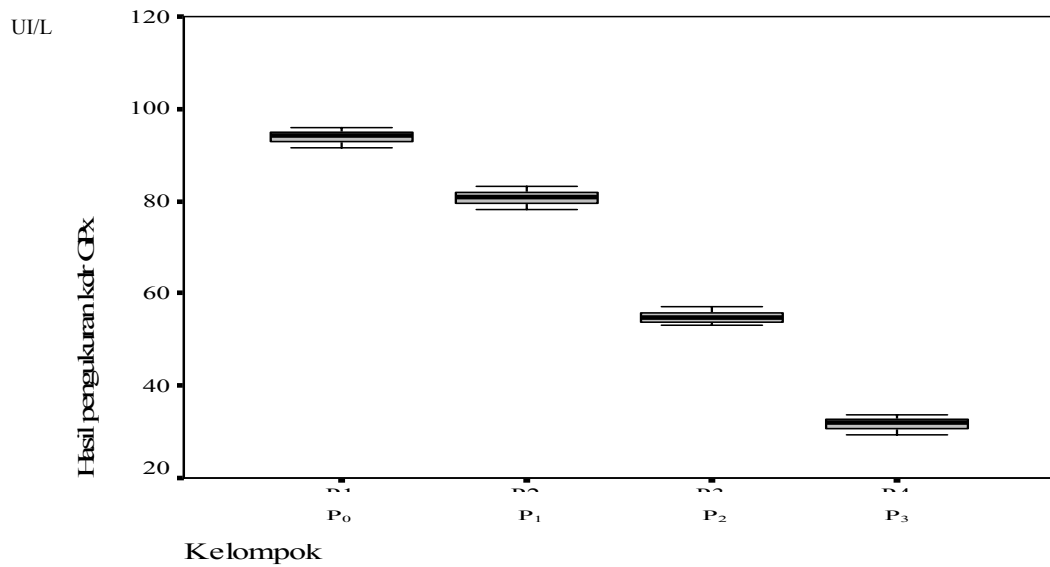
#### 5.4.2. Kadar vitamin E dan Variasi Dosis Likopen

Boxplot pada Gambar 14 menunjukkan bahwa median vitamin E pada kelompok perlakuan (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> dan P<sub>3</sub>) lebih tinggi dibanding median pada kelompok kontrol (P<sub>0</sub>).



**Gambar 14. Boxplot hasil pengukuran kadar vitamin E.**

### 5.4.3. Kadar Gluthathion Peroksidase (GPx) dan Variasi Dosis Likopen



**Gambar 15. Boxplot hasil pengukuran kadar GPx.**

*Boxplot* pada Gambar 15 menunjukkan bahwa median gluthathion peroksidase mengalami penurunan, dimana pada kelompok kontrol (P<sub>0</sub>) median gluthathion peroksidase tertinggi dibanding median kelompok perlakuan (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> dan P<sub>3</sub>).

## BAB VI

## PEMBAHASAN

### 6.1. Gambaran Umum Tikus Percobaan

Pada penelitian ini diet merupakan salah satu variabel yang dikontrol dan dibuat homogen sehingga diharapkan memberikan pengaruh seminimal mungkin selama penelitian. Pertumbuhan dan perkembangan yang baik dari hewan percobaan salah satunya ditandai dengan terjadinya kenaikan berat badan. Diasumsikan bahwa semua tikus percobaan memiliki pola dan kuantitas asupan makanan yang sama (isokalori). Sehingga tidak berpengaruh terhadap berat badan dan analisis kolesterol serum tidak terganggu.<sup>94</sup> Kolesterol makanan akan menaikkan kadar kolesterol total dalam serum. Pada penelitian dengan menggunakan hewan laboratorium, jika diberikan dalam kadar yang cukup tinggi dapat menaikkan kadar kolesterol total secara cepat<sup>31,86</sup>. Penelitian yang dilakukan oleh Shinnik, *et al* (1990) dengan menggunakan kolesterol kristal 1% di dalam diet 18 gr/ekor/hari selama 20 hari pada tikus SD, dapat mengubah kadar kolesterol tikus dari 85,8 mg/dl  $\pm$  12,9 menjadi 112,2 mg/dl  $\pm$  21,2.<sup>86</sup> Pemberian pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK) dalam bentuk lemak babi 10% dan kolesterol murni sebanyak 10 gr/kg pakan pada penelitian ini terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam waktu 14 hari.

