

# PENGARUH PEMBERIAN ISOFLAVON TERHADAP JUMLAH ERITROSIT DAN AKTIVITAS ENZIM KATALASE TIKUS YANG DIPAPAR SINAR ULTRAVIOLET

Delmi Sulastr<sup>1</sup>, Ryan Rhiveldi Keswani<sup>2</sup>

1. Bagian Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

2. Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

E-mail : delmisulastr@yahoo.com

## Abstrak

Paparan radiasi ultraviolet (UV) yang tinggi dapat meningkatkan produksi radikal bebas dalam tubuh manusia, sehingga dapat merusak sel-sel tubuh termasuk eritrosit dan sistem pertahanan tubuh seperti enzim katalase. Flavonoid adalah senyawa *phytochemicals* yang dapat melindungi sel tubuh dari radikal bebas.

Penelitian ini adalah penelitian *eksperimental, dengan Pre and Post Design*, dilakukan pada tikus galur Wistar yang dibagi menjadi dua kelompok, kemudian dipapar dengan sinar ultraviolet. Kelompok perlakuan diberi isoflavon dan kemudian darah hewan coba untuk pemeriksaan jumlah eritrosit dan aktivitas enzim katalase. Hasil penelitian kemudian diuji dengan t-test untuk melihat perbedaan jumlah eritrosit dan aktivitas enzim katalase sebelum dan sesudah perlakuan.

Rerata jumlah eritrosit pada kelompok kontrol sebelum perlakuan  $8.75 \pm 1.03$  juta/mm dan sesudah perlakuan  $7.45 \pm 0.23$  juta/mm sedangkan pada kelompok isoflavon rerata jumlah eritrosit sebelum perlakuan  $8.42 \pm 0.53$  juta/mm dan sesudah perlakuan  $8.89 \pm 0.36$  juta/mm. Pada kelompok kontrol didapatkan rerata aktivitas enzim katalase sebelum perlakuan  $6.20 \pm 0.74$  unit/mg protein dan setelah perlakuan  $4.80 \pm 0.23$  unit/mg protein, sedangkan pada kelompok isoflavon sebelum perlakuan  $4.23 \pm 0.48$  unit/mg protein dan setelah perlakuan  $5.46 \pm 0.38$  unit/mg protein. Terdapat penurunan yang signifikan jumlah eritrosit dan aktivitas katalase pada kelompok kontrol ( $p < 0.05$ ).

Penelitian ini mendukung efek merugikan dari sinar UV terhadap jumlah eritrosit dan aktivitas katalase dan membuktikan adanya efek antioksidan dari isoflavon

*Kata kunci : sinar ultraviolet, eritrosit, enzim katalase*

## Abstract

The high exposure to ultraviolet radiation could increase the production of free radicals in the human body, that disturb erythrocytes and defense system of the body such as the catalyze enzyme. Flavonoid is a phytochemical compound which could help the human body in preventing the undesired effects of the free radicals.

This research is an experimental research, with Pre and Post Design, conducted on the vistar strain rats which is divided into two groups, then exposed to ultraviolet rays. Before and after the experiment, the blood of the vistar strain rats were taken to inspect the total erythrocytes and the activity of the catalyze enzyme. The experiment results were then tested with t-test to evaluate the difference in the total amount of erythrocyte and the activity of the catalyze enzyme before and after the experiment.

The average amount of erythrocyte in the control group before the experiment was  $8.75 \pm 1.03$  million/mm and  $7.45 \pm 0.23$  million/mm after the experiment whereas in the isoflavon group, the average total erythrocyte before the experiment was  $8.42 \pm 0.53$  million/mm and  $8.89 \pm 0.36$  million/mm after the experiment. In the control group, it was found that the average activity of the catalyze enzyme before the experiment was  $6.20 \pm 0.74$  unit/mg protein and  $4.80 \pm 0.23$  unit/mg protein after the experiment, whereas in the isoflavon group it was found that average value of the catalyze enzyme activity before the experiment was  $4.23 \pm 0.48$  unit/mg protein and  $5.46 \pm 0.38$  unit/mg protein after the experiment. There is a significant drop in the total amount of erythrocyte and the catalyze enzyme activity in the control group ( $p < 0.05$ ).