Kadar kolesterol dalam serum darah dipengaruhi oleh asupan makanan (eksogen) dan sintesis kolesterol dalam tubuh (endogen). Sintesis kolesterol endogen akan menurun jika sudah terpenuhi oleh kolesterol eksogen. Mekanisme tersebut terjadi melalui penghambatan jalur biosintetik didalam hati karena berkurangnya produksi enzim HMG Ko A reduktase yang berfungsi sebagai enzim pembatas laju pada jalur biosintesis kolesterol. Kolesterol total dalam serum akan menurun dengan

meningkatnya kandungan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), sementara asam tak jenuh tunggal (asam oleat) dan asam lemak jenuh (stearat) tidak berpengaruh terhadap kadar kolesterol total. Pemakaian minyak zaitun (*olive oil*) sebagai bahan pelarut likopen merupakan salah satu variabel yang sudah dikendalikan dengan adanya kontrol yang diberi minyak zaitun (*olive oil*) saja sehingga tidak akan terjadi bias hasil penelitian pada kadar kolesterol.<sup>2,3,83</sup> Selain itu beberapa penelitian mengindikasikan bahwa pemakaian minyak zaitun (*olive oil*) untuk mempercepat proses absorpsi likopen ke dalam tubuh. Pada akhir penelitian diketahui terjadi penurunan yang signifikan terhadap kadar kolesterol total.

Fuhrman, *et al* (1997) penelitian *in vitro* memperlihatkan mekanisme likopen dalam memproteksi LDL native dari oksidasi dan menekan sintesis kolesterol. Apabila kemampuan proteksinya berkurang maka LDL native akan berkembang sampai menjadi LDL-oks, yang mempunyai karakteristik mengandung peroksida lipid dan produk degradasi lainnya, apoprotein B yang didegradasi melalui reseptor *scavenger*, menyebabkan akumulasi lipid di makrofag, kadar vitamin antioksidan larut lemak rendah dan mempunyai sifat immunogenik dan biologik aktif. Kadar kolesterol yang tinggi akan semakin memperberat aktifitas antioksidan dalam mekanisme keseimbangan tubuh.<sup>16</sup> Bub, *et al* (2000) memperkuat hasil penelitian tersebut, bahwa penambahan konsumsi karotenoid dapat meningkatkan konsentrasi lipoprotein karotenoid, tetapi hanya likopen dari jus tomat yang dapat mereduksi LDL oksidasi pada subyek manusia.<sup>89</sup> Mekanisme non oksidatif likopen sudah dapat diketahui, akan tetapi mekanisme oksidatif yang lebih banyak memberikan manfaat bagi kesehatan. Penelitian klinik dan epidemiologis menyatakan bahwa likopen yang berasal dari sumber makanan alami lebih mudah di absorpsi dan berada di plasma dan ASI.

Berdasarkan pada data epidemiologi yang menyatakan bahwa asupan tomat dan hasil olahannya yang tinggi dapat meningkatkan kadar likopen plasma. Giovannucci (1999) melakukan review terhadap sejumlah 72 penelitian epidemiologi, berkaitan dengan likopen, plasma likopen dan kejadian kanker. Penelitian sejumlah 57 menunjukkan hubungan antara asupan likopen, plasma likopen dan kejadian kanker, 35 diantaranya menunjukkan hubungan yang signifikan.<sup>60</sup>

Penurunan kadar plasma likopen pada kontrol mengindikasikan bahwa kadar likopen berkurang tanpa adanya pemberian likopen. Berbagai faktor yang mempengaruhi stres oksidatif masih terjadi, salah satunya dengan pemberian pakan tinggi lemak tinggi kolesterol (TLTK). Hal tersebut dapat menurunkan kemampuan likopen sebagai antioksidan. Mekanisme absorpsi likopen belum begitu jelas. Berbagai faktor mempengaruhi bioavailabilitas dan absorpsi, termasuk pemanasan, diet yang mengandung lemak, dan keberadaan antioksidan lain.<sup>62</sup> Peningkatan kadar plasma likopen sejalan dengan penambahan variasi dosis likopen mengindikasikan bahwa kemampuan sebagai antioksidan likopen juga mengalami peningkatan, walaupun jumlah likopen yang dikonsumsi tidak dapat dijadikan sebagai dasar perhitungan kadar plasma likopen. Secara umum, kadar plasma likopen di sirkulasi dan jaringan adipose dapat menjadi indikator yang lebih baik dibanding dengan data asupan diet dalam pencegahan penyakit.<sup>62</sup>

## **6.2. Kadar Vitamin C dan Variasi Dosis Likopen**

Mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas melibatkan antioksidan yang lain termasuk vitamin C, E dan GPx. Kohlemeier, *et al* (1997) melakukan penelitian antara status antioksidan dan MI. Status antioksidan tubuh termasuk agen penghambat



kerja enzim HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzim A*), sehingga LDL oksidasi yang terbentuk sebagai salah satu faktor penyebab MI menjadi berkurang.

Vitamin C merupakan vitamin larut air yang hanya mampu menghilangkan radikal bebas pada media cair. Vitamin C memiliki kemampuan menekan radikal bebas yang akan menyerang lipid. Sebagai *scavenger* radikal bebas, vitamin ini dapat secara langsung bereaksi dengan superoksida maupun anion hidroksil, serta berbagai hidroperoksida lipid. Perannya sebagai antioksidan pemutus rantai, vitamin C dapat melakukan regenerasi bentuk vitamin E tereduksi. Vitamin C juga berperan sebagai antioksidan sekunder dengan mempertahankan glutathion tereduksi sebagai antioksidan yang penting.<sup>2</sup> Dengan kemampuannya tersebut memungkinkan terjadinya hubungan yang sinergis dengan antioksidan lain (*antioxidant network*), sehingga dapat mempertahankan dan meningkatkan kemampuan sebagai antioksidan.<sup>95-96</sup> Pemeriksaan pada vitamin C memperlihatkan bahwa semakin banyak pemberian likopen maka kadar vitamin C semakin tinggi dibanding dengan kontrol ( $P_3 > P_2 > P_1 > P_0$ ). Pada vitamin C memperlihatkan bahwa pemakaian dosis terendah 0,36 mg ( $P_1$ ) mampu meningkatkan kadar vitamin C sebagai antioksidan.

### **6.3. Kadar Vitamin E dan Variasi Dosis Likopen**

Di dalam tubuh terdapat berbagai macam sistem proteksi terhadap radikal bebas, salah satunya sistem proteksi non enzimatik yang larut lemak. Karena kelarutannya vitamin E banyak ditemukan di membran sel dan merupakan antioksidan penghambat reaksi akibat radikal bebas. Selain itu vitamin E adalah baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam membran seluler dan subseluler. Fosfolipid pada mitokondria, retikulum

endoplasma serta membran plasma yang memiliki afinitas terhadap  $\alpha$  tokoferol, dan vitamin E terkonsentrasi pada bagian-bagian tersebut.<sup>97</sup>

Reaksi berantai pada peroksidasi lipid dapat dihentikan oleh vitamin E dengan cara memberikan elektron tunggal pada dua reaksi berurutan untuk membentuk senyawa teroksidasi yang stabil. Pemberian likopen pada penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan kadar vitamin E, sehingga kemampuannya sebagai antioksidan semakin besar. Pemeriksaan pada vitamin E memperlihatkan bahwa semakin banyak pemberian likopen maka kadar vitamin E semakin tinggi dibanding dengan kontrol ( $P_3 > P_2 > P_1 > P_0$ ). Hal tersebut dikarenakan adanya hubungan yang sinergisme dengan antioksidan yang lain. Kadar plasma likopen dan vitamin C yang baik mempengaruhi kemampuan antioksidan secara keseluruhan. Dengan cara tersebut maka kadar vitamin dapat dipertahankan, terjadi perimbangan terhadap lipid terperoksidasi dan protein yang meningkat sehingga fungsinya sebagai antioksidan menjadi berkurang. Pada vitamin E memperlihatkan bahwa pemakaian dosis terendah 0,36 mg ( $P_1$ ) mampu meningkatkan kadar vitamin E sebagai antioksidan.

#### **6.4. Kadar Gluthathione Peroksidase dan Variasi Dosis Likopen**

Gluthathion peroksidase merupakan antioksidan enzimatik, salah satunya membutuhkan Selenium (Se) untuk aktifitasnya, sehingga kadar GPx dapat menggambarkan kadar Se juga. Semakin tinggi kadar GPx, semakin tinggi pula kadar Se dalam darah. Kadar Se dan GPx yang tidak normal (Gambar 8) seringkali dihubungkan dengan penyakit Keshan dan aterosklerosis. Individu dengan kadar Se rendah memiliki resiko kematian akibat PJK lebih tinggi di banding dengan kadar yang normal.<sup>47</sup>