This experiment supports the side effects of the UV radiation towards the total amount of erythrocyte and the catalyze enzyme and proves the existence of the antioxidant effect of the isoflavon.

*Key words : Ultraviolet ray, erythrocyte, catalyze enzyme*

### Latar Belakang

Penyakit kronis seperti kanker, aterosklerosis, dan penyakit imunologi sering dikaitkan dengan radikal bebas. Radikal bebas dapat merusak karena dapat bereaksi dengan komponen-komponen sel yang penting untuk mempertahankan kehidupan sel, baik komponen-komponen struktural (misalnya molekul-molekul penyusun membran) maupun komponen-komponen fungsional (misalnya enzim-enzim DNA). Kerusakan oksidatif ini dipengaruhi oleh banyak faktor seperti: komposisi substrat (misalnya komposisi asam lemak), konsentrasi oksigen, prooksidan yang dapat berupa *Reactive Oxygen Species (ROS)*, logam transisi, dan protein yang mengandung besi dan enzim.<sup>(1,2)</sup>

Radikal bebas terjadi dalam tubuh manusia melalui tingkatan-tingkatan reaksi, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Radikal bebas dihasilkan secara alami oleh tubuh sebagai hasil sampingan dari metabolisme. Namun radikal-radikal bebas ini tidak menimbulkan efek negatif pada tubuh bila terdapat dalam jumlah yang seimbang. Hal ini disebabkan karena tubuh memiliki kemampuan menetralkan radikal bebas melalui aktivitas antioksidan. Tetapi apabila antara radikal bebas dan antioksidan tidak dalam jumlah yang seimbang, dan jumlah radikal bebas meningkat, maka akan timbul keadaan yang disebut *oxidative stress*. Bila keadaan *oxidative stress* ini berlangsung lama, akan menimbulkan keganasan, inflamasi, aterosklerosis, penuaan, iskemia, dan hemolisis. Penelitian Eko S tahun 2004 menemukan bahwa penyinaran sinar UV menyebabkan timbulnya reaksi yang menghasilkan radikal bebas yang dapat merusak sel-sel tubuh secara umum.<sup>(3-5)</sup>

Sinar ultraviolet dapat menyebabkan kerusakan pada DNA, RNA, protein, dan asam lemak tidak jenuh rantai panjang. Asam lemak tidak jenuh rantai panjang adalah senyawa reaktif yang dapat berubah menjadi peroksida lipid. Oksigen merupakan salah satu faktor yang berperan dalam proses induksi radikal bebas, sehingga terbentuk peroksida lipid pada asam lemak dan membran sel. Pembentukan peroksida lipid mengarah pada terjadinya proliferasi melalui autooksidasi dan menyebabkan instabilitas dan kerusakan membran sel yang luas. Penyinaran sinar ultraviolet selama 6 jam dapat menyebabkan pelepasan enzim-enzim dari "*suicide packet*" lisosom. Reaksi-reaksi ini dapat menyebabkan kerusakan sel dan menimbulkan penyakit. Penelitian Mc Vean menemukan bahwa sinar UV dosis tunggal 20-50 KJ/m<sup>2</sup> dapat mengurangi 65% dari kadar normal *Super Oxyde Dismutase (SOD)* dan katalase di epidermis.<sup>(6,7)</sup>

Tubuh memiliki mekanisme tersendiri dalam mekanisme pertahanan terhadap radikal bebas. Salah satu garis pertahanan yang penting adalah sistem enzim, yaitu berupa *SOD*, *katalase*, dan *glutation peroksidase*. Enzim-enzim ini berperan dalam menetralkan radikal bebas di dalam tubuh. Pada eritrosit, peran enzim-enzim ini sangat besar, karena eritrosit sangat mudah dirusak oleh peroksida lipid akibat paparan radiasi sinar ultraviolet. Peroksida lipid dengan reaksi autooksidasi akan menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan sel sehingga menyebabkan terjadinya anemia hemolisis.<sup>(2,5)</sup>