Gluthathion peroksidase (GPx) merupakan salah senyawa utama perlindungan endogen dari kerusakan oksidatif. Enzim ini mengkatalis reduksi hidrogen peroksida dan peroksida lemak (LOOH) oleh gluthathion. Gugus sulfhidril pada gluthathion (GSH) berfungsi sebagai donor elektron, dan dioksidasi menjadi bentuk disulfida (GSSG), yang akan direduksi kembali oleh gluthathion reduktase menjadi bentuk sulfhidril. Gluthathion peroksidase merupakan salah senyawa utama pertahanan sel endogen apabila antioksidan lain tidak ada.<sup>3</sup> Pada keadaan di mana vitamin C, vitamin E maupun  $\beta$ -karoten kadarnya rendah, dibutuhkan lebih banyak Se (interaksi vitamin-mineral) sebagai bagian dari GPx untuk dapat menekan produksi radikal bebas. Untuk mengatasi keadaan tersebut, tubuh meningkatkan aktifitas GPx. Pada keadaan di mana antioksidan lain cukup, seperti pada penelitian ini, maka kadar GPx dapat menurun sebagai konsekuensi dari kadar antioksidan lain yang sudah cukup. Pada penelitian ini kadar GPx mengalami penurunan yang bersifat *dose effect*. Dosis terendah 0,36 mg/hari (P<sub>1</sub>) sudah mampu menurunkan kadar GPx.

Penurunan kadar GPx dapat diasumsikan positif apabila terjadi peningkatan status antioksidan lain (likopen, vitamin C dan vitamin E), sehingga kebutuhan GPx menjadi berkurang (*feed back mechanism*). Selain itu ada mekanisme keseimbangan antioksidan, di mana dimungkinkan kadar likopen yang berlebih akan menjadi pro oksidan, sehingga GPx dibutuhkan untuk mengikat pro oksidan tersebut (*competitive antagonism*). Hasil ini ditemukan pula oleh Herbert V dan Seravini, dkk<sup>24,30,87,98</sup>

#### **6.5. Likopen dan Status Antioksidan (Vitamin C, vitamin E dan GPx)**

Likopen berinteraksi langsung dengan antioksidan lain melalui mekanisme oksidatif. Sebagai salah satu antioksidan pemutus rantai, likopen memiliki kemampuan untuk menghentikan kerusakan oksidatif. Vitamin E dan vitamin C juga

memiliki kemampuan yang sama sebagai antioksidan pemutus rantai. Pemberian likopen diharapkan meningkatkan keseimbangan oksidan dan antioksidan. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan hasil dari penelitian ini yang memperlihatkan bahwa status antioksidan secara keseluruhan lebih baik dibanding kontrol. Pada keadaan hiperkolesterolemik seperti pada penelitian ini, pemberian likopen 0,36 mg/ekor/hari meningkatkan status antioksidan, sehingga mempengaruhi kemampuan antioksidan tubuh secara keseluruhan.<sup>99-103</sup> Peningkatan kadar vitamin C dan vitamin E perlu diketahui apakah sudah merupakan kadar optimum sebagai antioksidan. Penurunan pada kadar GPx, apabila dilihat dari gambar 8, yang merupakan hubungan antara kadar GPx dan Se menunjukkan adanya batasan normal. Batasan (*range*) tersebut apabila terlalu rendah ataupun terlalu tinggi akan bersifat merugikan bagi tubuh, defisiensi maupun toksik.<sup>47</sup> Mekanisme sistem antioksidan dalam pertahanan terhadap radikal bebas saling berkaitan (*antioxidant network*) dalam upaya mempertahankan keseimbangan redoks di dalam tubuh.<sup>98</sup>

Pada penelitian Reesannen (2003) dilaporkan bahwa efek protektif paling besar terdapat pada individu dengan cadangan PUFA yang tinggi. Selain itu, yang mendukung fungsi antioksidan terhadap radikal bebas adalah hasil OR likopen pada subyek yang tidak merokok, sudah tidak merokok dan perokok adalah 0,33, 0,41, dan 0,63. Penelitian ini menekankan kembali peran likopen terhadap status antioksidan tikus hiperkolesterolemik, namun masih sedikit mekanisme utama likopen tubuh sebagai antihiperkolesterolemik yang diketahui. Kelemahan penelitian Reesannen adalah belum diketahuinya dosis pasti yang dapat memberikan efek penurunan kolesterol dan mekanisme lain yang dimiliki likopen sebagai antioksidan. Penggunaan bahan alami lebih dianjurkan, karena diketahui bahwa efek obat

antihiperkolesterolemik dapat mengurangi kemampuan antioksidan tubuh.<sup>51,104-107</sup> Rissaneen (2003) menyimpulkan bahwa konsentrasi plasma likopen, yang berasal dari tomat berperan pada tahap awal aterogenik dan dapat menurunkan kejadian PJK. Asupan sayur dan buah juga dapat mencegah terjadinya penyakit jantung dan menurunkan angka kematian.<sup>51</sup> Diperlukan lebih banyak lagi informasi yang dapat menjelaskan hubungan antara likopen dan PJK. Berbagai pertanyaan yang muncul kemudian adalah bagaimana evaluasi efek antioksidan terhadap organ hewan coba, hubungan dengan antioksidan lain, status antioksidan secara keseluruhan, *half life* likopen dalam hewan coba, mekanisme antioksidan intraseluler, dosis optimum antar antioksidan, dosis maksimal yang masih di anggap aman, efek samping pemberian likopen, maupun kemungkinan manfaat lain dari likopen.