Flavonoid adalah senyawa *phytochemicals* yang berfungsi sebagai pigmen pada tumbuhan, senyawa ini terbagi atas beberapa kelas yaitu

diantaranya flavon, flavonol, flavanon, dan isoflavon. Flavonoid dapat membantu tubuh dalam mencegah efek buruk dari radikal bebas tersebut. Sebagian besar flavonoid mempunyai kemampuan sebagai antioksidan di tubuh manusia. Senyawa ini yang merupakan bagian dari *polyphenols*, ditemukan pada berbagai makanan dan tumbuhan. Senyawa flavonoid bereaksi secara langsung dengan radikal bebas, dimana elektron yang tidak berpasangan pada radikal bebas ditangkap oleh flavonoid tanpa menghasilkan radikal bebas yang lain sebagai hasil reaksi. Flavonoid dapat menghambat inisiasi dengan menangkap radikal utama seperti superoksida. Flavonoid juga dapat bereaksi dengan peroksi radikal untuk menghambat propagasi, senyawa antara yang terbentuk saat flavonid bereaksi dengan peroksi radikal, dapat bereaksi dengan radikal lain selama terjadi reaksi propagasi. Hal ini mempercepat terjadinya reaksi terminasi.<sup>(8-10)</sup>

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti tertarik untuk mengetahui kemampuan proteksi flavonoid dalam menangkal radikal bebas akibat paparan sinar ultraviolet pada tikus galur wistar.

### **Metode penelitian**

Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental, dengan *Pre and Post Design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Laboratorium Farmakologi Fakultas MIPA Universitas Andalas, dan Laboratorium Patologi Klinik RSUP Dr. M. DJAMIL dari bulan Juni - Agustus 2008.

### **Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel**

Populasi adalah tikus galur Wistar, umur  $\pm 2$  bulan dan berat badan 200-250 gram. Sampel diambil secara acak dari populasi (*simple random sampling*), yang jumlahnya dihitung berdasarkan rumus. *Fraenkle and Wallen*. Dari perhitungan di atas didapatkan jumlah sampel minimal untuk masing-masing kelompok adalah lima ekor.

### **Prosedur Kerja**

#### **Tahap Persiapan**

Tahap persiapan meliputi adaptasi 10 ekor tikus galur Wistar selama 1 minggu di laboratorium Farmakologi Fakultas MIPA Universitas Andalas. Pengukuran berat badan hewan coba dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan.

#### **Tahap Pelaksanaan**

Setelah melewati tahap persiapan maka hewan coba diambil darahnya untuk dihitung jumlah eritrosit dan aktivitas katalase, lalu tiap kelompok tikus diletakkan di dalam ruang yang diradiasi ultraviolet yang bersumber dari lampu TL flourosen 20 watt. Perlakuan dilaksanakan pada pagi hari selama 6 jam/hari selama 1 minggu. Khusus untuk kelompok dua diberikan isoflavon secara oral satu kali sehari selama perlakuan dengan dosis 20 mg/kgBB/hr. Setelah satu minggu, darah sampel diambil kembali untuk dihitung jumlah eritrosit dan aktivitas enzim katalasnya.

**Penghitungan jumlah eritrosit**

Penghitungan jumlah eritrosit dilakukan secara otomatis menggunakan mesin Pentra 60 dengan prinsip sama dengan sianmethemoglobin. Jumlah eritrosit: adalah banyaknya eritrosit yang terdapat dalam 1 mm<sup>3</sup> darah.

**Uji aktivitas enzim katalase**

Aktivitas katalase dinyatakan sebagai banyaknya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dalam mol) yang dipakai oleh katalase per menit. Dihitung menggunakan metode Sinha (1972) yang dibaca absorbannya dengan

spektrofotometer. Dinyatakan dalam satuan unit/ mg protein.<sup>11</sup>

**Pengolahan dan Analisis Data**

Data tiap kelompok sebelum dan sesudah perlakuan akan di uji menggunakan t-test berpasangan. Perbandingan rerata selisih antara kedua kelompok di uji dengan t-test tidak berpasangan dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ).

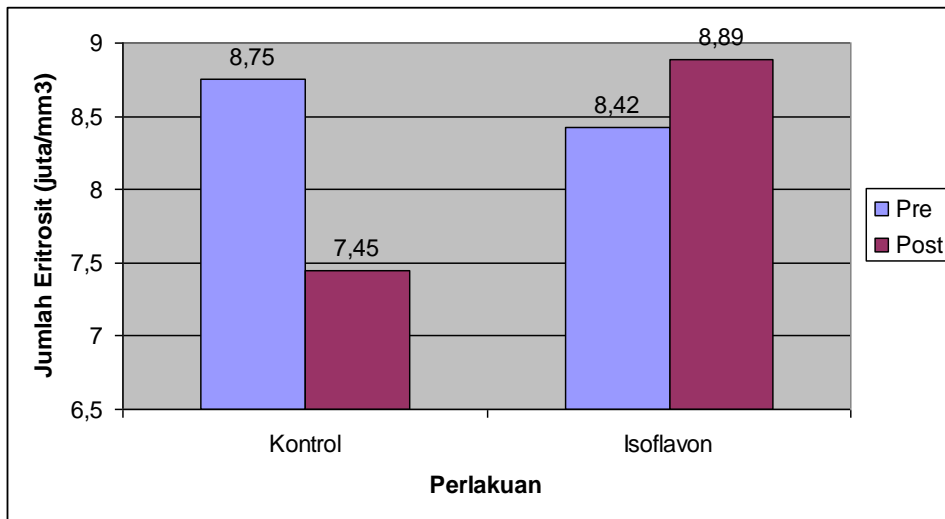
**Hasil penelitian****Jumlah Eritrosit**

Hasil yang diperoleh pada penghitungan jumlah eritrosit adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Jumlah Eritrosit pada kedua kelompok perlakuan sebelum dan setelah penyinaran (juta/mm<sup>3</sup>).

Kelompok Perlakuan	Sebelum				Sesudah				p value
	mean	SD	Min	Max	mean	SD	Min	Max	
Kontrol	8,75	1,034	7,73	9,71	7,45	0,230	6,98	8,10	0,047
Isoflavon	8,42	0,530	7,67	8,85	8,89	0,363	8,49	9,22	0,303

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa rerata jumlah eritrosit pada kelompok kontrol lebih tinggi sebelum perlakuan yaitu 8.75+1.03 juta/mm dibandingkan sesudah perlakuan yaitu 7.45+0.23 juta/mm. Hal ini menunjukkan terjadi penurunan jumlah eritrosit pada tikus yang diberi sinar UV tetapi tidak diberi isoflavan. Pada kelompok isoflavan, rerata jumlah eritrosit sebelum perlakuan lebih rendah yaitu 8.42+0.53 juta/mm dibandingkan sesudah intervensi yaitu 8.89+0.36 juta/mm. Ini artinya terjadi peningkatan jumlah eritrosit pada tikus yang diberi sinar UV dan isoflavan.



Gambar 1. Rerata jumlah eritrosit pada masing-masing kelompok perlakuan sebelum dan setelah penyinaran

Dari Gambar 1 dapat dilihat bermakna rerata jumlah eritrosit setelah bahwa rerata penurunan jumlah eritrosit perlakuan diantara kedua kelompok pada kelompok kontrol sebesar dengan nilai  $p = 0,017$ . Dimana jumlah eritrosit tanpa pemberian isoflavon sebesar  $1,29 \pm 0,769$  juta/ $\text{mm}^3$ . Penurunan ini bermakna dengan nilai  $p = 0,043$  ( $p < 0,05$ ) dan pada kelompok isoflavon pada yang diberi isoflavon. terjadi peningkatan yang tidak bermakna jumlah eritrosit setelah penyinaran dengan rata-rata sebesar  $0,47 \pm 0,762$  juta/ $\text{mm}^3$ , dengan nilai  $p = 0,303$  ( $p > 0,05$ ). Terdapat perbedaan berikut:

**Aktivitas Katalase**

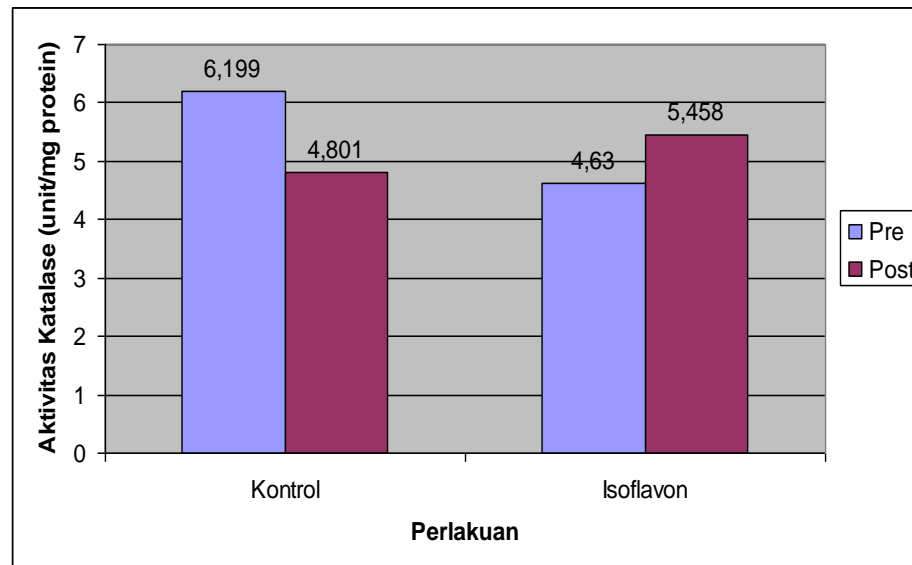
Hasil yang diperoleh dari penghitungan aktivitas katalase adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Rerata Aktivitas Katalase pada Kedua Kelompok Studi Sebelum dan Sesudah Perlakuan (unit/mg)

Kelompok Perlakuan	Sebelum				Sesudah				p value
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	
Kontrol	6,199	0,739	5,58 0	7,207	4,801	0,230	4,575	5,008	0,03
Isoflavon	4,23	0,483	3,90 1	4,951	5,458	0,384	4,983	5,882	0,06

Tabel 2 menunjukkan rerata aktivitas enzim katalase sebelum dan sesudah perlakuan pada kedua kelompok studi. Pada kelompok kontrol didapatkan rerata aktivitas enzim katalase sebelum perlakuan lebih tinggi dengan nilai  $6.20 \pm 0.74$  unit/mg protein dibandingkan setelah perlakuan dengan nilai  $4.80 \pm 0.23$  unit/mg protein, sedangkan pada kelompok isoflavon diperoleh hasil rerata aktivitas enzim katalase sebelum perlakuan lebih rendah sebelum perlakuan dengan nilai  $4.23 \pm 0.48$  unit/mg protein dibandingkan rerata aktivitas enzim katalase setelah

perlakuan dengan nilai  $5.46 \pm 0.38$  unit/mg protein. Hal ini menunjukkan bahwa penyinaran sinar UV dapat menurunkan aktivitas enzim katalase tetapi tidak terjadi apabila diberikan isoflavon



Gambar 2 . Rata-rata aktivitas enzim katalase pada masing-masing kelompok perlakuan sebelum dan setelah penyinaran.

Gambar 2 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol terjadi penurunan bermakna ( $p=0.047$ ) aktivitas katalase sesudah penyinaran dengan rerata penurunan sebesar  $1,40 \pm 0,86$  unit/mg protein. Pada kelompok isoflavon mengalami peningkatan aktivitas katalase dengan rata-rata selisih sebesar  $1,07 \pm 0,88$  unit/mg protein tetapi peningkatan ini tidak bermakna karena nilai  $p=0,094$ . Terdapat perbedaan yang bermakna perubahan aktivitas enzim katalase antara tikus yang dipapar sinar UV tanpa pemberian isoflavon dengan tikus yang dipapar sinar UV dan diberi isoflavon. Aktivitas katalase kelompok kontrol sesudah perlakuan lebih rendah dari kelompok isoflavon.

#### **Bahasan** **Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Jumlah Eritrosit**

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa untuk kelompok kontrol

terjadi penurunan jumlah eritrosit yang bermakna setelah pemaparan sinar UV dengan nilai  $p=0,043$  Hasil ini sesuai dengan penelitian Eko S yang menemukan penurunan jumlah eritrosit pada tikus yang dipapar sinar UV. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Larlykova (2005) yang melakukan studi invitro terhadap darah vena yang diberi penyinaran radiasi sinar UV sebesar  $10.000 \text{ J/m}^2$ . Hasil penelitian ini melaporkan terjadi penurunan adenosine triphosphate, phospholipid dalam darah dan memburuknya stabilitas membran eritrosit. Misra pada tahun 2005 juga melaporkan bahwa paparan radiasi UVB sebesar  $0 - 2.0 \text{ mW/cm}^2$  dapat merusak eritrosit secara invitro. Radiasi ultraviolet (UV) merupakan gelombang elektromagnetik yang dapat memberikan efek buruk pada makhluk hidup.<sup>(3,12,13)</sup> Paparan UV dapat memicu terbentuknya radikal bebas melalui mekanisme sebagai