#### **6.6. Keterbatasan Penelitian.**

Dosis-dosis yang digunakan belum dapat menentukan status vitamin C, vitamin E dan GPx optimum yang terbaik untuk hewan coba.

## **BAB VII**

## **SIMPULAN DAN SARAN**

### **7.1. Simpulan**

Dari penelitian ini dapat di tarik beberapa simpulan mengenai pengaruh pemberian likopen dosis 0,36; 0,72; dan 1,08 mg/ekor/hari terhadap status antioksidan tikus (*Rattus norvegicus galur Sprague Dawley*) hiperkolesterolemik, sebagai berikut:

1. Semakin tinggi pemberian likopen, maka kadar vitamin C dan vitamin E semakin meningkat dibanding dengan kontrol ( $P_3 > P_2 > P_1 > P_0$ ). Kadar vitamin C dan E berbeda bermakna dalam dan antar kelompok perlakuan.
2. Kadar GPx sebagai antioksidan endogen mengalami penurunan secara signifikan dalam dan antar kelompok perlakuan dengan adanya penambahan likopen.
3. Likopen dosis 0,36 mg/ekor/hari pada tikus sudah dapat meningkatkan kadar vitamin C dan vitamin E serta menurunkan kadar GPx.

### **7.2. Saran**

1. Diperlukan penelitian payung yang lebih lengkap sehingga pembahasan hasil penelitian bisa lebih luas.
2. Perlu dirintis uji coba pada manusia relawan untuk mencari dosis yang tepat untuk memperbaiki status antioksidan pada keadaan hiperkolesterolemik.

## **DAFTAR PUSTAKA**

1. Wijaya A. Oksidasi LDL, aterosklerosis, dan antioksidan. *Forum Diagnosticum* 1998; 2: 1-11.
2. Dawn BM, Allan DM, Smith CM. *Biokimia kedokteran dasar: sebuah pendekatan klinis*. Jakarta: EGC; 2000.hal. 321-523.
3. Montgomery R, Conway TW, Spector AA. *Biochemistry: a case oriented approach*. St Louis: Mosby; 1990.hal. 93.
4. Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamin C, E and carotenoid. *Diabetes* 1997;46 (suppl.2): S14-8.
5. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* 1996;31A(1):30-8.
6. Trilling JS, Jaber R. Selections from current literature: the role of free radicals and antioxidants in disease. *Fam Pract* 1996;13(3):322-6.
7. Stiphanuk MH. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. New York: 2000: p.904-5.
8. Rock CL, Jacob RA, Bowen PA. Update on biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E and carotenoids. *J. Am Diet Assoc* 1996:693-702.
9. Wiseman H. Dietary influences on membran function: importance in protection against oxidative damage and disease. *J. Biochem* 1996;7:2-15.
10. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruits and cancer interventions: a review. *J. Am Diet Assoc* 1996;96:1027-39.
11. Jialial I, Grundy M. Influence antioxidant vitamin on LDL oxidation, In : *Beyond Deficiency New Views On The Function And Health Effect Of Vitamin*. New York: *Annals of the New York Academy of Science*; 1992.p.237-45.
12. Nguyen Ml, Schartz SJ. Likopen: chemical and biological properties. *Food Technoll* 1999;53:38-45.
13. Gerster. H, The potential role of lycopene for human health. *J. Am. Coll. Nutr* 1997;14:109-24.
14. Boileau TW, Boileau, AC, Erdman JW. Bioavailability of all trans and cis-isomers of lycopene. *Exp Biol Med* 2002;227:914-9.
15. Zechmeister L. Prolycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene. *Proc Natl Acad Sci* 1994;21:468-74.

16. Rao AV, Agarwal S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer* 1998b;31(3):199-203.
17. Freeman FL. Prostatic levels of tocopherol, carotenoids, and retinol in relation to plasma levels and self-reported usual dietary intake. *Am J Epidemiol* 2000;51:109-18.
18. Fuhrman B, Hypocholesterolemic effect of lycopene and  $\beta$  – karotene is related to supression of cholesterol syntesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;233:658-62.
19. Rao AV, Agarwal S. Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation. *Nutr Res* 1998a;18(4):713-21.
20. Rao AV, Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 2000;19(5):563-9.
21. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannuci E, Colditz GA, Willet WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N. Engl. J. Med* 1993;328:1450-6.
22. Michaud DS. Asociation of plasma carotenoid concentrations and dietary asupan of specific carotenoids in samples of two prospective cohort studies using a new carotenoid database. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 1998;7:289-90.
23. Van Den Berg H, Olmedilla B, Favier, AE, Roussel AM. No significant effects of lutein, lycopene or beta-carotene supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL oxidizability in healthy adult subjects. *J Am Coll Nutr* 2001;20(3):232-38.
24. Herbert V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins: Introduction. *J Nutr* 1996;126(Suppl.4):1197S-2008S.
25. Donatus IA. Petunjuk praktikum toksikologi. Lab Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta: Ed 1, 1992. hal.21-22.
26. Cronin JR. Lycopene: The powerful antioxidant that makes tomatoes red. *Altern.Complement Ther* 2000;6(2):92-4.
27. Sargowo D. Peran radikal bebas dalam patogenesis aterogenik. Dalam: kumpulan makalah seminar dan lokakarya radikal bebas dan patogenesis penyakit. Malang; FK Unibraw; 1997.
28. Bendigh A. Antioxidant Micronutrient and Immune Responses. In: *Micronutrients and Immune Functions*. Ed Addriane Bendich and Ranjit K, Chandra. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 1990; 587:168-77.



29. Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: First results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 1997;18(9):1847-50.
30. Serafini M, Rio DD, Crozier A, et al, Effect of changes in fruit and vegetable intake on plasma antioxidant defenses in humans. *Am J Clin Nutr* 2005;81(2):531-2.
31. Kristenson M, Zieden B, Kuchienkieve Z. Antioxidant State and Mortality From PJK in Lithuanian and Swedish Men, Concomitant Cross sectional Study of Men Aged 50. *BMJ* 1997;314:629-33.
32. Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, Laboratory animal medicine. Academic Press Inc.1984.p. 91-120.
33. Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 2000;154(2):201-10.
34. Christian MS, Schulte S, Hellwig J. Developmental (embryo-foetal toxicity/teratogenicity) toxicity studies of synthetic crystalline lycopene in rats and rabbits. *Food Chem Toxicol* 2003;41(6):773-83.
35. Arab L, Steck S. Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(6Suppl.):1691S-1695S [& Discussion, pp. 1696S-1697S].
36. Hellen W, Lynn E. Oxidative Stress and Antioxidant, Influence On Health and Brain Ageing. Departement of Nutrition and Dietetics, King's College London, UK: 2000.
37. Mayes PA, Sintesis, Pengangkutan dan Ekskresi Kolesterol, In: Murray RK, Granner. DK, Mayes PA, dan Rodwel VW, (Eds), Biokomia Harper, Ed. 24, Jakarta: EGC; 1997.p. 277-89.
38. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: A human dietary intervention study. *Lipids* 1998;33(10):981-4.
39. Riso P, Pinder A, Santangelo A, et al. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage?. *Am J Clin Nutr* 1999;69:712-8.
40. Hillbom M. Oxidan, antioxidan, alcohol, and stroke. *Fronties in Bioscience* 4 e. August 15, 1999: 67-71.
41. Böhm V, Bitsch R. Intestinal absorption of lycopene from different matrices and interactions or other carotenoids, the lipid status, and the antioxidant capacity of human plasma. *Eur J Nutr* 1999;38(3):118-25.

42. Lavoiser AI. Chemical and physiological properties of vitamins. In: Combs GF, Ed. The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. 2<sup>nd</sup> ed. London; Academic Press; 1998, p. 191-263.
43. Horvath PJ. Vitamins as therapeutic agent. In: Smith CM, Reynard AM. Ed, Textbook of pharmacology. WB Saunders Company. Philadelphia; 1992. p1067-78.
44. Frei B, Stocker R, Eglund L, Ames BN. Ascorbate: The most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 1990;269:155-63.
45. Berdanier CD. Advanced nutrition: micronutrient. CLC Press, Florida: 1998. p.9-19.
46. Perona G. Selenium dependent glutathione peroxidase: a physiological regulatory system for platelet function. *Thrombosis and haemostasis* 1990;64:312-8.
47. Randox. Total Antioxidant status. Randox Laboratories & Co, Antrim: 1996.
48. Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P. Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: Findings from case-kontrol studies in Canada. *Nutr Cancer* 1999;34(2):173-84.
49. Agarwal A, Shen H, Agarwal S, Rao AV. Lycopene content of tomato products: Its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J Med Food* 2001;4(1):9-15.
50. Wright AJ, Hughes DA, Bailey AL, Southon S. Beta-carotene and lycopene, but not lutein, supplementation changes the plasma fatty acid profile of healthy male nonsmokers. *J Lab Clin Med* 1999;134 (6):592-8.
51. Reessanen T. Association of lycopene and dietary intake of fruits, berries, and vegetables with atherosclerosis and CVD. Departement Of Public Health and General Practise: University Of Kuopio, 2003. Disertation.
52. Lawrence GS. Peranan apoptosis pada patogenesis aterosklerosis. *Jurnal Medika Nusantara* 1999;20:162-5.
53. Schmitz, Chevaux K. Defining the role of dietary phytochemicals in modulating Human Immune function, In: Nutrition and Immunology, New Jersey: Humana Press Inc, 2000.
54. Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1998;56(2, Part 1):35-51.
55. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000;163(6):739-44.