berikut : Intensitas radiasi sinar UV yang sangat tinggi dapat menyebabkan reaksi fisi homolitik senyawa hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi spesies radikal bebas hidroksil ( $OH^\circ$ ) yang sangat reaktif. Radikal hidroksil dapat bereaksi secara acak terhadap komponen biomolekul seperti karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat. Membran eritrosit merupakan salah satu membran sel yang rentan terhadap serangan radikal hidroksil ( $OH^\circ$ ). Jika radikal  $OH^\circ$  menyerang membran eritrosit, maka fluiditas membran sel akan terganggu yang dapat menyebabkan lisis bahkan kematian sel sehingga akan terjadi perubahan pada jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin. Hal ini yang mengakibatkan terjadinya penurunan jumlah eritrosit setelah pemaparan sinar UV.<sup>(3,14)</sup>

Pada kelompok isoflavon terjadi peningkatan jumlah eritrosit setelah pemaparan sinar UV, namun peningkatan ini tidak bermakna. Terjadinya peningkatan ini tidak dapat dijelaskan berdasarkan teori dan literatur yang ada, maka diduga peningkatan ini terjadi akibat prosedur kerja dan faktor koreksi alat. Perbedaan rerata selisih diantara kedua kelompok bermakna secara statistik,  $p= 0,017$ . Ini menunjukkan bahwa isoflavon sebagai antioksidan dapat mencegah efek sinar UV dalam menyebabkan hemolisis.

### **Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Aktivitas Katalase**

Aktivitas *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat dinilai berdasarkan aktivitas antioksidan enzimatisnya dan atau dari kerusakan yang ditimbulkannya.<sup>(3)</sup> Pada penelitian ini digunakan katalase sebagai salah satu arah parameter

penilaian aktivitas ROS, karena enzim ini berperan dalam katalisis hidrogen peroksida (sebagai ROS) menjadi air dan oksigen. Semakin rendah aktivitas katalase, maka aktivitas ROS akan semakin meningkat.

Pada kelompok kontrol terjadi penurunan aktivitas katalase sesudah penyinaran dengan rata-rata penurunan sebesar  $1,40 \pm 0,86$  unit/mg protein, penurunan ini bermakna dengan nilai  $p= 0,047$ . Terjadinya penurunan ini disebabkan peningkatan pembentukan ROS sehingga terjadi penumpukan  $H_2O_2$ . Akumulasi  $H_2O_2$  ini mengakibatkan menurunnya aktivitas katalase akibat memecah  $H_2O_2$ , Akumulasi  $H_2O_2$  juga menyebabkan terbentuknya radikal hidroksil yang juga merupakan ROS.<sup>(14)</sup> Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan McVean M dan Eko S yang menemukan penurunan aktivitas katalase dan SOD akibat penyinaran sinar UV.<sup>(3)</sup>

Pada kelompok isoflavon terjadi peningkatan aktivitas katalase dengan rata-rata selisih sebesar  $1,07 \pm 0,88$  unit/mg protein setelah diuji peningkatan ini tidak bermakna karena nilai  $p= 0,094$ . *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat diredam oleh sistem antioksidan endogen yang merupakan lini pertahanan pertama, namun dalam keadaan stress oksidatif dimana radikal bebas yang terbentuk lebih tinggi daripada sistem oksidan yang mampu meredamnya maka keberadaan antioksidan eksogen sebagai lini pertahanan kedua sangat diperlukan. Pada penelitian ini dilakukan pemberian isoflavon sebagai antioksidan eksogen. Isoflavon ini penting untuk mempertahankan integritas membran. Reaksi isoflavon dengan  $H_2O_2$ , radikal peroksil dan peroksida lipid menghasilkan senyawa



antara yang mempercepat proses terminasi radikal bebas lain, sehingga dapat melindungi sel dari kerusakan.<sup>(8)</sup> Hal ini bersamaan dengan kemampuan isoflavon menghambat *xantine oksidase* yang menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas katalase pada kelompok isoflavon. Hal ini juga sesuai dengan yang ditemukan Robert A DiSilvestro dengan pemberian genistein pada tikus.<sup>(8)</sup>