56. Johnson EJ. Human studies on bioavailability and plasma response of lycopene. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;218(2):115-20.
57. Boileau AC, Merchen. NR, Wasson K. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J. Nutr* 1999;129: 1176-81.
58. Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ. The consumption processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage; American Society For Nutritional Sciences: 2003.
59. Paetau I, Khachik F, Brown DB, et al. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increase plasma concentration of lycopene & related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1175-87.
60. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* . 1999;91(4):317-31.
61. Sesso, HD, Liu. S, Gaziano, Michael J, et al, Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *J. Nutr* 2003;133:2336-41.
62. Rao AV. Lycopene, tomatoes and the prevention of coronary heart disease. *Exp Biol Med* 2002;227:908-13.
63. Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 2000;54:233-4
64. J.K. Kok, FJ. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. *Am J Epidemiol* 1997;146(8):618-26.
65. Rissanen HT, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr* 2003;77(1):133-8.
66. Black HS. Radical interception by carotenoids and effects on UV carcinogenesis. *Nutr Cancer* 1998;31(3):212-7.
67. John F. Carotenoids protects against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical. *Nat Med* 1995;1:98-9.
68. Sharma JB, Kumar A, Malhotra M, et al. Effect of lycopene on pre eclampsia and intra uterine growth retardation in primigravida. *Int. J. of Gynecology and obstetrics* 2003;81:257-62.
69. Rissanen HT, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al, Low plasma lycopene concentrations is associated with increased intima-media thickness of the carotid artery wall. *Arterioscler Thromb Vasc* 2000;20:2677-81.

70. Kharb S, Veena S, Nutraceuticals in health and disease prevention. *Indian J Of Clinical Biochemistry* 2004;(19):50-3.
71. Sesso HD, Liu S, Gaziano MJ, Buring EJ. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *J Nutr* 2003;133:2336-41.
72. Bowen P, Chen L, Duncan C. Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarker of carcinogenesis. *Exp Biol Med* 2002;227:886-93.
73. Upritchard JE, Sutherland WHF, Mann JI. Effect of Supplementation with tomato juice, vitamin E and vitamin C on LDL oxidation and product of inflammatory type 2 diabetes. *Diabet Care* 2000;23:733-8.
74. Chopra M, O'Neill ME, Keogh N, Wortley G, Southon S, Thurnham DI. Influence of increased fruit and vegetable asupan on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. *Clin Chem* 2000;46(11):1818-29.
75. Juergen GE. Lycopene,  $\beta$  – karoten, and colorectal adenomas. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1219-24.
76. Tjokroprawiro A, Pudjirahardjo WJ, Putra ST. *Pedoman penelitian kedokteran*. Airlangga University Press, Surabaya: Cet II, 2002. hal 39-60.
77. Tjokronegoro A, Sudarsono S. *Metodologi penelitian bidang kedokteran*. FK-UI, Jakarta: Cet IV, 2001. hal.47-50.
78. Notoatmodjo S. *Metodologi penelitian kedokteran*. Rineka Cipta, Jakarta: Cet II ed. revisi, 2002. hal 156-72.
79. Pratiknya AW. *Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan*. PT Raja Grafindo Persada, Jakarta: Cet IV ed.1, 2001.hal 117-43.
80. Nazir M. *Metode penelitian*. Ghalia Indonesia, Jakarta: 2003. hal 239-41.
81. Sastroasmoro S, Ismail S. *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis*. Sagung Seto, 2002. hal. 79-96.
82. Baihaki A, Sudrajat M. *Perancangan dan analisa percobaan*. Bandung: Fakultas Pertanian Universitas Padjajaran; 1997. hal. 45-7.
83. Rozzi NL, Singh RA, Vierling RA, Watkins BA. Supercritical fluid extraction of lycopene from tomato processing byproducts. *J. Agric. Food Chem* 2002;50: 2638-43.

84. Wei Y, Zhang T, Xu G, et al. Application of analytical and preparative high-speed counter current chromatography for separation of lycopene from crude extract of tomato paste. *J of Chromatography A* 2001;929:169-173.
85. Sabio E, Lozano M, Espinosa M. Lycopene and beta-carotene extraction from tomato processing waste using supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res* 2003;13:664-6.
86. Shinnik FL, Ink SL and Marlett JA. Dose response to a dietary Oat Bran Fraction in Cholesterol Fed Rats. *Journal Of Nutrition* 1990: 120: 561-8.
87. Hinnerger AI, No significant effects of lutein, lycopene or beta karoten supplementation on biological markers of oxidative stress and LDL Oxidizability in healthy adult subjects. *J. Am. Coll* 2001;20:3:232-8.
88. Lestariana W, Madian M. Analisa vitamin dan elektrolit organik, PAU UGM, Yogyakarta: 1988.hal. 65-73.
89. Bub A. Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. *J.Nutr* 2000;130:2200-6.
90. Smith JB, Mangkoewidjojo S. Pemeliharaan, pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. UI Press, Jakarta: 1998.hal. 37-57.
91. Santoso S, Analisis Statistik non parametrik dengan SPSS for Windows, PT Elex Media Computindo, Jakarta: 2002. hal. 114.
92. Budiarmo E. Biostatistika untuk kedokteran dan kesehatan masyarakat. EGC, Jakarta: 2002. hal 178-227.
93. Anonymus. Pengolahan data statistik dengan SPSS 12. Andi-Wahana, Yogyakarta: 2004.hal 127-315.
94. Latham MC. Human nutrition in the developing world. FAO, Rome: 1997.p 83-111
95. Worthingham-Roberts BG, William SR. Nutrition throughout the life cycle. Mosby, Washington: 1996. p.17-45.
96. Steinberg MF, Chalt A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr* 1998;68:319-27.
97. Rejon RF, Pena GM, Geanado F, Galiana RJ, Blanco I, Olmeidilla B. Plasma status of retinol, alpha and gamma tocopherols and main carotenoids to first myocardial infarction: case control and follow up study. *Nutrition* 2003;18:26-31.
98. Packer L, Colman C. The antioxidant miracle: your complete plan for total health and healing. John Wiley & Sons, Inc. New York: 1999.

99. American Dietetic Association. Tomatoes: Even Better for you than you thought!, [www.nhlbisupport.com/bmi/bmicalc/htm](http://www.nhlbisupport.com/bmi/bmicalc/htm).
100. Scientific Committee on Food. Opinion on synthetic lycopene as a colouring matter for use in foodstuffs, 02 Desember 1999.
101. Halsted HC. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am J Clin Nutr* 2003;77(suppl):1001S-7S.
102. Sesso HD, Buring JE, Norkus EP, Gaziano JM. Plasma lycopene, other carotenoids and retinol and the risk of CVD in women. *J Clin Nutr* 2004;79:47-53.
103. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* 1995;41(12):1819-28.
104. Kana W, Schwartz JS, Platz AE, et al, Variations in plasma lycopene and specific isomers over time in a cohort of US men. *J. Nutr* 2003;133:1930-6.
105. Barnet YA, King CM. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in human. *Mutat.Revs* 1995;338:116-28.
106. Berg H, Thurnham D, Corridan B, Chopra M., Hininger, I. A European multicentre, placebo-kontrolled supplementation study with alpha-tocopherol, carotenerich palm oil, lutein or lycopene: Analysis of serum responses. *Clin Sci.* 2002;102(4):447-56.
107. Collins JK, Arjmandi BH, Claypool PH, Perkins VP, Baker RA, Clevidence BA. Lycopene from two food source does not affect antioxidant or cholesterol status of middle aged adults. *J. Nutr* 2004;3(15):88-100.



Photo ©2004 LycoRed

- 
1. Wijaya A. Oksidasi LDL, aterosklerosis, dan antioksidan. Forum Diagnosticum 1998; 2: 1-11
  2. Dawn BM, Allan DM, Smith CM. Biokimia kedokteran dasar: Sebuah pendekatan klinis. Jakarta; EGC. 2000
  3. Vyta. Kolesterol tinggi (hypercholesterol) sebagai salah satu faktor resiko penyakit kardiovaskuler, *available from* URL: <http://www.sinarharapan.co.id/ipitek/kesehatan/2004/0702/kes1.html/>
  4. Stahl W, and Sies H. Antioxidant Defense : vitamin C, E and Carotenoid. Diabetes, 1997, 46 (suppl.2) : S14-18
  5. Hellen, W, Lynn, E, Oxidative Stress and Antioxidant, Influence On Health and Brain Ageing, 2000, Departement of Nutrition and Dietetics, King's College London, UK