Perbedaan selisih aktivitas katalase sebelum dan sesudah perlakuan pada kedua kelompok tersebut secara statistik dinyatakan bermakna  $p= 0,007$ . Hal ini membuktikan bahwa isoflavon berperan sebagai antioksidan eksogen yang mampu mempertahankan kestabilan membran eritrosit dan juga dapat meningkatkan aktivitas katalase sehingga akibat penyinaran UV dapat diredam.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa radiasi ultraviolet dapat menyebabkan terjadinya peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat dilihat dari penurunan aktivitas katalase setelah penyinaran. Peningkatan pembentukan ROS ini dapat menyebabkan lisis pada membran sel eritrosit sehingga terjadi penurunan jumlah eritrosit setelah penyinaran, dan juga dapat disimpulkan bahwa isoflavon dapat meredam aktivitas ROS yang dipicu oleh radiasi ultraviolet.

#### KEPUSTAKAAN

1. Purnomo Suryohudoyo. Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas. Buku Naskah Lengkap Simposium Pengaruh Radikal Bebas terhadap Penuaan dalam Rangka Lustrum IX FKUA Padang, 7 September 2000.
2. Sulistyowati Tuminah, S.Si., Radikal Bebas dan Antioksidan-Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronis. *Cermin Dunia Kedokteran*. 2000; 128:49-51
3. Eko S, Fujiati, dan Roselina P. Pengaruh Vitamin C terhadap Jumlah Eritrosit dan Kadar Hemoglobin pada Tikus Wistar Galur *Sprague Dawley* yang dipajan Sinar Ultraviolet. *Jurnal Kedokteran YARSI*. 2004; 1(12)
4. Syafril Syahbudin, 2000. Peran Radikal Bebas dan Antioksidan pada Proses Penuaan pada Diabetes Melitus. Buku Naskah Lengkap Simposium Pengaruh Radikal Bebas terhadap Penuaan dalam Rangka Lustrum IX FKUA 7 September 1955-2000.
5. Jensen Lautan. Radikal Bebas pada Eritrosit dan Leukosit. *Cermin Dunia Kedokteran*. 1997; 116:49-52
6. McVean M, Kim KS, and Daniel CL. Oxidants and Antioxidants in Ultraviolet-Induced Nonmelanoma Skin Cancer. 1999
7. Stillwell Keith. Therapeutic Electricity and Ultraviolet Radiation. 1983. Third Ed.
8. DiSilvestro R, 2001. Flavonoid as Antioxidants in Handbook of Nutraceutical and Functional Foods. Edited by Wildman, REC. CRC Press Boca Raton London.

9. Fadil O, 2000. Hubungan Raikal Bebas dan Gizi Pada Proses Penuaan. Buku Naskah Lengkap Simposium Pengaruh Radikal Bebas terhadap Penuaan dalam Rangka Lustrum IX FKUA Padang, 7 September 1955-2000.
10. Harborne JB. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press Inc, Berkeley Square House, London. 1967.
11. Larlykova Iuv, Ivanova SM, Labetskala OI. Effect of UV – radiation on metabolism and structural – fuctional status of the rats erythrocyte membranes; *Anakosm Ekolog Med*. 2005; 39 (2) : 45 – 9.
12. Misra RB, Ray RS, Hans RK. Effect of UVB radiations on human erythrocytes in vitro. *Toxicology in vitro*. 2005; 19: 433 – 38.
13. Wu X, Pan L, Wang Z, Liu X, Zhao D, Zhang X et al. Ultraviolet irradiation induces autofluorescence enhancement via production of reactive oxigen species and photo decomposition in erythrocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 396: 999-1005.
14. Sri L Wihardi, 2000. Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Penuaan Kulit dan Penatalaksanaannya. Naskah Lengkap Simposium Pengaruh Radikal Bebas terhadap Penuaan dalam Rangka Lustrum IX FKUA 7 September 1955-2000.